

ICS 71.040.50

Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen – Chemische Heterogenität von Polyethylenoxiden

Liquid Chromatography at Critical Conditions (LCCC) –
Chemical heterogeneity of polyethylene oxides

Chromatographie liquide aux conditions critiques –
Hétérogénéité chimique des oxydes de polyéthylène

Zur Erstellung einer DIN SPEC können verschiedene Verfahrensweisen herangezogen werden:
Das vorliegende Dokument wurde nach den Verfahrensregeln eines Fachberichts erstellt.

Gesamtumfang 40 Seiten

DIN-Normenausschuss Beschichtungsstoffe und Beschichtungen (NAB)
DIN-Normenausschuss Kunststoffe (FNK)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich.....	4
2 Begriffe	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Geräte.....	5
4.1 Allgemeines	5
4.2 Elutionsmittelversorgung	5
4.3 Pumpe	6
4.4 Injektionssystem.....	6
4.5 Trennsäulen	6
4.6 Temperiereinrichtungen	7
4.7 Detektoren	7
4.8 Elutionsmittel	7
4.9 Datenerfassung.....	7
5 Probenvorbereitung.....	8
6 Durchführung der Messungen	8
6.1 Bestimmung der kritischen Bedingungen.....	8
6.2 Analyse des Validierungs-KIT	9
7 Bericht	9
Anhang A (informativ) Fehlerquellen.....	11
Anhang B (informativ) Auswertung der Ringversuche	12
Anhang C (informativ) Elugramme der Teilnehmer (Auszüge)	19
Anhang D (informativ) Untersuchungen zur Langzeitstabilität des Testgemisches	36
Literaturhinweise.....	40

Vorwort

Die DIN SPEC 91070 (Fachbericht) wurde vom Arbeitskreis NA 002-00-02-03 AK „Gelpermeationschromatographie“ des Arbeitsausschusses NA 002-00-02 AA „Lackrohstoffe“ im DIN-Normenausschuss Beschichtungsstoffe und Beschichtungen (NAB) ausgearbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Zur vorliegenden DIN SPEC (Fachbericht) wurde kein Entwurf veröffentlicht.

Seit der erstmaligen Beschreibung der Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen (en: liquid chromatography at critical conditions; LCCC) 1986 durch Entelis et al. [1] wurde die Methode stets weiterentwickelt und hat sich als unentbehrlich in der Polymercharakterisierung erwiesen. Die Trennung ist nicht nur für die quantitative Analyse der einzelnen Spezies notwendig. Sie bietet die Voraussetzung für die qualitative Charakterisierung der Fraktionen mittels spektroskopischer und spektrometrischer Techniken. Entscheidend ist hierbei die Herabsetzung der Polydispersität/chemischen Heterogenität innerhalb einer Fraktion, welche für massenspektrometrische Untersuchungen ein großes Problem darstellen.

Die Methode ist in den letzten zwei Jahrzehnten in der Fachwelt ausführlich für unterschiedliche Polymersysteme beschrieben worden, siehe [2] bis [9].

Im Rahmen des DIN-Normenausschusses sollte innerhalb von Ringversuchen geklärt werden, inwieweit die Methode übereinstimmende Ergebnisse für ein einfaches, chemisch heterogenes Polymergemisch liefert.

Zu diesem Zeitpunkt wurden von keinem der teilnehmenden Labore notwendige Erfahrungen bezüglich der Auswahl des Systems (Zusammenspiel der Polaritäten Trennphase/Eluent/Probe) vorausgesetzt.

Die Ringversuche haben gezeigt, dass auch bei einem gut charakterisierten System sowie der Vorgabe aller einschlägigen Systemparameter das Verfahren bisher nicht als Routine-Verfahren in Laboren mit Erfahrung in Polymeranalytik eingestuft werden kann.

Es liegt die Überlegung nahe, einen Validierungs-Kit (Polymergemisch mit dem zu erwartenden Trennergebnis) anzubieten.

1 Anwendungsbereich

Ziel des Fachberichtes ist sowohl die Validierung eines Verfahrens zur Trennung von chemisch heterogenen Polyethylenoxid (PEO)-Gemischen als auch die Ermittlung der Anzahl sowie des Gehaltes der chemisch heterogenen Spezies in der Gesamtprobe.

Das vorliegende Verfahren dient als technische Richtlinie und soll Labore befähigen, das Prinzip der „Kritischen Chromatographie“ an einem validierten System zu erlernen.

Auf Grund der Vielfalt der Wechselwirkungen Polymer/mobile Phase/stationäre Phase und der damit zur Verfügung stehenden Anzahl der Trennsysteme ist dieses Verfahren mit den angegebenen Systemparametern nicht allgemeingültig für andere Polymerklassen.

2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

2.1

Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen

en: Liquid Chromatography at Critical Conditions (LCCC)

spezielle Form der Flüssigchromatographie von Polymeren am kritischen Punkt der Adsorption

Anmerkung 1 zum Begriff: Am kritischen Punkt der Adsorption eluieren chemisch und strukturell identische Polymere mit einer bestimmten Wiederholeinheit unabhängig von der Molmasse zur selben Retentionszeit. Die einzelnen Monomereinheiten tragen nicht zur Retention bei. Unter diesen ermittelten Systemparametern (definierte Kombination Trennsäule/Eluentengemisch/Temperatur) erfolgt eine Trennung von Polymergemischen derselben Wiederholeinheit nach chemischer Heterogenität. Chemische Heterogenitäten können unterschiedliche funktionelle Gruppen, Endgruppen, Unterschiede in der Mikrostruktur (z. B. Copolymere und deren Zusammensetzung) sowie topologische Unterschiede (z. B. Verzweigungen) sein.

3 Kurzbeschreibung

Im Folgenden wird das Verfahren für die Trennung von Polyethylenoxiden unter kritischen Bedingungen der Adsorption für die Ethylenoxidwiederholungseinheit beschrieben.

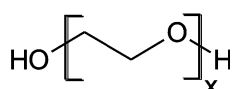
Drei Polyethylenglykole (PEG) unterschiedlicher Molmasse (1 mg/ml bis 2 mg/ml gelöst im jeweiligen Eluentengemisch, siehe Abschnitt 6, Bestimmung der kritischen Bedingungen) werden beginnend mit hohem Anteil des thermodynamisch guten Lösemittel B (in diesem Fall Acetonitril) vermessen. Das Eluentengemisch wird durch Erhöhung der Komponente A (in diesem Fall Wasser) sukzessive verändert. Es folgen Messungen in unterschiedlichen Zusammensetzungen bis alle drei Standards unabhängig von der Molmasse zur selben Retentionszeit eluieren. Die ermittelte Eluentenzusammensetzung (en: critical solvent composition, csc) entspricht den kritischen Bedingungen.

Nachfolgend werden die unbekannten Mischungen in ebendiesem Eluentengemisch gelöst und vermessen.

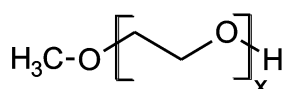
Aus den Peaks der resultierenden Chromatogramme kann die Anzahl der Spezies mit unterschiedlichen Funktionalitäten, sowie deren relativer Gehalt (unter Berücksichtigung der Detektionseigenschaften) ermittelt werden.

In den Mischungen enthaltene Spezies:

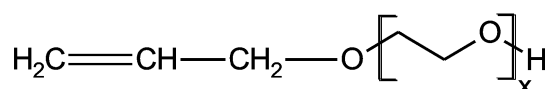
(1) Polyethylenglycol



(2) Methylenpolyethylenglycol



(3) Polyethylenglycol monoallylether



4 Geräte

4.1 Allgemeines

Die notwendige Apparatur besteht aus den im Bild 1 gezeigten Komponenten, die im Folgenden näher beschrieben werden.

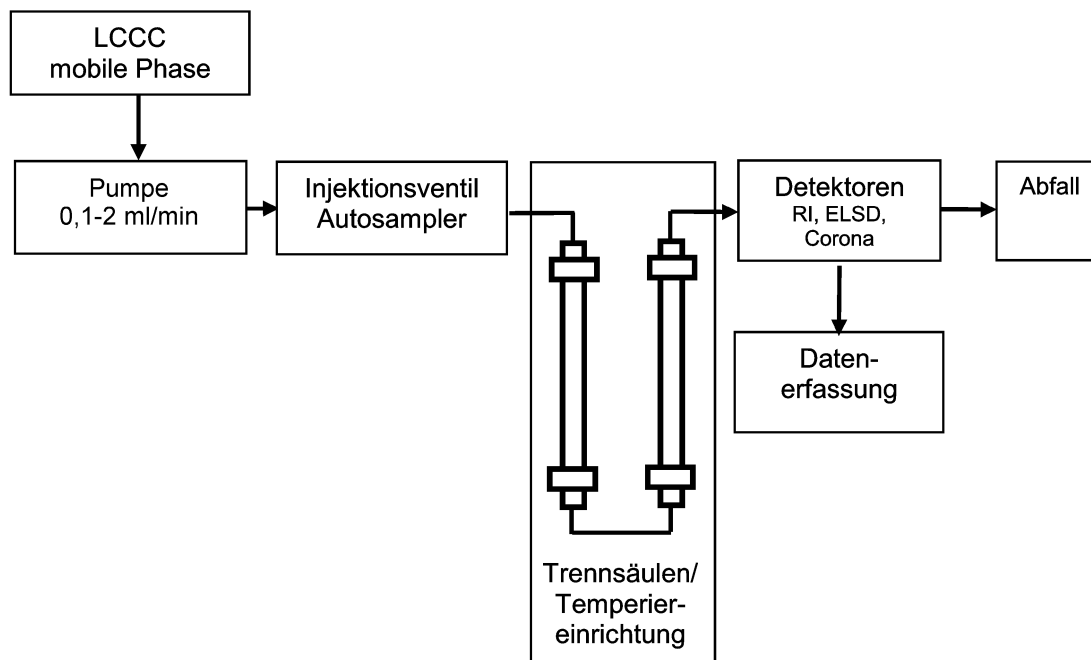


Bild 1 — LCCC-Apparatur

Bei der Auswahl der Apparatur ist generell sicherzustellen, dass alle Teile, die mit dem Elutionsmittel oder der Probenlösung in Berührung kommen, gegen diese beständig sind und keine Adsorptions- oder Memoryeffekte zeigen. Die einzelnen Module sollten für die Polymeranalytik im Allgemeinen mit Stahlkapillaren verbunden sein.

4.2 Elutionsmittelversorgung

Das Vorratsgefäß für das Elutionsmittel muss das Elutionsmittel ausreichend gegen äußere Einflüsse (Luftkontakt, Lichteinfall) abschirmen, eventuell unter Verwendung eines Schutzgases oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche.

Das Vorratsgefäß für das Elutionsmittel enthält mindestens einen für die Gleichgewichtseinstellung der Apparatur und für mehrere Wiederholungsanalysen ausreichenden Vorrat des benutzten Elutionsmittels.

Störungen beim Ansaugen durch die Pumpe oder Dekompressionsblasen im Detektor sind durch Entgasen des Elutionsmittels vor dem Einfüllen in das Vorratsgefäß für das Elutionsmittel oder durch eine zwischen dem Vorratsgefäß für das Elutionsmittel und Pumpe eingebaute Vorrichtung zu verhindern. Das Prinzip der Entgasung (z. B. Blasenfalle, online-Begasung mit Helium, Vakuumentgasung) ist freigestellt, muss aber im Prüfbericht angegeben werden.

ANMERKUNG Für Polymergemische, die chromophore Gruppen enthalten, können auch andere Detektoren, z. B. UV- oder IR-Detektoren, eingesetzt werden.

4.3 Pumpe

Die Pumpe sorgt für einen möglichst gleichmäßigen und pulsationsfreien Transport des Elutionsmittels durch die Trennsäulen. Der Durchfluss beträgt 0,5 ml/min bis 1 ml/min je nach Dimension der verwendeten Säulen. Zur Erfüllung dieser Aufgaben muss der optimale Förderbereich der Pumpe bei diesem Durchfluss und dem sich dabei einstellenden Gegendruck liegen. Die Flussrate der verwendeten Pumpe darf eine Abweichung von höchstens 0,1 % haben.

4.4 Injektionssystem

Das Injektionssystem dient zum Einbringen einer exakt vorgegebenen Menge der Probenlösung (5 µl bis 25 µl) in einem möglichst scharf begrenzten Elutionsmittelintervall in das chromatographische Trennsystem. Dieses Einbringen kann manuell oder automatisch erfolgen.

Beim Füllen und beim Einschleusen in den chromatographischen Flüssigkeitsstrom ist durch ausreichend große Spülvolumina sicherzustellen, dass auch bei Vorliegen von Laminar-Strömungs-Effekten das Volumen der Injektionsvorrichtung exakt mit dem Volumen der Probenlösung gefüllt und anschließend restlos wieder ausgespült wird.

Memory-Effekte in dem Injektionssystem durch vorhergehende Probenlösungen sind konstruktiv oder durch ausreichende Spülungen auszuschließen.

4.5 Trennsäulen

Das Trennsystem besteht aus einer oder mehreren hintereinandergeschalteten Säulen, die mit einem kugelförmigen ($d < 10 \mu\text{m}$) porösen Trennmateriale gefüllt sind, wobei der Durchmesser der Porenöffnungen der Knäuelgröße der zu untersuchenden Polymerelemente entspricht (für das hier beschriebene Verfahren 80 Å bis 300 Å).

In Abhängigkeit von der molaren Masse der zu untersuchenden Proben ist gegebenenfalls die Porengröße des Trennmateriale anzupassen.

Das Trennmateriale besteht hier aus einer unpolaren/hydrophoben stationären Phase (octadecyl-modifiziertes Kieselgel, reversed phase, C18). Die hydrophoben Eigenschaften des Materials sollten durch „endcapping“ mit Trimethylchlorsilan nochmals verstärkt worden sein. Der erzielte C-Gehalt liegt damit $>> 10 \%$.

Um das Ziel dieses Fachberichtes zu erreichen, dass in verschiedenen Laboratorien auf verschiedenen LC-Apparaturen für dieselbe Probe möglichst übereinstimmende Resultate erhalten werden, sind bezüglich Peakverbreiterung (ausgedrückt durch die Zahl der theoretischen Böden) und Trennleistung die im Folgenden festgelegten Mindestanforderungen einzuhalten; die tatsächlich erreichten Werte sind im Prüfbericht anzugeben:

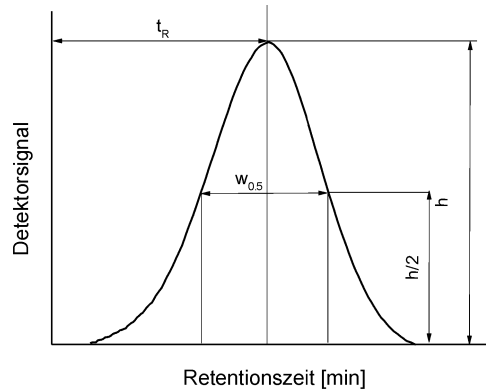
Zahl der theoretischen Böden

In der benutzten Apparatur wird die theoretische Bodenzahl N je 1 m Säulenlänge nach dem Halbe-Höhen-Verfahren bestimmt. Unter den auch für die Polymeranalysen benutzten Versuchsbedingungen werden max. 20 µl einer Lösung des PEG 1 500 Standards Massenkonzentration min. 1 mg/ml, in die Säulen injiziert und das resultierende Chromatogramm nach folgender Gleichung ausgewertet:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \frac{100}{L} \quad (1)$$

Dabei ist

- t_R die Retentionszeit am Peakmaximum (gleiche Maßeinheiten sind zu benutzen, z. B. min);
- $w_{0,5}$ die Peakbreite bei der halben Maximalhöhe;
- L die Länge der Säule(nkombination), in cm.



Legende

- t_R Retentionszeit am Peakmaximum, in min
- $w_{0,5}$ Peakbreite bei der halben Maximalhöhe
- h Peakhöhe
- $h/2$ halbe Peakhöhe

Bild 2 — Bestimmung der theoretischen Bodenzahl, Halbe-Höhe-Verfahren

Das Resultat wird relativ angegeben als Zahl der theoretischen Böden je Meter Säulenlänge. Es sollte eine Säule(nkombination) verwendet werden, die mindestens 5 000 theoretische Böden je eingesetzter Säule(nkombination) erreicht.

4.6 Temperiereinrichtungen

Die Analysen können in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 45 °C durchgeführt werden. Dabei darf sich die Säulentemperatur während einer Analyse nicht um mehr als 0,5 °C ändern. Alle Analysen sind bei derselben Temperatur auszuführen, da die LCCC als enthalpischer Prozess temperaturabhängig ist. [1]

4.7 Detektoren

Als Detektoren können der RID (Brechungsindexdetektor; refractive index detector), der ELSD (Verdampfungslichtstreuendetektor; evaporative light scattering detector) oder der Corona CAD (charged aerosol detector) verwendet werden.

4.8 Elutionsmittel

Alle verwendeten Elutionsmittel sollten den Reinheitsgrad „HPLC grade“ besitzen. Die Eluenten sollten nicht in das Vorratsgefäß zurückgeführt werden.

4.9 Datenerfassung

Die vom Detektionssystem ausgehenden Signale werden durch ein elektronisches Datensystem erfasst.

5 Probenvorbereitung

Die Proben (1 mg/ml bis 2 mg/ml) werden im jeweiligen Eluenten gelöst. Um Veränderungen der Polymere in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit als Fehlerquelle auszuschließen, sollten die Proben innerhalb 6 h nach Herstellung der Lösung analysiert werden.

Der Validierungs-KIT (Mischung 2) wird mit 2 ml der kritischen Lösemittelzusammensetzung aufgefüllt.

6 Durchführung der Messungen

6.1 Bestimmung der kritischen Bedingungen

Die Einstellung der kritischen Bedingungen kann entweder durch die Änderung der Temperatur oder durch die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase erfolgen.

In folgender Vorschrift wird die Temperatur streng konstant gehalten und sukzessive die Lösungsmittelzusammensetzung bei abnehmendem Acetonitril-Gehalt geändert. Dies kann durch separate Mischung der Komponenten oder mit einer binären Pumpe erfolgen.

Die drei Standards unterschiedlicher Molmasse werden in der jeweils gewählten Lösemittelzusammensetzung gemessen. Hierbei ist dringend zu beachten, dass auch das Lösemittel, in dem der Standard gelöst wird, der Eluentenzusammensetzung entspricht.

Die kritische Lösungsmittelzusammensetzung (ACN:H₂O) ist erreicht, wenn alle Moleküle der gleichen chemischen Struktur (in diesem Fall PEG Standards) zur gleichen Retentionszeit eluieren. Das heißt, unter diesen Bedingungen wird das chromatographische Verhalten nicht mehr von der Größe des Moleküls, sondern von chemischer Inhomogenität bestimmt.

Zur Bestimmung der kritischen Lösungsmittelzusammensetzung ist die Auftragung $\lg M_p$, in g/mol, gegen die Retentionszeit, in min, (Bild 3, links) bzw. Gehalt der Komponente B des Eluenten, in %, zu Retentionsfaktor k (Bild 3, rechts) zu wählen.

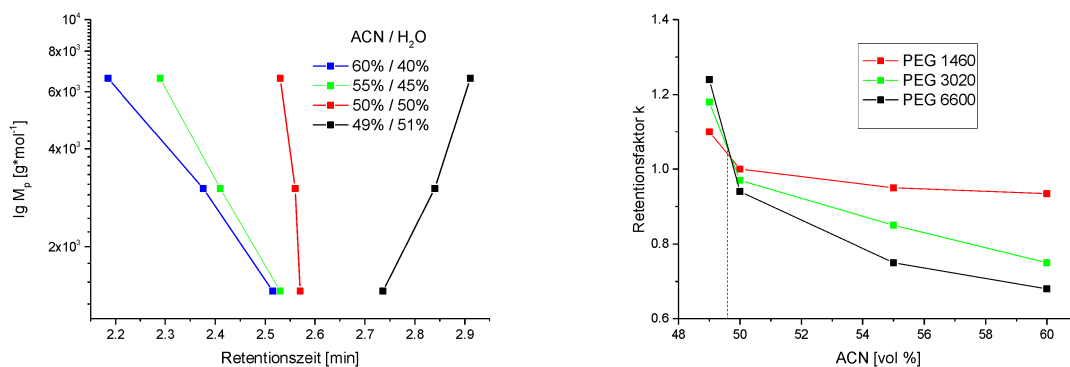


Bild 3 — Schematische Darstellung der Ermittlung der kritischen Lösungsmittelzusammensetzung

Der Retentionsfaktor k errechnet sich nach Gleichung 2:

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (2)$$

Dabei ist

t_R die Retentionszeit des Standards im jeweiligen System;

t_0 die Retentionszeit einer nicht verzögerten Substanz.

6.2 Analyse des Validierungs-KIT

Die Probe wird mit 2 ml des kritischen Lösungsmittelgemisches versetzt und bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst.

Um Veränderungen der Polymere in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit als Fehlerquelle auszuschließen, sollten die Proben innerhalb 6 h nach Herstellung der Lösung analysiert werden. Auf Temperaturkonstanz der Säule ist zu achten.

Das Injektionsvolumen muss auf den benutzten Säulensatz abgestimmt und kann somit zwischen 5 µl und 25 µl variiert werden.

Es ist empfehlenswert, vor Messung der Probe einen Blindversuch (Injektion des Eluenten/des reinen Probelösungsmittels) durchzuführen, um Lösungsmittelsignale oder Peaks die durch die Injektion verursacht werden, zu identifizieren.

Die Messung der Probe endet nach vollständiger Elution des letzten Systempeaks und Rückkehr des Signals auf die Basislinie.

Es werden drei Wiederholungsmessungen durchgeführt und die Mittelwerte der Retentionszeit für die getrennten Peaks errechnet.

Die chromatographische Auflösung zweier Peaks R als ein Qualitätskriterium der Trennung errechnet sich nach Gleichung 3:

$$R = 1,18 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{FWHM1 + FWHM2} \quad (3)$$

Dabei ist

t_R die Retentionszeit;

FWHM die Breite des Peaks in halber Maximalhöhe (en: full width at half maximum).

7 Bericht

Der Bericht muss die folgenden Angaben enthalten:

- Angaben zur Apparatur (Pumpe, Entgaser, Injektionssystem, Säulenofen, Detektoren, Auswertesoftware);
- Trennsäulen (Hersteller, Trennmaterial- und Porengrößentyp, Korngröße, Anzahl, Abmessungen, C-Gehalt);
- Zahl der theoretischen Böden je Säulenkombination in der benutzten LC-Apparatur;
- Säulentemperatur;
- Flussrate;

- f) kritische Lösungsmittelzusammensetzung, in %, (Massenanteil oder Volumenanteil) mit Angabe der Mischweise (Gradientenpumpe oder separate Herstellung der Mischungen);
- g) Konzentration der injizierten Lösung, in mg/ml, (bei selbst einzuwiegenden Proben);
- h) Injektionsvolumen, in µl;
- i) Überlagerung der Elugramme der drei PEG's unterschiedlicher Molmasse;
- j) Validierungs-KIT Flächenprozentreport, inklusive Chromatogramm;
- k) Angabe der Mittelwerte der Retentionszeit;
- l) Angabe der chromatographischen Auflösung der Peaks RAB, RAC und RBC nach [3].

Anhang A (informativ)

Fehlerquellen

Die Auswertung der Ringversuche hat gezeigt, dass viele Fehlerquellen nicht nur speziell auf fehlende Erfahrung hinsichtlich der Chromatographie von Polymeren zurückzuführen sind, sondern die Technik der Flüssigchromatographie allgemein betreffen.

Bekanntlich ist die Auflösung R von dem Trennfaktor α (Selektivität, Maß für die Trennfähigkeit des chromatographischen Systems), von dem Retentionsfaktor k (Kapazität, Maß für die Stärke der Wechselwirkungen) und eben von der Bodenzahl N (Effizienz, Maß für die Bandenverbreiterung der Substanzzone) abhängig

Entspricht das Ergebnis nicht den Erwartungen sollten folgende Aspekte überdacht werden:

- 1) Sind Säulendimension und Packungsmaterial optimal gewählt?

Verbesserung der Auflösung über Bodenzahl:

- möglichst lange Säule
- möglichst kleine Teilchen
- optimale Flussraten
- Adsorptionsbereich, Ausschlussgrenze der gewählten Säule bestimmen
- Bodenzahlbestimmung ($> 25\,000/m$)
- Anpassung der Porengröße an die größte zu untersuchende Molmasse (z. B. $> 100\text{ Å}$ bei Molmassen über $6\,000\text{ g/mol}$)

- 2) Ist die Säule durch vorangegangene Injektionen beladen/verändert, Spezifikation nicht mehr gegeben?

Dies kann die Selektivität verändern und diese beeinflusst die Auflösung stärker als die Bodenzahl! (Trennfaktor α).

- 3) Überlagern Lösungsmittelsignale und „Systempeaks“ die Peaks des Analyten (besonders bei Verwendung von RI- (und UV)-Detektoren).
- 4) Wurden die Spülzeiten beim Umspülen auf neue Lösemittelzusammensetzungen beachtet (Referenzzelle spülen!)?
- 5) Entsprechen die Kapillarinneindurchmesser und -längen zwischen Säule und Detektor den Anforderungen (maximal $0,12\text{ mm}$ Innendurchmesser)?
- 6) Existieren Totvolumina (besonders bei hintereinandergeschalteten Detektoren)?
- 7) Wurde die Probe tatsächlich im aktuellen Eluentengemisch analysiert?

Anhang B (informativ)

Auswertung der Ringversuche

B.1 Ringversuchsteilnehmer

Am Ringversuch nahmen 17 Labore teil, die Erfahrungen mit HPLC und Polymeren als zu untersuchende Substanzklasse besitzen.

B.2 Systemparameter zur Durchführung des Ringversuches, die den Teilnehmern zur Verfügung gestellt wurden

Proben:

Bezeichnung	Typ	Molmasse g/mol	Zusammensetzung
S 1	PEG 1500Standard	1 500	
S 2	PEG 3000Standard	3 000	
S 3	PEG 6000 Standard	6 000	
A 2	PEO-A	3 000	allyl
M 2	PEO-M	5 000	methoxy
Mi 1	PEO-X	unbekannt	unbekannt
Mi 2	PEO-X	unbekannt	unbekannt

- 1) Polyethylenglycol-Standards im Molmassenbereich von 1 500 g/mol bis 6 000 g/mol zur Bestimmung der kritischen Bedingungen der Adsorption (S 1 bis S 3)
- 2) Polyethylenoxide mit unterschiedlichen Funktionalitäten (A 2 und M 2), sowie deren Mischung zur Trennung unter kritischen Bedingungen und zur Quantifizierung der Komponenten (Mi 1 und Mi 2)

ANMERKUNG Die Probelösungen A 2, M 2 und Mischung 1 mussten selbst hergestellt werden (einwiegen, lösen). Mischung 2 sollte mit 2 ml des Eluenten aufgefüllt werden und stand dann zur Messung zur Verfügung.

Säulen: RP 18, < 300 Å, < 1 µm
 Säulentemperatur: (45 ± °C)
 Eluent: Acetonitril / Wasser (V/V oder m/m)
 Flussrate: 0,5 ml/min oder 1 ml/min
 Detektion: ELSD, Corona, RI
 Injektionsvolumen: 10 µl bis 20 µl
 Probenkonzentration: etwa 1 ml/ml bis 2 mg/ml

Die Proben wurden im jeweiligen Eluenten gelöst (Mischung 2 + 2 ml Eluent). Um Veränderungen der Polymere in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit als Fehlerquelle auszuschließen, sollten die Proben innerhalb 6 h nach Herstellung der Lösung analysiert werden. Auf Temperaturkonstanz der Säule war zu achten.