

4 FEBRUARI 2000. - Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

Bijlage II

A.19. GEHALTE VAN POLYMEREN AAN LAAGMOLECULAIRE BESTANDDELEN

1. METHODE

Deze methode voor gelpermeatiechromatografie is overgenomen van TG 119 van de OESO (1996). Voor de fundamentele beginselen en nadere technische informatie wordt verwezen naar de referenties.

1.1. Inleiding

Aangezien de eigenschappen van polymeren zo sterk uiteenlopen, is het onmogelijk een enkele methode te beschrijven waarin voor alle mogelijkheden en specifieke gevallen bij de scheiding van polymeren exact de omstandigheden voor scheiding en evaluatie worden aangegeven. Met name complexe polymeersystemen komen vaak niet in aanmerking voor gelpermeatiechromatografie (GPC). Wanneer GPC niet uitvoerbaar is, kan het molecuulgewicht met behulp van andere methoden worden bepaald (zie bijlage). In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

De hier beschreven methode is gebaseerd op de norm DIN 55672 (1). Deze norm bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop de experimenten moeten worden uitgevoerd en de gegevens moeten worden geëvalueerd. Wanneer veranderingen in de wijze van uitvoering nodig zijn, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Ook andere normen kunnen worden gebruikt, mits de referenties volledig worden vermeld. In de beschreven methode worden voor de kalibratie polystyreenmonsters met een bekende polydispersiteit gebruikt en wijzigingen kunnen nodig zijn om de methode geschikt te maken voor bepaalde polymeren zoals in water oplosbare polymeren en vertakte polymeren met een lange keten.

1.2. Definities en eenheden

Een laag molecuulgewicht wordt hier willekeurig gedefinieerd als een molecuulgewicht beneden 1 000 dalton.

Het aantalgemiddelde molecuulgewicht (M_n) en het gewichtgemiddelde molecuulgewicht (M_w) worden bepaald met behulp van de volgende vergelijkingen :

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i / M_i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

1.3. Referentiestoffen

Aangezien GPC een relatieve methode is, moet het systeem worden gekalibreerd. Als standaard worden normaal gesproken fijn verdeelde lineair opgebouwde polystyreenmonsters gebruikt met bekende gemiddelde molecuulgewichten (M_n en M_w) en een bekende molecuulgewichtsverdeling. De kalibratiecurve kan alleen voor de bepaling van het molecuulgewicht van het onbekende monster worden gebruikt als de omstandigheden voor de scheiding van het monster en de standards op identieke wijze zijn gekozen.

Een tijdens een bepaald experiment vastgesteld verband tussen het molecuulgewicht en het elutievolume is alleen onder de specifieke omstandigheden van dat experiment geldig. Daarbij gaat het vooral om de temperatuur, het oplosmiddel (of het oplosmiddelenmengsel), de omstandigheden tijdens chromatografie en de kolom of het kolomsysteem waarop de scheiding is uitgevoerd.

Een op deze manier bepaald molecuulgewicht van het monster is relatief en wordt beschreven als een "polystyreen-equivalent molecuulgewicht". Dit houdt in dat het molecuulgewicht afhankelijk van de structurele en chemische verschillen tussen het monster en de standaard in meer of mindere mate van de absolute waarde kan afwijken. Als een andere standaard wordt gebruikt, zoals polyethyleenglycol, polyethyleenoxide, polymethylmethacrylaat of polyacrylzuur, moet de reden daarvan worden vermeld.

1.4. Principe van de testmethode

Zowel de molecuulgewichtsverdeling van het monster als het gemiddelde molecuulgewicht (M_n of M_w) kan met behulp van GPC worden bepaald. GPC is een speciaal soort vloeistofchromatografie waarbij het monster aan de hand van het hydrodynamische volume van de verschillende bestanddelen wordt gescheiden (2).

De scheiding voltrekt zich tijdens de passage van het monster door een kolom die met een poreus materiaal, meestal een organische gel, is gevuld. Kleine moleculen kunnen de poriën binnendringen, terwijl grote moleculen dit niet kunnen. Grote moleculen volgen dan ook een kortere weg en worden het eerste geëluëerd. Middelgrote moleculen kunnen sommige poriën binnendringen en worden later geëluëerd. De kleinste moleculen, waarvan de gemiddelde hydrodynamische straal kleiner is dan de poriën van de gel, kunnen alle poriën binnendringen. Deze worden het laatste geëluëerd.

In het ideale geval wordt de scheiding uitsluitend door de grootte van het molecuul bepaald, maar enige storing door absorptie-effecten is in de praktijk vrijwel niet te voorkomen. Een ongelijkmatige pakking van de kolom en dode ruimtes kunnen de situatie nog ongunstiger maken (2).

Detectie gebeurt aan de hand van bijvoorbeeld de brekingsindex of UV-absorptie en levert een eenvoudige verdelingskromme op. Om echte waarden voor het molecuulgewicht aan de kromme te kunnen toekennen, moet de kolom echter worden gekalibreerd met behulp van polymeren met een bekend molecuulgewicht en liefst een in grote lijnen vergelijkbare structuur, bijvoorbeeld een aantal polystyreenstandaards. Meestal levert dit een Gauss-curve op, soms met een kleine staart aan de kant van de lage molecuulgewichten, waarbij op de verticale as de geëluëerde hoeveelheid in gewicht wordt uitgezet en op de horizontale as de logaritme van het molecuulgewicht.

Het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen wordt uit deze kromme afgeleid. De kalibratie kan alleen nauwkeurig zijn als de respons van de laagmoleculaire bestanddelen per massa-eenheid equivalent is met die van het polymeer als geheel.

1.5. Kwaliteitscriteria

De herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) van het elutievolume moet beter zijn dan 0,3 %. Indien een chromatogram tijdafhankelijk wordt geëvalueerd en niet aan dit criterium voldoet, moet door correctie met behulp van een interne standaard de vereiste herhaalbaarheid van de analyse worden gewaarborgd (1).

De polydispersiteit is afhankelijk van het molecuulgewicht van de standaard. Normale waarden voor polystyreenstandaards zijn :

$M_p < 2\ 000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\ 000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

1.6. Beschrijving van de testmethode

1.6.1. Bereiding van de polystyreen-standaardoplossingen

De polystyreenstandaard wordt opgelost door deze zorgvuldig te mengen in de gekozen elutievloeistof. Bij de bereiding van de oplossingen moet rekening worden gehouden met de aanbevelingen van de fabrikant.

De concentratie van de standaardoplossingen wordt bepaald aan de hand van verschillende factoren, zoals het geïnjecteerde volume, de viscositeit van de oplossing en de gevoeligheid van de detector. Het maximale geïnjecteerde volume moet aan de lengte van de kolom worden aangepast om overlading te voorkomen. Voor een scheiding met behulp van GPC over een kolom van 30 cm x 7,8 mm wordt meestal een volume van 40 tot 100 μ g/ml geïnjecteerd. Grotere volumes zijn mogelijk, maar niet groter dan 250 μ g/ml. De optimale verhouding tussen het geïnjecteerde volume en de concentratie moet vóór de kalibratie van de kolom worden bepaald.

1.6.2. Bereiding van de monsteroplossing

In beginsel gelden voor de bereiding van de monsteroplossingen dezelfde eisen. Het monster wordt door zorgvuldig schudden opgelost in een geschikt oplosmiddel, bijvoorbeeld tetrahydrofuraan (THF). Het mag in geen geval met behulp van een ultrasoon bad worden opgelost. Indien nodig wordt de monsteroplossing gezuiverd over een membraanfilter met een poriegrootte tussen 0,2 en 2 μ m.

Indien de oplossing onopgeloste deeltjes bevat, moet dit in het eindverslag worden vermeld aangezien deze door hoogmoleculaire bestanddelen kunnen ontstaan. Er moet een adequate methode worden gebruikt om het gewichtspercentage van de onopgeloste deeltjes te bepalen. De oplossingen moeten binnen 24 uur worden gebruikt.

1.6.3. Correctie voor het gehalte aan verontreinigingen en additieven

Meestal moet het gehalte aan bestanddelen met $M < 1\ 000$ worden gecorrigeerd voor de bijdrage van niet polymeerspecifieke componenten (zoals verontreinigingen en/of additieven), tenzij het gemeten gehalte al lager is dan 1 %. Dit gebeurt door een directe analyse van de polymeeroplossing of van het GPC-eluaat.

Wanneer het eluaat na de passage door de kolom te verdund is om nog te worden geanalyseerd, moet het worden geconcentreerd. Daarbij kan het nodig zijn het eluaat droog te dampen en vervolgens weer op te lossen. Het concentreren van het eluaat moet onder zodanige omstandigheden gebeuren dat wordt gewaarborgd dat er geen veranderingen in het eluaat optreden. De behandeling van het eluaat na GPC is afhankelijk van de analysemethode die voor de kwantitatieve bepaling wordt gebruikt.

1.6.4. Apparatuur

De GPC-apparatuur bestaat uit de volgende onderdelen :

- Oplosmiddelreservoir
- Ontgasser (indien van toepassing)
- Pomp
- Pulsdemper (indien van toepassing)
- Injectiesysteem
- Chromatografiekolommen
- Detector
- Stromingsmeter (indien van toepassing)
- Gegevensrecorder/verwerker
- Afvalreservoir.

Er moet voor worden gezorgd dat het GPC-systeem niet met de gebruikte oplosmiddelen reageert (bijvoorbeeld door stalen capillairen te gebruiken voor THF-oplossingen).

1.6.5. Injectie- en oplosmiddeltoevoersysteem

Een bekend volume van de monsteroplossing wordt met behulp van een autosampler of manueel in een scherp begrensde zone op de kolom gebracht. Wanneer bij manueel opbrengen de plunjer van de injectiespuit te snel wordt ingedrukt of teruggetrokken, kan dit tot veranderingen in de waargenomen molecuulgewichtsverdeling leiden. Het oplosmiddeltoevoersysteem moet voorzover mogelijk pulsatievrij zijn en liefst een pulsdemper bevatten. De stroomsnelheid moet ongeveer 1 ml/min zijn.

1.6.6. Kolom

Afhankelijk van het monster wordt het polymeer gekarakteriseerd met behulp van één kolom of een aantal in serie gekoppelde kolommen. In de handel zijn verschillende poreuze pakkingsmaterialen met bekende eigenschappen (bijvoorbeeld poriegrootte en exclusiegrens) verkrijgbaar. De keuze van de gel en de lengte van de kolom wordt bepaald door zowel de eigenschappen van het monster (hydrodynamisch volume, molecuulgewichtsverdeling) als de specifieke omstandigheden voor de scheiding zoals oplosmiddel, temperatuur en stroomsnelheid (1) (2) (3).

1.6.7. Theoretische schotels

De voor de scheiding gebruikte kolom of combinatie van kolommen moet worden gekarakteriseerd met behulp van het aantal theoretische schotels. Daartoe moet, indien THF als elutievloeistof wordt gebruikt, een oplossing van ethylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof op een kolom met een bekende lengte worden gebracht. Het aantal theoretische schotels wordt berekend met de volgende vergelijking :

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{of} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

waarbij :

N = het aantal theoretische schotels;

V_e = het elutievolume bij de top van de piek;

W = de piekbreedte aan de basis;

W_{1/2} = de piekbreedte op halve hoogte.

1.6.8. Scheidend vermogen

Naast het aantal theoretische schotels, een grootheid die bepalend is voor de bandbreedte, speelt ook het scheidend

vermogen, dat wordt bepaald door de helling van de kalibratiecurve, een rol. Het scheidend vermogen van een kolom

kan als volgt worden bepaald :

$$\frac{V_{eM_x} - V_{e(10M_x)}}{\text{oppervlak doorsnede van de kolom}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

waarbij :

V_{eM_x} = het elutievolume voor polystyreen met molecuulgewicht M_x ;

V_{e(10 M_x)} = het elutievolume voor polystyreen met een tien keer zo hoog molecuulgewicht.

De resolutie van het systeem wordt meestal als volgt gedefinieerd :

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

waarbij :

V_{e1} , V_{e2} = het elutievolume van de twee polystyreenstandaards bij de top van de piek;

W₁ , W₂ = de piekbreedte aan de basis;

M1 ,M2 = het molecuulgewicht bij de top van de pieken (deze moeten een factor 10 van elkaar verschillen).

De R-waarde voor het kolomsysteem moet groter zijn dan 1,7 (4).

1.6.9. Oplosmiddelen

Alle oplosmiddelen moeten zeer zuiver zijn (THF wordt gebruikt met een zuiverheid van 99,5 %). Het oplosmiddelreservoir (indien nodig onder inert gas) moet groot genoeg zijn voor de kalibratie van de kolom en de analyse van verschillende monsters. Het oplosmiddel moet worden ontgast voordat het via de pomp naar de kolom wordt getransporteerd.

1.6.10. Temperatuurbewaking

De temperatuur van de kritische interne onderdelen (injectieblok, kolommen, detector en leidingen) moet constant zijn en in overeenstemming zijn met het gekozen oplosmiddel.

1.6.11. Detector

De detector is bedoeld om de concentratie van het monster in het eluaat uit de kolom kwantitatief te registreren. Om een onnodige verbreding van de pieken te voorkomen, moet het volume van de meetcel van de detector zo klein mogelijk worden gehouden. Het volume mag niet groter zijn dan 10 μ gml, behalve voor lichtverstrooiings- en viscositeitsdetectoren. Meestal wordt voor de detectie differentiële refractometrie gebruikt. Indien dit in verband met de specifieke eigenschappen van het monster of de elutievloeistof nodig is, kunnen echter ook andere soorten detectors worden gebruikt, zoals UV/VIS, IR of viscositeitsdetectoren.

2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

2.1. Gegevens

Voor de gedetailleerde beoordelingscriteria en voor de eisen ten aanzien van het verzamelen en bewerken van de gegevens wordt verwezen naar de DIN-norm (1).

Voor elk monster moeten twee onafhankelijke experimenten worden uitgevoerd die los van elkaar moeten worden geanalyseerd. Het is van essentieel belang dat in alle gevallen onder dezelfde omstandigheden als de bepaling bij het monster ook een blancobepaling wordt uitgevoerd.

Er moet expliciet worden vermeld dat de gemeten waarden relatief zijn en worden uitgedrukt in equivalent-molecuulgewicht van de gebruikte standaard.

Na de bepaling van de retentievolumes of de retentietijden (eventueel gecorrigeerd met behulp van een interne standaard) wordt de logaritmische waarde van M_p (waarbij M_p de top van de piek van de kalibratiestandaard is) tegen een van deze grootheden uitgezet. Per log-interval zijn minimaal twee kalibratiepunten nodig en voor de curve als geheel minimaal vijf meetpunten. Het geraamde molecuulgewicht van het monster moet tussen het eerste en het laatste meetpunt liggen. Voor de bepaling van het laagste molecuulgewicht van de kalibratiecurve wordt een oplossing van n-hexylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof gebruikt. Het gedeelte van de curve dat overeenkomt met molecuulgewichten lager dan 1 000 wordt indien nodig gecorrigeerd voor verontreinigingen en additieven. De evaluatie van de elutiecurves gebeurt meestal met behulp van elektronische gegevensverwerking. Wanneer de digitalisering met de hand gebeurt, kan ASTM D 3536-91 (3) worden geraadpleegd.

Als er onoplosbaar polymeer op de kolom achterblijft, zal dit waarschijnlijk een hoger molecuulgewicht hebben dan de opgeloste fractie en als daar geen rekening mee wordt gehouden, zou het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen waarschijnlijk te hoog uitvallen. In de bijlage worden richtsnoeren gegeven om het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen te corrigeren voor de aanwezigheid van onoplosbaar polymeer.

De verdelingskromme moet in de vorm van een tabel of als figuur (al dan niet cumulatieve frequentieverdeling tegen $\log M$) worden verstrekt. Bij de grafische weergave moet één log-interval van het molecuulgewicht normaal gesproken ongeveer 4 cm breed zijn en moet de top van de piek ongeveer 8 cm hoog zijn. Bij een cumulatieve frequentieverdeling moet het verschil op de y-as tussen 0 en 100 % ongeveer 10 cm zijn.

2.2. Testverslag

Het testverslag moet de volgende informatie bevatten :

2.2.1. Onderzochte stof

- Beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigingen).
- Beschrijving van de behandeling van het monster, opmerkingen, problemen.

2.2.2. Apparatuur

- Elutievlouistofreservoir, inert gas, ontgassing van de elutievlouistof, samenstelling van de elutievlouistof, verontreinigingen.
- Pomp, pulsdemper, injectiesysteem.
- Scheidingskolommen (fabrikant, alle informatie over de kenmerken van de kolommen zoals poriegrootte en aard van het pakkingsmateriaal, aantal, lengte en volgorde van de gebruikte kolommen).
- Aantal theoretische schotels van de kolom (of de combinatie), scheidend vermogen (resolutie van het systeem).
- Informatie over de symmetrie van de pieken.
- Kolomtemperatuur, aard van de temperatuurregeling.
- Detector (meetprincipe, type, volume van de meetcel).
- Stromingsmeter, indien gebruikt (fabrikant, meetprincipe).
- Systeem voor gegevensregistratie en -verwerking (hardware en software).

2.2.3. Kalibratie van het systeem

- Gedetailleerde beschrijving van de methode die wordt gebruikt om de kalibratiecurve samen te stellen.
- Informatie over de kwaliteitscriteria voor deze methode (bijvoorbeeld correlatiecoëfficiënt of som van de kwadraten).
- Informatie over alle extrapolaties, veronderstellingen en benaderingen tijdens de experimentele procedure en de beoordeling en verwerking van gegevens.
- Alle metingen die voor de samenstelling van de kalibratiecurve worden gebruikt, moeten in een tabel worden opgenomen waarbij voor elk kalibratiepunt de volgende informatie moet worden vermeld :
 - naam van het monster;

- fabrikant van het monster;
- normale waarden van M_p , M_n , M_w en M_w / M_n , zoals deze door de fabrikant zijn verstrekt of door latere metingen zijn bepaald, alsmede gedetailleerde informatie over de bepalingmethode;
- geïnjecteerd volume en concentratie daarin;
- voor kalibratie gebruikte waarde van M_p ;
- bij de top van de piek gemeten elutievolume of gecorrigeerde retentietijd;
- bij de top van de piek berekende M_p ;
- procentuele fout van berekende M_p en de kalibratiewaarde.

2.2.4. Informatie over het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen

- Beschrijving van de bij de analyse gebruikte methoden en de wijze waarop de experimenten zijn uitgevoerd.
- Informatie over het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen (als gewichtspercentage van het totale monster).
- Informatie over het gehalte aan verontreinigingen, additieven en andere niet-polymeerb Bestanddelen (als gewichtspercentage van het totale monster).

2.2.5. Evaluatie

- Evaluatie op basis van tijd : alle methoden die worden gebruikt om de vereiste reproduceerbaarheid te waarborgen (correctiemethode, interne standaard enz.).
- Informatie over de keuze voor elutievolume of retentietijd als basis voor de evaluatie.
- Informatie over de grenzen van de evaluatie als een piek niet volledig wordt geanalyseerd.
- Beschrijving van afvlakmethoden indien deze zijn gebruikt.

- Procedures voor de bereiding en voorbehandeling van het monster.
- Eventuele aanwezigheid van onopgeloste deeltjes.
- Geïnjecteerd volume (|gml) en concentratie daarin (mg/ml).
- Bespreking van effecten die tot afwijkingen van het ideale GPC-profiel leiden.
- Gedetailleerde beschrijving van alle wijzigingen in de testprocedures.
- Gedetailleerde informatie over de foutintervallen.
- Alle andere informatie en opmerkingen die relevant zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3. REFERENTIES

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Voor vragen en/of opmerkingen over EMIS kunt u mailen naar emis@vito.be

Copyright © [VITO](http://www.vito.be) 06/04/2000

Ontwerp [EMIS](http://www.emis.vito.be).