

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Détermination de la teneur en polymères de faible masse moléculaire par chromatographie sur gel perméable

INTRODUCTION

1. La proposition à l'origine de cette Ligne directrice provient d'un document de travail sur les méthodes de caractérisation des polymères, qui émane de la Commission européenne (CE). Elle a été soumise à une réunion d'experts de l'OCDE, que le Japon a accueillie à Tokyo en avril 1993 et qui a recommandé d'élaborer une Ligne directrice de l'OCDE à partir de cette proposition. En 1994, le Secrétariat a envoyé le texte de la CE, présenté sous forme de Ligne directrice de l'OCDE, aux pays Membres. Cette proposition de Ligne directrice a ensuite été examinée et modifiée par des experts, au cours d'une réunion conjointe de l'OCDE et de la CE qui s'est tenue en mai 1994. Un texte révisé a été adressé aux pays Membres, afin qu'ils formulent de nouveaux commentaires. Après deux séries de consultations, le projet de Ligne directrice a été achevé sous sa forme actuelle.

CONSIDERATIONS INITIALES

2. Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la teneur en polymères de faible masse moléculaire à l'aide d'autres méthodes. Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

3. La méthode décrite ci-après se fonde sur la norme DIN 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

DEFINITIONS

4. La masse moléculaire moyenne en nombre M_n et la masse moléculaire moyenne en poids M_w sont déterminées à l'aide des équations suivantes :

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

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

où

H_i est l'amplitude du signal du détecteur correspondant au volume de rétention V_i , par rapport au niveau de référence

M_i est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention, V_i et n est le nombre de points expérimentaux.

5. La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport M_w/M_n .

6. On définit arbitrairement une masse moléculaire faible comme étant une masse moléculaire inférieure à 1000 daltons.

SUBSTANCES DE REFERENCE

7. La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes M_n et M_w , ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique. Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'élution n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes. Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives; on les désigne par le terme "masses moléculaires en équivalent polystyrène". Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurales entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le polyéthylèneglycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

PRINCIPE DE LA METHODE

8. La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes (M_n , M_w). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2). La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles

sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

9. Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter l'interférence de certains effets d'absorption au moins. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

10. La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'U.V. pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible. Une courbe de Gauss en résulte généralement; elle présente parfois une distorsion, sous forme d'une queue du côté des masses moléculaires faibles, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire. La teneur en polymères de faible masse moléculaire est déduite de cette courbe. Le calcul ne peut être exact que si les espèces à faible masse moléculaire se comportent de la même manière, par unité de masse, que l'ensemble du polymère

CRITERES DE QUALITE

11. La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'éluion doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'améliorer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut (voir informations complémentaires en (1)). Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons; dans le cas des polystyrènes étalons :

$$\begin{array}{rcl}
 & M_p < 2000 & M_w/M_n < 1.20 \\
 2000 \leq & M_p \leq 10^6 & M_w/M_n < 1.05 \\
 & M_p > 10^6 & M_w/M_n < 1.20
 \end{array}$$

(M_p est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

DESCRIPTION DE LA METHODE

Préparation des solutions de polystyrène étalon

12. On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

13. Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm x 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100 μ l. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250 μ l. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

Préparation de la solution de l'échantillon

14. En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue selon les mêmes critères. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le THF, en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2 μ m. La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

Correction liée à la présence d'impuretés et d'additifs

15. S'agissant de la teneur en espèces de $M < 1000$, il est généralement nécessaire d'apporter une correction pour tenir compte de la présence de composés particuliers non polymériques (par exemple des impuretés ou des additifs), sauf si la teneur mesurée n'excède pas un pour cent. Cette correction peut être réalisée par analyse directe de la solution de polymère ou de l'éluat de la chromatographie sur gel perméable. Au cas où l'éluat est trop dilué pour permettre une analyse après passage à travers la colonne, il convient de le concentrer. Il est éventuellement nécessaire d'évaporer l'éluat à sec puis de le redissoudre. La concentration de l'éluat sera effectuée dans des conditions telles qu'aucune modification de sa composition n'intervienne. Le traitement de l'éluat après la phase de chromatographie sur gel perméable est fonction de la méthode d'analyse utilisée pour la détermination quantitative.

Appareillage

16. Un appareil de chromatographie sur gel perméable se compose des éléments suivants :

- un réservoir à solvant
- un système de dégazage (si nécessaire)
- une pompe
- un amortisseur d'impulsions (si nécessaire)
- un système d'injection
- des colonnes de chromatographie
- un détecteur
- un débitmètre (si nécessaire)
- un système d'enregistrement et de traitement des données
- un récipient pour recueillir les solutions usées

17. On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis du solvant utilisé (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

Injection et système de pompage du solvant

18. Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observée. Le système de pompage du solvant doit, dans toute la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.

Colonne

19. Selon la nature de l'échantillon à tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par ex. taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1)(2)(3).

Plateaux théoriques

20. La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'élution est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'éthylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante :

$$N = 5.54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{or} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

où

N est le nombre de plateaux théoriques

V_e est le volume d'élution correspondant au maximum du pic

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$ est la largeur du pic à mi-hauteur

Efficacité de la séparation

21. Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante :

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10.Mx)}}{\text{section de la colonne}} \geq 6.0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

où

$V_{e,Mx}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire M_x .

$V_{e,(10.Mx)}$ est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure.

22. La résolution du système est généralement définie comme suit :

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

où,

V_{e1} , V_{e2} sont les volumes d'élution des deux polystyrènes étalons au maximum du pic.

W_1 , W_2 sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base.

M_1 , M_2 sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles doivent différer d'un facteur 10).

23. La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

Solvants

24. Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 pour cent de pureté). Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompé vers la colonne.

Régulation de la température

25. La température des composants internes critiques (boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux) doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

Détecteur

26. Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élué de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10 μ l, sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Toutefois, si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'éluion l'exigent, d'autres types de détecteurs peuvent être utilisés tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc...

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

27. On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

28. Pour chaque échantillon analysé, on réalisera deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

29. Il est nécessaire d'indiquer explicitement que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant à des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

30. Dans tous les cas, il est essentiel de déterminer aussi les données relatives aux blancs, ceux-ci étant traités de la même manière que les échantillons.

31. Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de $\log M_p$ (M_p représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis, pour la courbe dans son ensemble qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. On détermine la

portion de la courbe correspondant aux masses moléculaires inférieures à 1000 et on la corrige, si nécessaire, pour tenir compte des impuretés et des additifs. Les courbes d'élution sont généralement évaluées au moyen d'un système électronique de traitement des données. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

32. Si un polymère insoluble est retenu sur la colonne, sa masse moléculaire est vraisemblablement supérieure à celle de la fraction soluble et il faut en tenir compte pour éviter de surestimer la teneur en polymères de faible masse moléculaire. On trouvera en annexe des indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles.

33. La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du log M). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ, tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

Rapport

34. Le rapport d'essai doit comporter les renseignements suivants :

Substance à tester :

- renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés) ;
- description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

Dispositif expérimental :

- réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés ;
- pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection ;
- colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques de la colonne, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation, etc. ..., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées) ;
- nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système) ;
- informations sur la symétrie des pics ;
- température de la colonne, mode de régulation de la température ;
- détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette) ;
- débitmètre s'il y en a un (fabricant, principe de mesure) ;
- système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

Etalonnage du système:

- description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage ;
- précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc. ...) ;
- informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours des processus expérimentaux, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données ;

- toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes :
 - nom de l'échantillon
 - fabricant de l'échantillon ;
 - valeurs caractéristiques M_p , M_n , M_w , M_w/M_n des étalons fournies par le fabricant déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination ;
 - volume d'injection et concentration d'injection ;
 - valeur de M_p utilisée pour l'étalonnage ;
 - volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics ;
 - M_p calculée au maximum du pic ;
 - pourcentage d'erreur sur la M_p calculée et sur la valeur d'étalonnage.

Renseignements sur la teneur en polymères de faible masse moléculaire :

- description des méthodes d'analyse utilisées et de la manière dont les expériences ont été menées ;
- informations sur le pourcentage que représente la teneur en espèces de faible masse moléculaire (poids/poids) par rapport à l'ensemble de l'échantillon ;
- informations sur les impuretés, les additifs et les autres substances non polymériques en pourcentage pondéral de l'ensemble de l'échantillon.

Evaluation :

- évaluation en fonction du temps : toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de corrections, étalon interne, etc. ...) ;
- préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention ;
- indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analysé ;
- décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours ;
- décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon ;
- indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a ;
- indiquer le volume d'injection (μ l) et la concentration d'injection (mg/ml) ;
- mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable ;
- décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais ;
- préciser les intervalles d'erreur ;
- consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. et Bly, D.D. (eds.) (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley & 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, Pennsylvanie.

- (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, Pennsylvanie.

ANNEXE**INDICATIONS PERMETTANT DE CORRIGER LA TENEUR EN POLYMERES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE POUR TENIR COMPTE DES POLYMERES INSOLUBLES**

La présence d'un polymère insoluble dans un échantillon entraîne une perte de masse au cours de l'analyse par chromatographie sur gel perméable. Le polymère insoluble est irréversiblement retenu sur la colonne ou sur le filtre à échantillon lorsque la partie soluble de l'échantillon traverse la colonne. Si l'indice de réfraction différentiel (dn/dc) du polymère peut être estimé ou mesuré, il est possible d'estimer la masse que l'échantillon a perdue sur la colonne. Dans ce cas, on effectue une correction à l'aide d'un étalonnage externe du réfractomètre, avec des étalons dont on connaît la concentration et le dn/dc. Dans l'exemple qui suit, on utilise un étalon de poly(méthacrylate de méthyle).

L'étalonnage externe pratiqué lors de l'analyse des polymères acryliques consiste à analyser par chromatographie sur gel perméable une solution étalon de concentration connue de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofurane ; les résultats servent à calculer la constante du réfractomètre selon l'équation suivante :

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

où

K est la constante du réfractomètre (microvolts • secondes/ml)

R est la réponse de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (microvolts • secondes)

C est la concentration de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (mg/ml)

V est le volume d'injection (ml), et

dn/dc est l'indice de réfraction différentiel d'une solution de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofurane (ml/mg)

Les données suivantes caractérisent généralement un étalon de poly(méthacrylate de méthyle) :

$$R = 2937891$$

$$C = 1,07 \text{ mg/ml}$$

$$V = 0,1 \text{ ml}$$

$$dn/dc = 9.10^{-5} \text{ ml/mg}$$

La valeur de K résultante, $3,05.10^{11}$, est ensuite utilisée pour calculer la réponse théorique du détecteur, c'est-à-dire celle qu'on obtiendrait si 100 pour cent du polymère injecté était élué à travers le détecteur.