

Schnelle Flüssigchromatographie für die Kombinatorische Materialforschung



Harald Pasch

Kombinatorische Methoden sind hocheffiziente Methoden zur Schaffung von großen Substanzbibliotheken, z.B. mit variierender chemischer Zusammensetzung. Diese Substanzbibliotheken werden im sog. „High-Throughput Screening“ in Bezug auf ihre spezifischen Eigenschaften getestet. Dabei werden häufig parallele Testverfahren eingesetzt, die den zeitlichen Aufwand im Vergleich zur Messung einer Probe pro Zeiteinheit deutlich verkürzen. Kombinatorische Verfahren sind im Bereich der Pharma- und Bioforschung relativ weit fortgeschritten. Dies

hochkomplexe Materialien, die häufig neben der Molmassenverteilung eine chemische Heterogenität aufweisen. Um neue Materialeigenschaften bewerten zu können, müssen die verschiedenen Verteilungsfunktionen in Polymeren (Verteilungen nach der Molmasse, der chemischen Zusammensetzung, der Funktionalität und der Architektur) quantitativ bestimmt werden [4].

Für die Bestimmung der unterschiedlichen Polymerverteilungen sind flüssigchromatographische Techniken am besten geeignet. Die Gelpermeations-



Abb. 1: Größenvergleich einer langen konventionellen GPC-Säule mit einer kurzen PSS „High Speed“-Säule

Die Flüssigchromatographie von Polymeren ist traditionell eine langsame Analysenmethode mit typischen Messzeiten von 30 Minuten pro Probe. Für die Anwendung von Verfahren der Flüssigchromatographie in der kombinatorischen Materialforschung müssen diese Analysenzeiten deutlich reduziert werden. Mit neuen Trennmaterialien und Messverfahren kann die Messzeit in der Größenausschlusschromatographie auf etwa 2 min verringert werden. In der HPLC können Säulen mit kleinen Dimensionen und verbesserter Trennleistung eingesetzt werden. Im Vergleich mit konventionellen HPLC-Verfahren ist hier eine Zeitersparnis von bis zu 80 % realisierbar.

gilt bisher nicht in gleichem Maß für die Materialforschung. Erst in den letzten Jahren wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, kombinatorische Arbeitstechniken auch in den Bereich der Materialforschung im Sinne eines „schneller, besser, kosteneffektiver“ einzuführen [1–3].

Kombinatorische Methoden sind von besonderem Interesse für die Entwicklung von neuen oder verbesserten Polymermaterialien. Die große Variationsbreite bei Monomeren, Katalysatoren und Polymerisationstechniken führt zu einer unübersehbaren Vielfalt unterschiedlicher neuer Polymerstrukturen. Um Struktur-Eigenschaftsbeziehungen einer derartigen Produktvielfalt schnell und effektiv erstellen zu können, bieten sich kombinatorische Arbeitstechniken geradezu an.

Die Synthese einer großen Anzahl neuer Leitstrukturen ist jedoch nur der erste Schritt in einem kombinatorischen Versuchsaufbau. Ebenso wichtig wie die schnelle Synthese ist die schnelle Analytik der erhaltenen Probenreihen. Dies ist jedoch für Polymere deutlich schwieriger zu erreichen als für niedermolekulare Wirkstoffe. Synthetische Polymere sind

chromatographie (GPC oder SEC, size exclusion chromatography) ist die Standardmethode für die Analyse der Molmassenverteilung, während die Wechselwirkungschromatographie (HPLC, kritische Chromatographie) für die Bestimmung der chemischen Heterogenität eingesetzt wird [4]. Mit konventionellen Apparaturen benötigt man für ein chromatographisches Experiment (SEC, HPLC) bei ausreichender Trennleistung mindestens 30 min. Um mit kombinatorischen Arbeitstechniken kompatibel zu werden, muss diese Analysenzeit deutlich reduziert werden. Unter der Annahme, dass pro Tag 200 Zielverbindungen hergestellt werden, darf eine Analyse nicht mehr als 7 min in Anspruch nehmen, um alle Proben innerhalb desselben Tages zu analysieren. Entsprechend sind chromatographische Verfahren erforderlich, bei denen die Probe innerhalb von 2–4 min aufgetrennt werden kann [5,6].

Der vorliegende Beitrag gibt einen Überblick über verschiedene Möglichkeiten, chromatographische Trennungen zu beschleunigen. Es wird gezeigt, dass Trennungen mit guter Auflösung innerhalb von 5 min möglich sind.

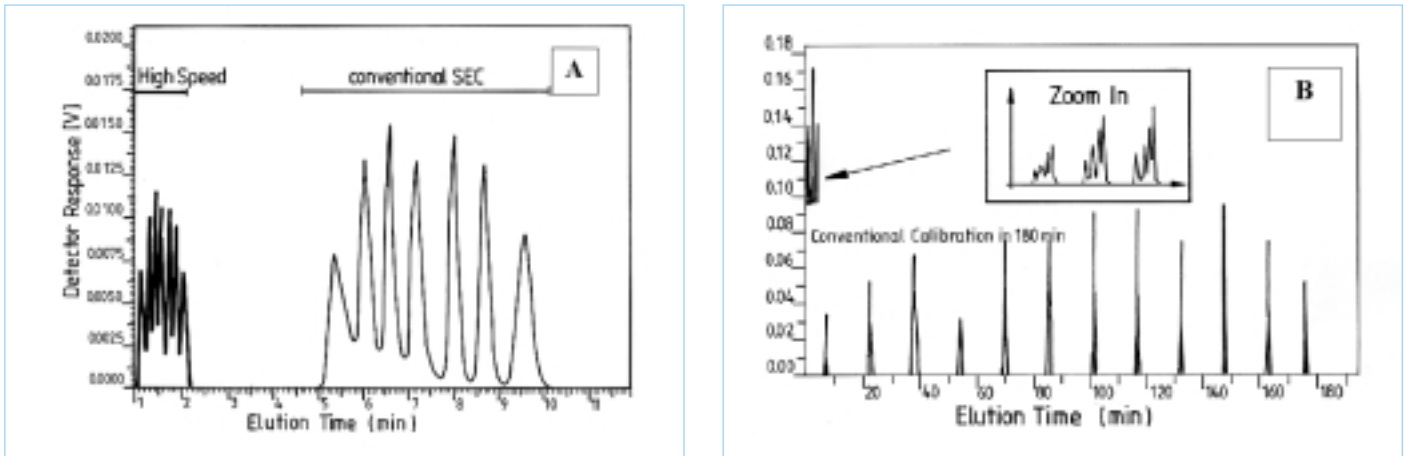


Abb. 2: Chromatogramme aufgenommen mit einer konventionellen GPC-Säule im Vergleich zu einer Hochdurchsatz-Säule unter identischen Bedingungen mit Polystyrolstandards in THF (A) und Vergleich einer 12-Punkt Polystyrol-Kalibration auf beiden Säulen (B); Säule: SDV 300x8 mm I.D. oder SDV 50x20 mm I.D., mobile Phase: THF

Experimenteller Teil

Chromatographisches System

Es wurde ein modulares chromatographisches System bestehend aus einer Waters Model 510 HPLC-Pumpe, einem Rheodyne Six-port-Injektionsventil mit einer 50 µl Probenschleife, einem Waters Model 410 Differentialrefraktometer und einem Waters Model 486 UV-Detektor verwendet. Die Datenaufnahme und -verarbeitung erfolgte mit dem Softwarepaket „PSS-2D-GPC-Software“ von Polymer Standards Service, Mainz.

Säulen

High-Throughput (HT)-SEC: konventionelle SDV (Styrol-Divinylbenzol) linear, 300x8 mm I.D. oder SDV linear XL, 50x20 mm I.D. beide von PSS GmbH, Mainz; Polyethylenoxide: Phenomenex Luna RP-18, 3 µm Partikelgröße, 30x4.6 mm I.D.; Epoxidharze: Macherey-Nagel Nucleosil 50-5, 5 µm Partikelgröße, 200x4 mm I.D., oder Phenomenex Luna Silica, 3 µm Partikelgröße, 30x4.6 mm I.D.

Mobile Phase. HT-SEC: THF; Polyethylenoxide: Methanol-Wasser 79:21 v/v; Epoxidharze: THF-Hexan 74:26 v/v. Alle Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität.

Proben. HT-SEC: Engverteilte Polystyrol-Eichstandards von PSS GmbH, Mainz; Polyethylenoxide: Mischungen von technischen Polyethylenoxiden der BASF AG, Ludwigshafen; Epoxidharze: technische Harze von Dow Deutschland, Rheinmünster.

Methoden für die Hochdurchsatz-GPC

Es gibt verschiedene Ansätze, die traditionell langsame GPC zu beschleunigen. Der Zeitbedarf der GPC ergibt sich aus den langsamen Diffusionsprozessen innerhalb der stationären Phase. Eine Beschleunigung von GPC-Messungen

kann erreicht werden, wenn entweder die Säulendimensionen oder die Art der stationären Phase verändert werden.

Die einfachste aber kostenintensivste Art, den Durchsatz in der GPC zu erhöhen, besteht darin, die Anzahl der GPC-Apparaturen zu erhöhen. Die Anzahl der gemessenen Proben erhöht sich proportional mit der Anzahl der Apparaturen. Ein wesentlicher Vorteil ist, dass die analytischen Methoden nicht verändert werden müssen. Andererseits ist klar, dass ein solcher Ansatz durch den verfügbaren Laborplatz, die nötigen Investitionen und die Unterhaltskosten beschränkt wird.

Ein Weg zur Senkung des Aufwands pro GPC-Messung besteht darin, die Säulendimensionen zu verringern. Dieser Weg wurde traditionell schon mit der Entwicklung von besseren Packungsmaterialien beschränkt. Allerdings ist heute die Trennleistung von GPC-Säulen auf einem Niveau, dass eine weitere Reduzie-

rung der Säulendimensionen zu einem deutlichen Verlust an Trennleistung führen würde. Die Reduzierung der Säulendimensionen führt zu erhöhtem Durchsatz aber zu geringerer Trennleistung [7–9]. Jedoch ergibt die Reduktion der Säulendimensionen um 50 % nur eine Erhöhung des Durchsatzes um den Faktor 2. Damit können wesentliche Zeiteinsparungen auf diesem Wege nicht erzielt werden.

Das Porenvolumen der stationären Phase ist einer der wesentlichen Faktoren, die die Trennleistung in der GPC beeinflussen. Eine Verringerung der Säulendimensionen bedeutet eine Verringerung des Porenvolumens und damit eine geringere Trennleistung. Damit kann dieser Ansatz lediglich ein Kompromiss für höheren Durchsatz sein. Für eine hohe Trennleistung sind GPC-Säulen erforderlich, die bei hohen Flußraten ein großes Porenvolumen und eine leichte Zugänglichkeit der Poren aufweisen. Diese müssen in der Lage sein, konventionelle Säulen eins-zu-eins zu ersetzen ohne die analytischen Methoden ändern zu müssen.

GPC-Säulen für einen hohen Durchsatz mit guter Trennleistung sind vor einiger Zeit von der Fa. Polymer Standards Service GmbH, Mainz, auf den Markt gebracht worden [10,11]. Mit diesen Säulen können Trennungen innerhalb von 2 min durchgeführt werden. Die PSS „High Speed“-Säulen haben zwei wichtige Eigenschaften: (1) sie verfügen über ein neues Packungsmaterial, das die beschränkte Zugänglichkeit der Poren überwindet und (2) sie verfügen über ein geändertes Aspektverhältnis (Verhältnis der Säulendimensionen). Es wurde gefunden, dass optimale Säulendimensionen einer Länge von 50 mm und einem Säulendurchmesser von 20 mm entsprechen, siehe ein Vergleich einer konventionellen GPC-Säule mit der PSS „High Speed“-Säule in Abbildung 1.

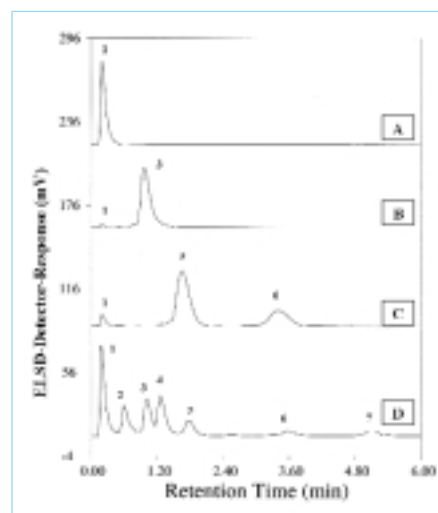


Abb. 3: Trennung von PEOs nach den Endgruppen durch LC-CC; (A) Polyethylenglycol, (B) technisches Octylphenoxy-PEO, (C) technisches C13/C15-PEO, (D) Mischung von verschiedenen PEOs; stationäre Phase: Phenomenex Luna RP-18, mobile Phase: Methanol-Wasser 79:21 v/v [20]

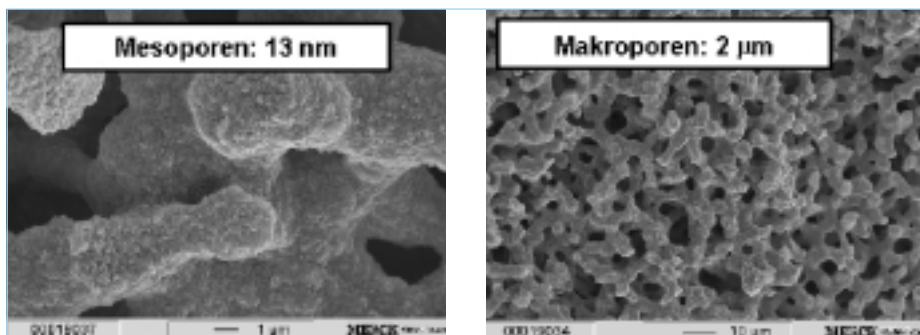


Abb. 4: Biporöse Struktur einer monolithischen stationären Phase [21]

Eine Überlagerung von GPC-Chromatogrammen bei identischem linearem Fluss ist in Abb. 2A dargestellt. Für die konventionelle Säule betragen die Säulendimensionen 300x8 mm I.D., während die Hochdurchsatz-Säule Dimensionen von 50 x 20 mm I.D. aufweist. Die Chromatogramme zeigen deutlich, dass mit der Hochdurchsatz-Säule Zeiteinsparungen von 80 % bei guter Trennleistung und Genauigkeit erreichbar sind.

Abb. 2B demonstriert die Zeitersparnis bei der Kalibration. Für eine 12-Punkt-Kalibration mit Polystyrolstandards werden auf der konventionellen Säule ca. 3 Stunden benötigt. Wird die Eichung jedoch mit sog. „Ready Cal“-Standards auf der Hochdurchsatz-Säule durchgeführt, sind lediglich 6 min für die komplette Eichung erforderlich.

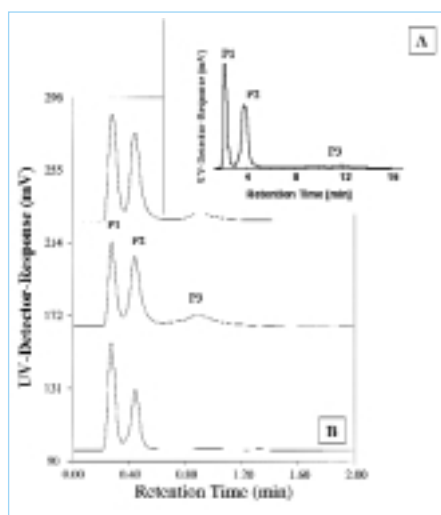


Abb. 5: Funktionalitätstrennung eines Epoxidharzes durch LC-CC; stationäre Phase: Nucleosil 50-5 mit 200 mm Säulenzahl (A) oder Phenomenex Luna Silica mit 30 mm Säulenzahl (B), mobile Phase: THF-Hexan 74:26 v/v [20]

Die Genauigkeit und Präzision der „High Speed“-Säulen sind in Tab. 1 für die Messung eines gut charakterisierten Polymerstandards dargestellt, der vorher durch konventionelle GPC (Referenz) analysiert wurde. Wie zu sehen ist, liegt die Standardabweichung (RSD) in einem Bereich, der auch mit konventionellen Säulen erhalten wird.

Methoden für die High-Throughput HPLC

Anders als bei der GPC, bei der die Trennleistung durch das Porenvolumen der stationären Phase bestimmt wird, ist bei der HPLC die Trennleistung eine Funktion der Wechselwerkeigenschaften der Oberfläche der stationären Phase. Eine hohe Trennleistung erfordert nicht zwingend eine große Oberfläche der stationären Phase. Wichtig ist das Vorliegen von stark wechselwirkenden Gruppen in Bezug auf die zu trennende Polymerprobe. Dementsprechend kann ein hoher Durchsatz mit guter Trennleistung bei der HPLC auf folgende Weise erreicht werden: (1) Erhöhung der Oberfläche der stationären Phase durch Verringerung der Partikelgröße und (2) Verwendung einer stationären Phase mit stark wechselwirkenden funktionellen Gruppen. HPLC-Techniken werden in der Polymeranalytik zur Bestimmung der chemischen Heterogenität oder der Funktionalitätsverteilung von komplexen Polymeren eingesetzt [4]. Eine Funktionalitätsverteilung ergibt sich z.B. durch gezielte Einbringung von funktionellen Gruppen in die Makromoleküle oder bei der Bildung von Defektstrukturen durch Nebenreaktionen bei der Polymerisation. In beiden Fällen müssen die Art und die

Konzentration der funktionellen Gruppen bestimmt werden.

Eine der wichtigsten Klassen von funktionellen Homopolymeren sind Alkyl- und Aryloxy-terminierte Polyethylenoxide (PEO). Diese Oligomere und Polymere werden als amphiphile Tenside eingesetzt; sie weisen eine hydrophile PEO-Polymerkette und eine hydrophobe Fettalkohol- oder Aryl-Endgruppe auf. Die Produkte werden häufig durch anionische Polymerisation von Ethylenoxid in der Gegenwart von Fettalkoholen mit unterschiedlicher C-Kettenlänge hergestellt und weisen dementsprechend unterschiedliche Endgruppen auf. Für die Bestimmung der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen ist es wichtig, die Funktionalitätsverteilung zu bestimmen.

Die Auftrennung von Polyethylenoxiden nach den Endgruppen kann durch Flüssigchromatographie am kritischen Punkt der Adsorption (LC-CC) erreicht werden [12,13]. Typischerweise wird die Trennung auf einer Umkehrphase RP-18 und einer mobile Phase aus Acetonitril-Wasser oder Methanol-Wasser durchgeführt. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Trennung ausschließlich nach den Endgruppen unabhängig von der Molmasse. Eine ausreichend gute Trennleistung wird auf einer RP-18 mit 200 mm x 4.6 mm I.D. Säulendimension und 5 μm Partikelgröße erreicht. Bei einer Flußrate von 1 ml/min beträgt die Analysenzeit pro Probe 30-40 min.

Für die Anwendung dieser Methode im High-Throughput Screening ist es erforderlich, dass dieselbe Trennleistung bei deutlich geringerer Analysenzeit erreicht wird. Dies ist möglich, wenn stationäre Phasen mit geringerer Partikelgröße eingesetzt werden. Mit geringerer Partikelgröße der stationären Phase erhöht sich deren Oberfläche und damit die Anzahl der wechselwirkenden Gruppen. Auf diese Weise erhöht sich auch die Trennleistung. In der folgenden High-Throughput-Anwendung wurde eine stationäre Phase RP-18 mit einer mittleren Partikelgröße von 3 μm eingesetzt. Die Säulendimensionen betragen 30 mm Länge und 4.6 mm I.D. Durch die geringere Säulenzahl ist der Rückdruck geringer und die Flußrate kann auf +3 ml/min erhöht werden.

Die Auftrennung unterschiedlicher technischer PEOs ist in Abb. 3 dargestellt. Während Polyethylenglycol als ein Peak eluiert (Abb. 3A), weisen technisches Octylphenoxy-PEO (Abb. 3B) und C₁₃/C₁₅-PEO (Abb. 3C) mehrere Peaks auf, die verschiedene Funktionalitäten anzeigen. Die Trennung einer Mischung von PEO mit unterschiedlichen Endgruppen zeigt Abbildung 3D. Jeder Peak

Tab. 1: Präzision der „High Speed“-Säule und Einfluß der Säulenzahl gemessen für einen Polystyrol-Eichstandard; Säule: SDV 50x20 mm I.D., mobile Phase: THF

Zahl der Säulen	Mn (g/mol)	RSD (%)	Mw (g/mol)	RSD (%)	Mp (g/mol)	RSD (%)
Referenz	47,500		93,300		85,300	
1	47,000	5.2	93,300	2.8	84,300	4.9
2	46,900	5.1	92,800	2.6	84,800	2.9
3	47,200	5.2	93,100	3.0	85,200	1.1

entspricht genau einer Funktionalität, alle Peaks sind fast basisliniengrennt. Die Zuordnung der Peaks ist wie folgt:

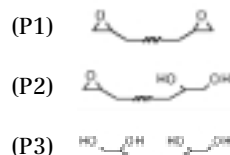
- (1) HO~~~OH (PEG) (2) HO~~~OC₁₀H₂₁
 (3) HO~~~OC₆H₄C₈H₁₇ (4) HO~~~OC₁₂H₂₅
 (5) HO~~~OC₁₃H₂₇ (6) HO~~~OC₁₅H₃₁
 (7) HO~~~OC₁₆H₃₃

Für das Erreichen einer Trennleistung, die vergleichbar mit einer konventionellen Säule ist, werden nur 6 min Analysenzeit benötigt. Dies entspricht einer Zeitersparnis von ca. 80 %. Ein ähnliches Resultat kann erreicht werden, wenn anstelle einer partikulären Säule eine monolithische stationäre Phase verwendet wird. Monolithische HPLC-Säulen werden aus zylindrischen Kieselgelstäbchen hergestellt. Sie weisen eine biporöse Struktur von definierten Makro- und Mesoporen auf, siehe Abb. 4. Derartige Materialien sind vor einiger Zeit von der Fa. Merck unter dem Namen Chromolith kommerzialisiert worden [14]. Andere Typen von monolithischen Phasen wurden von Buchmeiser et al. durch ringöffnende Metathese hergestellt und für die High-Throughput GPC und HPLC eingesetzt [15–17].

Eine der wichtigsten Typen von verzweigten Polymeren sind Epoxidharze. Die excellenten mechanischen und Haftungseigenschaften dieser Materialien ergeben sich aus dem Wechselspiel von Molmasse, Funktionalität und Verzweigung der Precursor-Polymere. Insbesondere die Funktionalitätsverteilung ist ein wichtiger Qualitätsfaktor. Nur Oligomere mit genau zwei Epoxidendgruppen sind in der Lage, beim Härten ein perfektes Netzwerk zu bilden. Oligomere mit nur einer oder ohne Epoxidendgruppen werden nicht in der erforderlichen Weise in das Netzwerk eingebaut und verschlechtern damit die Qualität des Materials. Dementsprechend kommt der Bestimmung der Funktionalitätsverteilung der Epoxidharze für die Qualitätsbewertung eine wichtige Rolle zu.

Die Auftrennung von Epoxidharzen nach der Funktionalität wird im vorliegenden Fall durch LC-CC durchgeführt [18,19]. Mit konventioneller Säulenteknologie benötigt eine derartige Trennung ca. 13 min, siehe Abbildung 5A.

Typischerweise werden in den Chromatogrammen drei Elutionspeaks erhalten, die den a,w-Biseoxy (P1), a-Epoxiw-diol (P2), and a,w-Bisdiol Oligomeren (P3) zuzuordnen sind.



Durch den Einsatz kurzer, hocheffizienter stationärer Phasen kann der Zeitbedarf pro Messung deutlich reduziert werden. Bei gleicher Trennleistung verkürzt sich die Analysenzeit auf 1,5 min, wenn ein 3 µm Silicagel verwendet wird, siehe Abbildung 5B. Die Säulendimensionen sind in diesem Fall 30 mm Länge und 4,6 mm I.D. Wie bei der langen Säule wird eine Basislinientrennung für alle Fraktionen P1, P2 und P3 erhalten. Die Zeitersparnis beträgt für diese Anwendung 90 %.

Zusammenfassung

Die Methoden der Flüssigchromatographie sind wichtige Arbeitsmittel für die Analyse von Polymeren bezüglich der Molmasse, der chemischen Zusammensetzung und der Funktionalität. Mit konventionellen stationären Phasen werden mindestens 30 min für die GPC- oder HPLC-Analyse einer Probe benötigt. Dieser Zeitaufwand ist für kombinatorische Arbeitstechniken zu hoch.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass es verschiedene Möglichkeiten zur Beschleunigung der GPC und der HPLC gibt. Die Analysenzeit in der GPC kann auf ca. 2 min reduziert werden, wenn die Trennungen mit Hoch-

durchsatz-Säulen durchgeführt werden. Diese Säulen weisen folgende Besonderheiten auf: (1) es werden neue Packungsmaterialien mit besseren Flußeigenschaften verwendet, (2) durch ein anderes Aspektverhältnis kann die Flußrate deutlich erhöht werden.

Die Analysenzeit in der HPLC kann durch den Einsatz von kleinen Säulen mit verbesserter Trennleistung reduziert werden. Mit solchen Säulen können Polyethylenoxide innerhalb von 6 min nach der Funktionalität getrennt werden. Für Epoxidharze können derartige Trennungen innerhalb von 2 min durchgeführt werden. Im Vergleich mit konventioneller Säulenteknologie sind demnach Zeiteinsparungen von mehr als 80 % möglich.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesminister für Wirtschaft für die finanzielle Förderung dieser Arbeiten über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (AiF) im Rahmen des AiF-Vorhabens Nr. 13350 (18/0-08).

Literatur bei den Autoren erhältlich.

Die Autoren

Harald Pasch
 Deutsches Kunststoff-Institut
 Schlossgartenstr. 6
 64289 Darmstadt
 hpasch@dki.tu-darmstadt.de

Peter Kilz
 Polymer Standards Service GmbH
 Postfach 3368
 55023 Mainz
 pkilz@polymer.de
 www.polymer.de