

Application of Field-Flow Fractionation Method for Polymer Characterization

The aim of Dissertation was to demonstrate applicability of asymmetric cross-flow field flow fractionation (A4F) to separation and molecular characterization of selected synthetic polymers and to separation of polymer dispersion according to particle size. Performance of A4F method was compared with size exclusion chromatography (SEC) with the aim to show advantages of A4F and to persuade potential users to switch – at least for the selected applications - from SEC to A4F. This was a rather difficult task because A4F has been so far almost unknown to researchers active in the field of synthetic macromolecules and also because SEC is enormously popular for its robustness, universality, speed, economy and repeatability. The only possibility is to precisely define the shortages of SEC and to fill the resulting niches left for other methods. The SEC drawbacks include not only shear degradation of ultra-high molar mass (UHMM) polymers and additional retention due to enthalpic interactions with the column packing but also for example reduced sample recovery of interacting macromolecules, band broadening phenomena, limited selectivity of separation and low sample capacity. Above problems of SEC should be either demonstrated experimentally or discussed more in detail quoting relevant literature. General problem with the wider application of new methods for molecular characterization of polymers – including the field-flow fractionation (FFF) procedures - is mainly the reluctance of most polymer scientists and also of some industrial researchers to invest time and means into introduction of novel approaches in order to provide more exact, comprehensive characterization of their polymers. A simple survey of literature devoted to polymer synthesis shows immediately that though SEC is very widely used (and misused...) method, only few researchers utilize universal calibration and multi-angle light scattering (MALS) detection - even for homopolymers where application of MALS is relatively easy and straightforward. Most authors directly apply polystyrene calibration and even fail to name the resulting values “polystyrene equivalent molar masses” (IUPAC terminology). Hydrodynamic chromatography (HDC) is another competitor of A4F method, especially for both ultra-high molar mass polymers and polymer dispersions. Therefore, HDC would deserve more attention in the Theoretical Part, and especially a discussion of its drawbacks and limitations.

An important application of A4F might be removal of macromolecules such as proteins from biological samples before HPLC analysis.

p. 9, 10 Degradation of UHMM macromolecules in SEC is mainly induced by shearing and not by high pressure itself. In SEC, swelled gels are practically no more used and gel bleeding problem was practically all over removed.

p. 23 The linear decrease of both flow and elution velocities within A4F channel necessitates a fully homogeneous and stable membrane. The semi-permeable membrane is generally considered a very important weak-point of A4F. It is supposed that with organic solvents the permeability of membranes for macromolecules of rather high molar mass, as well as macroscopic inhomogeneity and serviceable life span of membrane may represent even crucial problem of A4F, similar to those encountered in membrane osmometry. In the course of separation the pores of membrane can also be successively blocked by macromolecules. It is a pity that the discussion of membrane problems is practically absent. Specification, properties and even source of membrane(s) used are missing. The description "10 kD regenerated cellulose" is insufficient.

It would be helpful to give a list of all present producers of FFF and especially of A4F instruments and components including membranes.

Similarly as SEC suffers from degradation of ultra high molar mass fractions contained in polymer samples with medium high mean molar masses, A4F may produce wrong results for polymers medium high molar mass that contain oligomer fractions. The latter case is quite common in many industrial polymers – and SEC affords reliable data for such samples. Therefore, the effort to extend the applicable molar mass range of A4F to lower molar mass area is hardly comprehensible. This matter is mentioned in Conclusions but only little discussed in Thesis itself. Measurements with samples spiked with oligomers would allow quantification of this problem. Refractive index detector (RID) is the most important concentration detector in SEC. Evidently, MALS cannot manage without it, either. The application of RID brings about numerous problem; their discussion is missing. For some solvents, degassing represents a difficult problem. The two step eluent degassing is an interesting approach. If the mobile phase is degassed, air (oxygen) dissolved in sample will be monitored with RID as an extra "solvent peak". A blank experiment will exactly identify its position.

The process of focusing in A4F and its control should be carefully described. The text on p. 77 could hardly suffice for the potential A4F method users.

p. 56 The conclusion about "very simple and straightforward" correction of base line drift by subtraction of RID signal for blank experiment from the sample eluogram is rather surprising and contradicts the experience of numerous researchers involved in eluent and temperature gradient procedures of polymer liquid chromatography. Would you comment?

Selectivity of A4F separation is very high when calculated from the peak apexes. However, the peak fronting for some samples is remarkable (see for

example Figure 4-6). The peak fronting prevents the base line separation of some polymers with molar masses differing 10 times, where SEC gives unproblematic separations. It is a pity that the peak fronting increases with rising polymer molar mass and it is substantial for UHMM polymers, that is in the area where A4F may exhibit important advantages compared with SEC.

Efficiency of a liquid chromatographic system is based on measurements of retention volumes and peak widths of low-molecular model substances. This is not possible in A4F. As shown by several authors, the correlation between SEC column efficiency data assessed from low-molecular substances and polymers is not well defined.

Data in Table 4-7 indicate a very narrow molar mass distribution of PS standards; their dispersities determined with help of A4F are much lower than those determined by SEC. Can be the SEC band broadening responsible for the difference? Explanation of differences in shapes of eluograms by the chemical changes (oxidization) of THF definitively needs an independent proof. Testing and presentation of a rather new method should be accompanied with careful study of repeatability of measurements. The Thesis should contain clear recommendations.

In the opinion of reviewer, present Chapter 4.1 should follow present Chapter 4.2 because the optimized experimental conditions determined in Chapter 4.2 were applied in Chapter 4.1.

The improvements of performance of A4F apparatus accomplished in the course of work on Thesis are very valuable. They should be demonstrated with help of appropriate examples in the text. They should not be included into conclusions if not previous quantification.

When preparing publication(s) of results, please, substitute terms "polydispersity" by "dispersity" (new IUPAC recommendation), and "monodisperse" by "uniform" (IUPAC), substitute term "solvent" on p. 98 by "mobile phase" or "eluent", and "butylated hydroxytoluene" by "2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol". "Larger", not "higher" width. The names of Journals should be abbreviated according to SCI.

Thesis brings numerous interesting results. They show the strong and weak features of the A4F method. Thesis demonstrates the qualification of Candidate for independent scientific work. I do recommend accepting Thesis for the defense, and as a basis for granting the PhD degree.

Bratislava, June 1, 2010

Dušan Berek
Polymer Institute
Slovak Academy of Sciences
Bratislava

Recenzní posudek disertační práce Ing. Petra Lebedy *Application of Field-Flow Fractionation Method for Polymer Characterization.*

Tématem disertační práce je využití FFF (Field-Flow Fractionation) separační techniky pro charakterizaci polymerních materiálů. Struktura práce odpovídá standardnímu pojetí. V úvodní teoretické části jsou uvedeny stručně princip metody, její matematický a fyzikální popis. Deklarované cíle práce jsou zaměřeny na řešení uspořádání experimentu a studium podmínek na průběh a výsledky měření. Předmětem studia byly polymery s velmi vysokou molekulovou hmotností. Dalším komplikujícím faktorem bylo větvení polymerních řetězců.

V průběhu studia provedl doktorand spousty náročné experimentální práce a shromáždil velký objem dat, která také velmi pečlivě vyhodnotil. Po formální stránce je práce vypracovaná velmi pečlivě. Co poněkud postrádám, je hlubší analýza získaných frakcionačních dat (výpočet distribučních funkcí).

K práci mám několik poznámek a dotazů.

- 1) Na základě čeho dělí použitá frakcionační technika polymerní molekuly? Je to hmotnost částic a jejich hydrodynamický průměr, nebo pouze hydrodynamický průměr?
- 2) V Zimmově grafu je nesprávně vynesena hodnota $1/M_w$. Správná hodnota odpovídá průsečíku extrapolovaných koncentračních a úhlových závislostí.
- 3) Nejsem si zcela jistý, zda dobře rozumím co reprezentují závislosti MALS na elučním čase nebo objemu. Je to směrnice závislosti Kc/R_θ na úhlu měření v Debyeově grafu (obr. 1-17, str. 39) pro jednotlivé eluční časy za předpokladu, že je koncentrace polymeru zanedbatelná? Je-li tomu tak, pak je $MALS \approx \langle r_g^2 \rangle$ a nerozumím proč je jeho závislost na elučním čase jiná než závislost RMS.
- 4) Je obecně známo, že úhlové závislosti světla rozptýleného polymerem s vysokou molekulovou hmotností, širokou distribucí jejich velikostí a větvením jsou silně zakřivené. Zimmův diagram je silně deformován. To vede ke značné nespolehlivosti stanovených hodnot $\langle r_g^2 \rangle$. Úhlová závislost v obr. 1-17 je téměř dokonalá přímka. Bylo tomu tak ve všech případech? Jestliže ano, čím si to vysvětlujete?
- 5) Podle prezentovaných grafů usuzují, že separace, prakticky ve všech studovaných případech, probíhala normálním mechanismem. Jedinou prezentovanou výjimkou je akrylová disperze v obr. 4-21 na straně 77. Proč dochází ke změně separačního mechanismu v průběhu měření? V počáteční fázi probíhá dělení normálním mechanismem a pak v závěrečné fázi se mechanismus mění na stérický.
- 6) Na straně 97 je naznačeno, že hodnota exponentu závislosti rozměru poly(fenylen acetylenového) řetězce na jeho hmotnosti by mohla naznačovat, že je tento řetězec tuhý. Teoretická hodnota tohoto exponentu pro ohebné polymerní řetězce v dobrých rozpouštědlech se pohybuje mezi 0,5 až 0,8. Limitní hodnota pro tuhé tyčinky je 2.
- 7) Proč se v obr. 4-54 a 4-61 objevují diskontinuity v závislosti molekulové hmotnosti na elučním objemu?

Doktorand Ing. Petr Lebeda prokázal, že je schopen samostatně řešit náročné vědecké experimenty. Práci jsem prostudoval a prohlašuji, že splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci studijním řádem University Pardubice. Doporučuji ji k obhajobě.

V Praze 6.6.201

A. Sikora

Doc. Ing. Antonín Sikora, CSc.

Oponentní posudek disertační práce Ing. Petra Lebedy na téma „Application of field-flow fractionation method for polymer characterization”

Předložená disertační práce se nejen zabývá velmi aktuální tematikou v oblasti charakterizace různorodých polymerních materiálů pomocí nové techniky, ale navíc, nad rámec obecně očekávaných závěrů, představuje a jednoznačně potvrzuje možnost využití této techniky v chemicko-technologické praxi. Výstižně porovnává standardně užívanou techniku GPC a její omezení s prokázanou možností užití A4F jako alternativy a pro mnohé polymery jedinečné techniky pro charakterizaci molekulárně hmotnostních distribucí i stupňů větvení. Úspěšně navazuje na práce a laboratorní praxi v tomto oboru, zvláště pak posunuje možnosti využití této techniky do oblasti komerčně užívaných polymerů a potvrzuje možnost použití pro standardní organické mobilní fáze, kterou bývá v současnosti ve většině případů THF.

Je tedy bezpochyby velkou zásluhou této práce, že prostřednictvím jednoznačných závěrů vnáší nové poznatky do tohoto směru polymerní chemie. Vlastní práce má typické uspořádání požadované pro tento typ publikací a je logicky dělena do obvyklých částí počínaje úvodem, teoretickým přehledem, experimentální částí, zakončena diskusí a závěrem. V samotném závěru jsou shrnuty dříve nepřekonané problémy, které neumožňovaly plné využití této techniky pro rutinní analýzy. Přínosem této práce je, že tato úskalí nejen pojmenovává, ale ve většině případů i řeší. Věřím, že i omezená schopnost separace v oblasti oligomerů bude v budoucnu uspokojivě vyřešena. Práce představuje první ucelenou studii tohoto typu v oblasti asymetrické tokové frakcionace A4F s aplikací na roztoky polymerů v THF.

Z výše uvedeného výčtu je patrné, že se jedná o práci velmi rozsáhlou, náročnou na provádění experimentů i následnou interpretaci shromážděných dat. Výsledky byly několikrát publikovány v renomovaných časopisech a prezentovány na odborných konferencích, což potvrzuje aktuálnost problematiky i zodpovědné zpracování a presentaci shromážděných výsledků.

Po obsahové stránce nemám k práci zásadních připomínek. Mé poznámky a připomínky se týkají spíše formálního provedení. Věřím, že tyto nejasnosti budou během obhajoby vyjasněny:

1. Na straně 12 se píše, že separace se odehrává v „inherently inert device“. Tato inertnost je uvažována pro všechny typy rozpouštědel a polymerů, nebo pouze pro systémy, které byly studovány v této práci?

2. Na straně 29 v třetím odstavci má být pravděpodobně „considered material“ místo „consider material“.
3. Na straně 32 je v druhém odstavci zmiňována nutnost užití různých solí, pokud je A4F užíván pro vodnou mobilní fázi. V konvenční chromatografii tyto soli zabraňují adsorbci vzorku na pevnou fázi nebo upravují pH. Jak je tomu v tomto případě, kdy stacionární fáze neexistuje a přesto analýza tento přídavek vyžaduje?
4. Na začátku kapitoly 1.2.5 se píše „...a lot of publications are based on experiments ...“. Zde by měl být uveden odkaz na tyto zmiňované publikace.
5. Na straně 36 se v odstavci 1.4.1 píše, že „MALLS measurements produced weight average molar mass“. Patrně se myslelo, že tato měření M_w poskytují nebo umožňují stanovit, určitě ho neprodukuje.
6. Na straně 42 je v posledním odstavci nesrozumitelná formulace „branching is compensated for by the increase of RMS“. Patrně se jedná o překlep v případě „for by“.
7. Na straně 43 ve třetím odstavci vypadlo „of“ mezi slovy „comprises of monomer, water, ...“.
8. Na straně 47 je nesrozumitelná formulace na konci prvního odstavce 1.6.3, kde se píše „... PS calibration a priori provides incorrect results for any polymer but polystyrene“. Místo „but“ mělo být asi jiné slovo.
9. Na straně 50 byl „polymer solutions filtered by filters“ a ne „with filters“.
10. Je správná hodnota v tabulce 3-4 na straně 55 ve druhém sloupcu na prvním řádku? 210 mikrometrů se zdá být příliš vysokou hodnotou v kontextu popisovaných vlastností?
11. Na straně 63 by bylo vhodnější uvést, že „difference between isocratic and gradient measurements is in time of analysis“ místo „analysis time“.
12. Na straně 70 je popisován vliv rychlosti toku na separaci. Pro tento účel byl vybrán „spacer“ 350 mikrometrů silný. Proč právě tato tloušťka?
13. V kapitolách 4.2.8 a 4.2.9 se popisuje vztah nastříkovaného objemu a množství vzorku. Jako závěr se uvádí, že separace není nastříkovaným objemem ovlivněna, vliv může mít pouze nastříkované množství polymeru. Dalo by se uvažovat o využití této techniky v semipreparativním, nebo preparativním uspořádání po příslušné modifikaci kanálu? Zejména „volný průchod“ nízkomolekulárních frakcí by mohl být pro purifikaci polymerů ve větším měřítku jedinečným.

14. Na straně 89 je potvrzena výtečná reprodukovatelnost separací. Přesto se dovoluji zeptat, proč nejsou v zákrytu i vrcholky fraktogramů. Nejnižší se zdá být první nástřík. Může docházet k „zakoncentrování systému“?
15. Na straně 95 by poslední věta měla začínat „However as is seen“
16. Na straně 99 je pro akrylátové disperze pouze konstatováno, že byly připraveny. Zcela schází popis toho, kdo a jak je připravil.
17. Na stejné straně 99 by druhá věta předposledního odstavce měla začínat „ Conditions of separation were as follows: ..“.
18. Na straně 106 Je uprostřed odstavce věta. It means that behavior of smaple MMA25/BA75 must indicate something different. Co se myslí tím „ something different“? V další větě by mělo být „ ... acrylate was prepared and separated both by A4F and SEC methods“.
19. Na straně 107 by poslední věta měla začínat „ To demonstrate this ability...“.
20. Popis zobrazovací techniky pro stanovení velikosti částic pomocí elektronové skenovací mikroskopie na straně 108 je dosti kuriózní. Mám na mysli větu, že vzorek byl odeslán.... :

Závěrem chci konstatovat, že práce je dostatečně kvalitní a posouvá kupředu naše poznání v dané oblasti. Přínosné bude nepochybně využití jejich výsledků v chemickotechnologické praxi. Tímto doporučuji tuto práci bez dalších připomínek přijmout k obhajobě.

V Pardubicích 20.5. 2010



Ing. Martin Kaška Ph.D.