

Chromatographie d'exclusion stérique multi-détection

Détermination des grandeurs macromoléculaires

Luc Picton et Didier Le Cerf

Résumé	Cet article présente le principe et les applications de la chromatographie d'exclusion stérique pour la caractérisation de polymères en solution et décrit l'intérêt d'utiliser des détecteurs spécifiques en sortie d'éluion, à savoir la diffusion de la lumière statique multi-angle, la diffusion quasi élastique de la lumière et la viscosimétrie. Ces détecteurs permettent de s'affranchir d'un étalonnage et d'obtenir des informations sur la taille et la conformation des chaînes polymères en solution via les rayons de giration et hydrodynamique.
Mots-clés	Polymères, chromatographie d'exclusion stérique, diffusion de la lumière, viscosimétrie, conformation.
Abstract	Size exclusion chromatography with multi-detectors on line This paper presents principle and applications of size exclusion chromatography for the characterization of polymers in solution, and describes the benefits of using specific detectors, namely multi-angle static light scattering, quasi-elastic light scattering and viscometry. These detectors help overcome a calibration and get information about the size and conformation of polymer chains in solution via the radii of gyration and hydrodynamic.
Keywords	Polymers, size exclusion chromatography, light scattering, viscometry, conformation.

Polymères en solution

Les polymères sont constitués de macromolécules résultant de l'assemblage covalent de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers d'unités monomère. Solubilisées dans un solvant thermodynamiquement favorable, ces macromolécules présentent alors des dimensions importantes typiquement de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres, bien supérieures à celles de petites molécules. Au-delà de leur taille, ces macromolécules s'organisent dans le solvant autour de conformations spécifiques. En absence d'interactions particulières de type polymère/polymère et en présence d'interactions polymère/solvant favorables, les macromolécules adoptent le plus souvent une conformation dite en pelote statistique (« random coil »). Cette pelote est globalement sphérique et remplie de solvant (*figure 1a*). Plus importantes seront les interactions polymère/solvant, plus gonflée sera la pelote. La macromolécule peut alors être visualisée comme une chaîne d'arpenteur présentant un grand nombre de segments de rigidité (de quelques unités monomère) articulés autour d'un grand nombre de points de rotation.

Dans certains cas (souvent en milieux aqueux), la conformation en pelote laisse place à des conformations plus spécifiques telles que des sphères plus compactes en conformation globulaire (*figure 1b*), comme dans le cas des protéines par exemple avec des repliements spécifiques de séquences d'acides aminés plus hydrophobes, ou encore des bâtonnets rigides (*figure 1c*) résultant d'interactions spécifiques polymères/polymères comme pour certains polysaccharides adoptant dans certaines conditions de solvata-tion des conformations hélicoïdales (xanthane par exemple).

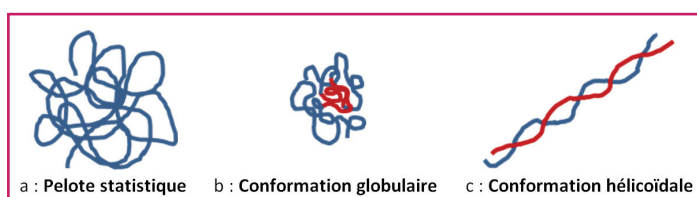


Figure 1 - Différents types de conformation de macromolécules en solution.

La taille d'une macromolécule en solution est ainsi définie par son volume hydrodynamique (V_h) et il apparaît dès lors que V_h dépendra de nombreux facteurs :

- nombre d'unités monomère (degré de polymérisation, DP) définissant la masse molaire de la macromolécule ;
- rigidité intrinsèque des enchainements de monomères (longueur du segment de rigidité) ;
- aptitude du solvant à pénétrer la pelote ;
- interactions spécifiques polymère/polymère.

En d'autres termes, la relation entre taille et masse molaire dépend du couple polymère/solvant à une température donnée. Dans les années 1950, beaucoup de travaux ont permis de mieux comprendre ces notions, notamment ceux de Fox et Flory [1]. Ces travaux ont principalement démontré que la taille était reliée à la masse molaire, mais aussi à la conformation des macromolécules en solution.

Au-delà de ces considérations, il faut ajouter également qu'à de très rares exceptions comme les protéines, les macromolécules présentent une distribution, souvent gaussienne, plus ou moins large de leurs tailles (ou masses molaires). Ceci résulte des méthodes de synthèse mises en jeu par la chimie humaine ou la nature. Il sera dès lors difficile

d'exprimer ces grandeurs sans utiliser des notions de moyennes permettant de définir par exemple les masses molaires moyennes en nombre \overline{M}_n et en masse \overline{M}_w (éq. 1) :

$$M = \frac{\sum N_i M_i^{n+1}}{\sum N_i M_i^n} \quad (1)$$

avec $M = \overline{M}_n$ si $n = 0$ et $M = \overline{M}_w$ si $n = 1$.

On en déduit alors la dispersité des masses molaires \mathcal{D} (éq. 2) :

$$\mathcal{D} = \overline{M}_w / \overline{M}_n \quad (2)$$

Une valeur de \mathcal{D} égale à 1 implique que le polymère présente des chaînes de taille identique ($\overline{M}_n = \overline{M}_w$), on dit qu'il est monodisperse. Le plus souvent, \mathcal{D} est supérieur à 1, alors l'échantillon est dit polydispersé et la répartition sera d'autant plus large que la valeur s'écartera de 1.

L'accès aux masses molaires moyennes est un enjeu important dans le domaine de la chimie et physicochimie des polymères. Plusieurs techniques utilisant des solutions de polymère en régime dilué (macromolécules isolées et donc caractérisables) sont à notre disposition avec leurs avantages et leurs inconvénients. Certaines sont très performantes, souvent basées sur la thermodynamique des solutions. L'osmométrie, peu utilisée aujourd'hui, permet l'accès aux seules \overline{M}_n et voit ses performances se réduire quand les masses molaires augmentent, ce qui n'est pas particulièrement adapté aux polymères. La diffusion statique de la lumière devient très sensible pour les fortes masses molaires, ce qui est un atout dans le domaine des polymères ; toutefois son formalisme peut devenir complexe et il ne permet l'accès qu'aux seules \overline{M}_w . La détermination de la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) est aisément accessible par des mesures de viscosités capillaires en utilisant la relation de Huggins par exemple (voir éq. 8 ci-après). Toutefois, l'accès aux masses molaires moyennes (viscosimétriques) n'est possible que par l'intermédiaire de la relation de Mark-Houwink ($[\eta] = KM^a$, voir éq. 11 ci-après) via la connaissance des paramètres K et a inhérents à un couple polymère/solvant à une température donnée. Ces paramètres sont accessibles dans les « handbooks » pour peu que le système ait déjà fait l'objet d'une parution scientifique.

Ainsi la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) apparaît donc comme une des rares techniques susceptibles de permettre l'accès simultané à M_n et M_w , et donc à la dispersité des masses molaires. Sa mise en œuvre est relativement aisée moyennant une bonne courbe d'étalonnage. Ceci explique la grande popularité de cette technique tant en recherche fondamentale qu'appliquée. Toutefois, pour palier à certaines limites et améliorer les performances de la SEC, des apports en multi-détection se sont développés ces dernières années.

Chromatographie d'exclusion stérique

Les techniques de chromatographie permettant la séparation et/ou l'analyse de solutés sont le plus souvent basées sur les différences d'affinité entre les différents solutés, la phase stationnaire et les conditions de solvation. Dans le cas de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC, pour « size exclusion chromatography » – l'utilisation de l'acronyme CES est fortement déconseillé), il est au contraire recherché des conditions dans lesquelles les solutés ne présentent aucune affinité avec la phase stationnaire et de très bonnes affinités avec le solvant. Le principe repose sur l'idée

de tamis moléculaire et de la séparation selon la taille des macromolécules en solution. Il est alors possible de séparer un mélange de polymères de tailles distinctes ou encore de déterminer la distribution des tailles au sein d'une population de polymères. La phase stationnaire consiste en une structure macroporeuse (matrice de polymère réticulé dont la structure est variable en fonction du type de colonne choisie selon le solvant, la nature des polymères à analyser...) dans laquelle les solutés macromoléculaires pourront pénétrer ou non en fonction de leur taille propre au regard de la taille des pores (figure 2).

Les macromolécules les plus petites disposent d'un volume poreux (donc d'un volume d'élution) plus important que leurs homologues de tailles plus grandes pour lesquelles certains volumes de pores en interdisent l'accès. La séparation apparaît donc dans l'ordre des tailles décroissantes. La détection peut être assurée par des techniques variables permettant de remonter aux concentrations des fractions éluées, l'UV et la réfractométrie différentielle (« differential refractometric index », DRI) étant les techniques de détection les plus courantes. Cette technique permet le fractionnement préparatif si on dispose de colonnes pouvant séparer de grandes quantités de matières (chromatographie préparative). Plus classiquement, cette technique sera utilisée pour l'analyse (chromatographie analytique) et permettra l'accès aux grandeurs macromoléculaires telles que les masses molaires moyennes en nombre et en masse comme nous le verrons ci-après. Dans ce cas, l'utilisation de colonnes plus petites, pour lesquelles on cherchera la meilleure résolution dans le temps le plus court, sera privilégiée avec des systèmes hautes pressions que le marché rend de plus en plus performants. On choisira le type de phase stationnaire en fonction du solvant, de la nature du polymère et de la gamme de taille dont on envisage la séparation. Pour une colonne d'exclusion donnée, les tailles de solutés accessibles à la séparation sont liées à l'encadrement des tailles de pores proposées par la phase stationnaire. Si la taille du soluté est trop petite (zone 1, figure 2) ou trop grande (zone 3, figure 2), la séparation n'apparaît pas discriminante, nous ne sommes plus dans les gammes optimales de séparation. Dans la zone 2 de la figure 2, une variation linéaire du logarithme des masses molaires en fonction du temps (ou du volume d'élution) est mise en évidence. On peut alors, si on dispose d'étalons polymères de même nature (même conformation) que le polymère à analyser et de tailles bien définies (si possible de distribution étroite), réaliser une courbe d'étalonnage de type masse molaire vs temps d'élution. Il devient alors possible d'affecter à une fraction i (élue à un temps t_i ou volume V_i) du polymère à analyser, une concentration C_i (ou un nombre de moles N_i), obtenue par la réponse du détecteur et une masse molaire M_i

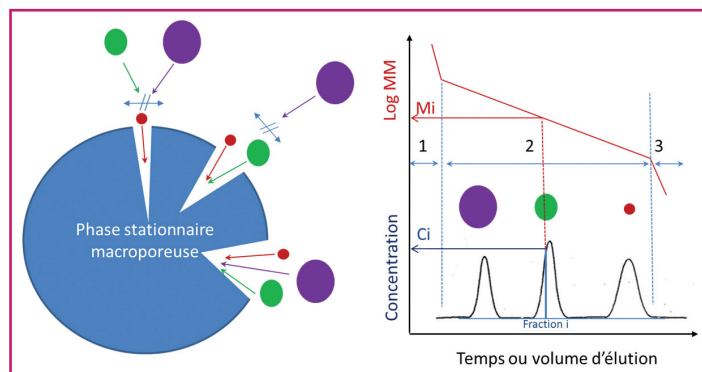


Figure 2 - Principe de l'exclusion stérique.

correspondant à la courbe d'étalonnage en masse molaire (figure 2).

Ainsi, à l'aide de l'expression (éq. 1), on remonte aisément non seulement aux masses molaires moyennes en nombre et en masse de l'échantillon à analyser, mais aussi à la dispersité des masses molaires \mathcal{D} (éq. 2).

Il convient pourtant de rappeler la limite principale de la SEC. En effet, l'équivalence entre masse molaire du polymère à analyser et étalon ne peut être envisagée que dans le cas de conformation en solution identique. En d'autres termes, il faut que l'étalon et le polymère présentent la même masse molaire pour le même volume hydrodynamique (à même volume d'élution). La seule possibilité d'obtenir des masses molaires moyennes vraies consiste donc à établir une courbe d'étalonnage avec des polymères étalons de même nature chimique et de même topologie que le polymère à analyser, dans le même solvant, avec les mêmes colonnes et à même température. Dans le cas contraire, les masses molaires obtenues devront être considérées comme « relatives » à l'étalon. Elles pourront toutefois être utilisées avec cette précaution pour comparer de façon relative, par exemple, plusieurs lots de polymères identiques issus de conditions de synthèse différentes.

En tout état de cause, une fraction de polymère et d'étalon élués au même volume d'élution présenteront le même volume hydrodynamique. C'est sur la base de cette évidence que Benoit *et coll.* ont proposé en 1967 d'utiliser comme étalonnage, non pas la masse molaire, mais le produit de la viscosité intrinsèque et de la masse molaire $([\eta] \cdot M)$ qui est directement proportionnel au volume hydrodynamique selon Flory [1] :

$$M \times [\eta] \propto Vh$$

Ce nouvel étalonnage, appelé étalonnage universel de Benoit, permet de remonter à la masse molaire de n'importe quel polymère avec n'importe quel étalon (rigidité différente, ramifié ou linéaire...) [2]. La condition est alors de connaître à la fois la masse molaire et la viscosité intrinsèque des étalons (mais aussi du polymère à analyser), ce qui peut être en partie facilité par la connaissance des relations de Mark-Houwink (éq. 11) (voir plus loin).

Multi-détection

Couplage SEC/MALS

L'idée maîtresse qui anime la multi-détection associée à la SEC consiste à pouvoir s'affranchir de l'étalonnage. Parmi les techniques mentionnées ci-dessus, la diffusion statique multi-angle de la lumière (« multi-angle light scattering », MALS) est probablement l'une des plus performantes. En pratique, il s'agit de mesurer l'intensité diffusée par les polymères en solution pour différentes concentrations dans le régime dilué et à différents angles (éq. 3) :

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda_0^2} R_g^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \dots \right) + 2A_2C + \dots \quad (3)$$

où K est une constante optique :

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \cdot \left(\frac{dn}{dC}\right)^2 \cdot \frac{1}{Na} \quad (4)$$

avec n_0 l'indice de réfraction du milieu, λ_0 la longueur d'onde du rayonnement, dn/dC l'incrément d'indice de réfraction,

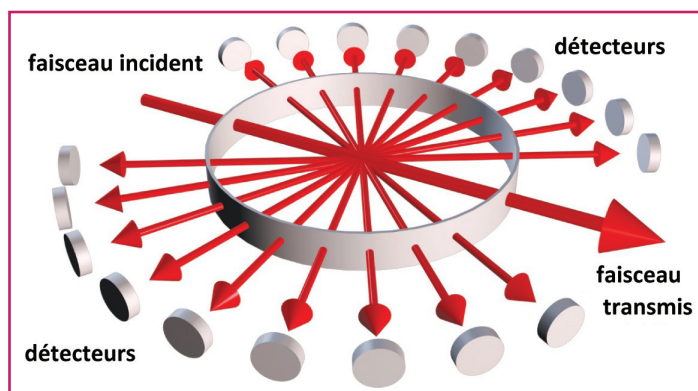


Figure 3 - Représentation schématique de la cellule de mesure de diffusion de la lumière multi-angle en ligne (Courtoisie © Wyatt Technology Corp.).

Na le nombre d'Avogadro, et où C est la concentration en polymère, ΔR_θ le rapport de Rayleigh lié à l'intensité diffusée par le polymère à un angle θ donné, M_w la masse molaire en masse, R_g le rayon de giration, A_2 le second coefficient du Viriel.

Une double extrapolation de $KC/\Delta R_\theta$ à concentration et angle nuls permet alors l'accès à M_w , A_2 et R_g . Pour pouvoir accéder à R_g , il faut que la diffusion de la lumière soit anisotrope (c'est-à-dire qu'elle présente une variation de l'intensité diffusée en fonction de l'angle, encore appelée dépendance angulaire). Une telle condition est généralement obtenue si la taille du polymère en solution est suffisante au regard de la longueur d'onde (λ_0) de la source laser (généralement pour $R_g > \lambda_0/20$, soit environ 20-30 nm en lumière rouge).

Notons que la diffusion de la lumière nécessite toutefois de connaître l'incrément d'indice de réfraction (dn/dC) disponible dans les tables des « handbooks » ou par sa mesure relativement aisée.

La mise en ligne de la diffusion de la lumière au sein d'un circuit de chromatographie liquide (couplage SEC/MALS) a longtemps été le verrou principal. Dans les années 1990, l'invention par la société Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, E.-U.) d'une cellule cylindrique en quartz, percée d'un canal permettant à la fois la circulation de l'éluant mais aussi du faisceau laser, et la disposition de photodiodes placées autour de cette cellule a permis de lever ce verrou (figure 3) [3].

Dans le système en ligne, chaque petite fraction de polymère élué sortant de la colonne de SEC est analysée instantanément par la réponse du détecteur de concentration massique (UV ou DRI) et par la mesure de l'intensité diffusée par les photodiodes placées autour de la cellule. Ainsi, pour chaque fraction (i) éluée de concentration (C_i) très faible (quasiement extrapolée à 0, éventuellement corrigée du A_2 (éq. 3), on dispose de la dépendance angulaire, qui elle-même extrapolée à angle nul (éq. 3) donne accès à M_i et R_{gi} . L'ensemble des résultats M_i , R_{gi} des fractions éluées de polymères permet alors, via l'équation (1), d'accéder directement à M_n , M_w , R_{gn} , R_{gw} et \mathcal{D} .

La pente (x) de la relation bilogarithmique entre R_g et M (de type $R_g \sim M^x$) permet également d'obtenir des informations quant à la conformation des polymères en solution ; x sera proche de 0,6 pour une conformation en pelote statique (figure 1a), proche de 0,3 pour une conformation globulaire (figure 1b), ou bien proche de 1 pour une conformation de type bâtonnet rigide (figure 1c).

Pour illustrer ce couplage SEC/MALS, nous proposons la caractérisation d'un polysaccharide d'origine végétale, la gomme arabique ou gomme d'acacia, produit dans les

régions subsahariennes par les *Acacias senegal* ou *seyal*. Ce polysaccharide anionique, très ramifié et amphiphile, présente une structure complexe constituée principalement d'unités AG (à base d'arabinose, de galactose mais aussi d'acide galacturonique, de rhamnose...), d'unités AGP (AG liés à des protéines plutôt hydrophobes) et des glycoprotéines [4-7]. Les gommes d'acacia ont été, et sont encore, très étudiées ; elles sont aussi particulièrement utilisées dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agent stabilisant et émulsifiant dans les sodas ou les jus de fruits par exemple.

La figure 4a montre les profils obtenus en réfractométrie (courbe bleue) et en diffusion de la lumière (ici à 90°, courbe rouge). On distingue une première population éluée

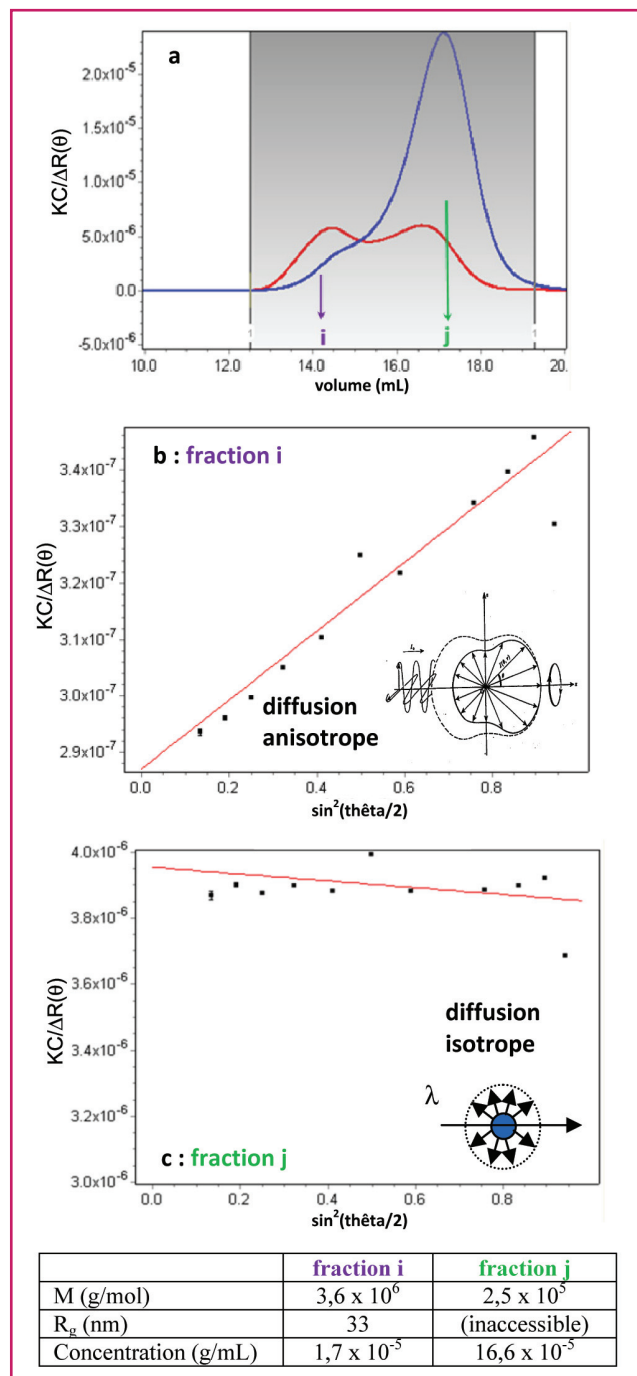


Figure 4 - Couplage SEC/MALS de la gomme arabique en solution aqueuse à 5 g/L en milieu NaCl 0,1 mol/L (figure 4a, en rouge : signal LS à 90° ; en bleu : signal RDI).

minoritaire, puis une seconde majoritaire. La figure 4b présente la dépendance angulaire obtenue pour une fraction i (très faible concentration de l'ordre de $1,7 \times 10^{-5}$ g/mL), prise au sein de la première population. L'extrapolation à angle nul donne une masse molaire (inverse de l'ordonnée à l'origine) de l'ordre de $3,6 \times 10^6$ g/mol ainsi qu'un rayon de giration (proportionnel à la pente de la dépendance angulaire, diffusion anisotrope) de l'ordre de 33 nm.

Choisissons maintenant d'observer une fraction j éluée au sein de la seconde population (figure 4c). Comme pour la fraction i, nous obtenons la masse molaire, ici de l'ordre de $2,5 \times 10^5$ g/mol. Par contre, l'intensité diffusée ne varie pas avec l'angle d'observation (diffusion isotrope), la pente de la dépendance angulaire, quasi nulle, ne permet plus l'accès au rayon de giration. La taille des macromolécules éluées en j est trop petite au regard de la longueur d'onde du laser source ($\lambda \sim 700$ nm). Notons que la masse molaire et la taille plus faibles de la fraction j éluée après la fraction i sont en accord avec la séparation par ordre de tailles décroissantes de la SEC.

La figure 5 montre les distributions des masses molaires (a) et des rayons de giration (b) pour lesquels les plus petits R_g ne sont pas accessibles. Les M_n et M_w obtenues, via l'équation 1, sont respectivement de 2,8 et $6,5 \times 10^5$ g/mol et \bar{D} est de l'ordre de 2,3.

Le couplage SEC/MALS permet ainsi l'accès aux grandeurs principales vraies des masses molaires moyennes (M_n et M_w) et à leur dispersité (\bar{D}) sans étalonnage préalable. Outre les performances de séparation des colonnes, la limite principale du couplage repose donc ici sur l'inaccessibilité aux tailles (R_g) si la macromolécule diffusante est trop petite (ici < 20 nm environ).

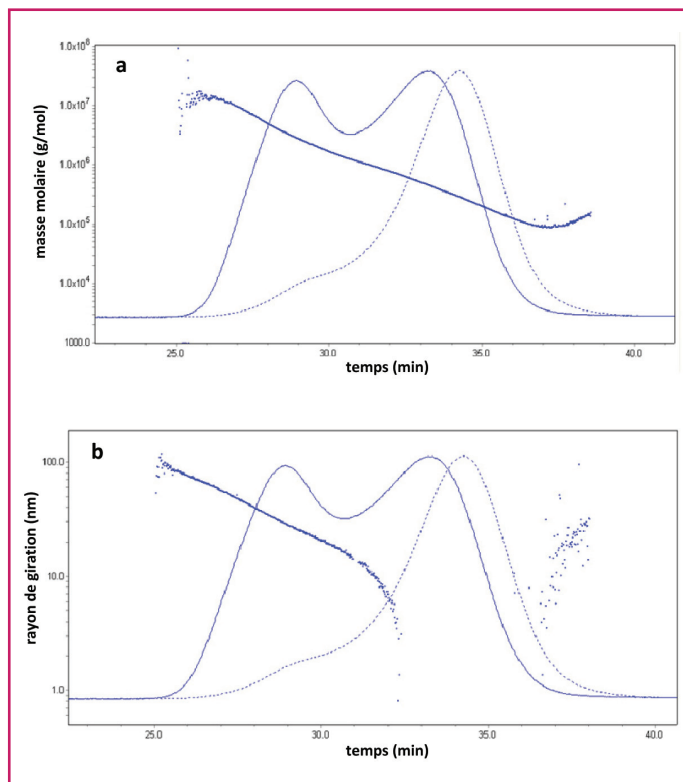


Figure 5 - Couplage SEC/MALS : distribution des masses molaires (a) et des rayons de giration (b) de la gomme arabique en solution aqueuse à 5 g/L en milieu NaCl 0,1 mol/L (trait plein : signal LS à 90° ; trait pointillé : signal RDI).

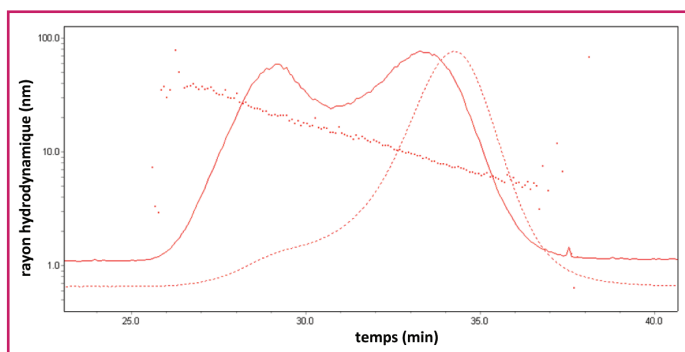


Figure 6 - Couplage SEC/MALS/QELS : distribution des R_h de la gomme arabique en solution aqueuse NaCl 0,1 mol/L à 5 g/L (trait plein : signal LS ; trait pointillé : signal RDI).

Couplage SEC/MALS/QELS

Une solution consiste alors à utiliser la diffusion dynamique ou quasi élastique de la lumière (« dynamic » ou « quasi-elastic light scattering », respectivement DLS et QELS en anglais). Cette approche permet également l'accès à la taille de la macromolécule en solution par la détermination du rayon hydrodynamique R_h qui correspond globalement au rayon de sa sphère équivalente (R_g correspond plutôt à la position statistique des segments de chaînes par rapport au centre de masse, R_g et R_h ne sont donc pas équivalents). On mesure ici, sur des temps très courts, les fluctuations temporelles de l'intensité diffusée (à un angle donné) qui sont la conséquence des mouvements browniens de la particule diffusante. Le traitement du résultat par une fonction d'auto-corrélation permet l'accès au coefficient de diffusion (D_t) de la particule diffusante qui pourra ensuite être relié à R_h par la relation de Stokes-Einstein (équ. 5) [8].

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_t} \quad (5)$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité du milieu solvant.

L'intérêt majeur repose ici sur le fait que les R_h sont accessibles tant que l'intensité diffusée est suffisante. On peut ainsi atteindre des R_h proches du nanomètre. L'inconvénient est que dans le cas d'une solution contenant de nombreuses macromolécules de tailles différentes, la déconvolution du signal (provenant des D_t de toutes les particules diffusantes) est parfois délicate. Cet aspect est supprimé si les tailles sont fractionnées et séparées au préalable, comme après une étape de chromatographie d'exclusion stérique par exemple. Il est ainsi possible de coupler la SEC avec la diffusion statique multi-angle et dynamique de la lumière (couplage SEC/MALS/QELS). Pour ce faire, l'un des angles du détecteur MALS sera détourné (via une fibre optique) au détecteur QELS. La figure 6 illustre ce couplage SEC/MALS/QELS pour approcher la distribution des R_h de la gomme arabique étudiée.

Cette fois-ci, contrairement à la distribution des R_g (figure 5b) pour laquelle la mesure ne permettait pas d'atteindre des valeurs inférieures à 20 nm, les R_h sont accessibles jusqu'à 5 nm environ sur l'ensemble du chromatogramme.

Couplage SEC/MALS/viscosimétrie

Il est également possible maintenant de coupler une détection viscosimétrique, basée sur des mesures fines de différences de pression tout au long de l'élution, à l'aide d'un

dispositif de type pont de Wheatstone [9]. Cette technique permet ainsi de remonter à la viscosité spécifique (η_{sp} , (équ. 6)) de chaque fraction éluée issue de la séparation stérique. Connaissant la concentration (via le détecteur UV ou DRI), il devient dès lors assez facile de remonter à la viscosité réduite (η_{red} , (équ. 7)), et donc à la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) par l'intermédiaire de l'équation de Huggins en régime dilué (équ. 8) [10]. $[\eta]$ peut ainsi être déterminée pour chacune des fractions éluées, pour lesquelles la concentration très faible peut être considérée comme quasi nulle. En utilisant une relation du type de l'équation 1, il est ainsi possible d'accéder aux viscosités intrinsèques moyennes en nombre ou en masse ($[\eta]_n$ et $[\eta]_w$ respectivement) :

$$\eta_{sp} = \eta/\eta_0 \quad (6)$$

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/C \quad (7)$$

$$\eta_{red} = [\eta] + K_h[\eta]^2C \quad (8)$$

où η est la viscosité de la solution polymère et η_0 la viscosité du solvant, $[\eta]$ la viscosité intrinsèque, C la concentration en polymère et K_h la constante de Huggins.

La détermination de $[\eta]$ permet également d'accéder au volume hydrodynamique V_h par l'intermédiaire de la relation de Einstein-Simha (équ. 9) :

$$V_h = \frac{[\eta] \cdot M}{\nu \cdot N_a} \quad (9)$$

où ν représente un paramètre de conformation qui vaut 2,5 pour un volume sphérique, permettant alors l'accès à R_h (équ. 10).

$$R_h = \left(\frac{3[\eta]M}{4\pi 2.5N_a} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (10)$$

Notons que dans le cas où la conformation n'est plus sphérique, la détermination de ν devient délicate.

La connaissance des distributions des viscosités intrinsèques ($[\eta]$) et des masses molaires (M) permet également de tracer la relation bilogarithmique entre ces deux grandeurs qui n'est autre que la relation de Mark-Houwink (équ. 11) :

$$[\eta] = KM^a \quad (11)$$

où K et a sont deux constantes ; a correspond à un paramètre conformationnel du polymère en solution dans un solvant donné à une température donnée ($a = 0,5$: conformation compacte et sphérique à la limite de la précipitation (condition Θ) ou structures hyper branchées ; $0,5 < a < 0,8$: conformation en pelote statistique ; $a > 0,8$: conformation rigide (bâtonnet)).

L'accès en une seule injection aux paramètres de la relation de Mark-Houwink constitue un progrès indéniable puisque sans le couplage, il était nécessaire de fractionner l'échantillon par SEC préparative, puis de déterminer pour chaque fraction ainsi isolée et purifiée, la masse molaire par diffusion statique de la lumière et la viscosité intrinsèque (par mesures capillaires par exemple). L'ensemble de ces étapes représentait un temps très important.

Le couplage SEC/MALS/viscosité est illustré par la caractérisation du carboxyméthylpullulane (CMP) qui est un dérivé anionique d'un polysaccharide neutre et flexible, le pullulane (enchaînement α -(1-6) d'unités α -(1-4)-maltotriose) produit par une levure *Aureobasidium pullulans* [11]. L'échantillon a été hydrolysé au préalable pour en diminuer la masse molaire moyenne et mettre ainsi en évidence les performances de la détection viscosimétrique. Le couplage SEC/MALS donne ainsi des masses molaires M_n et M_w

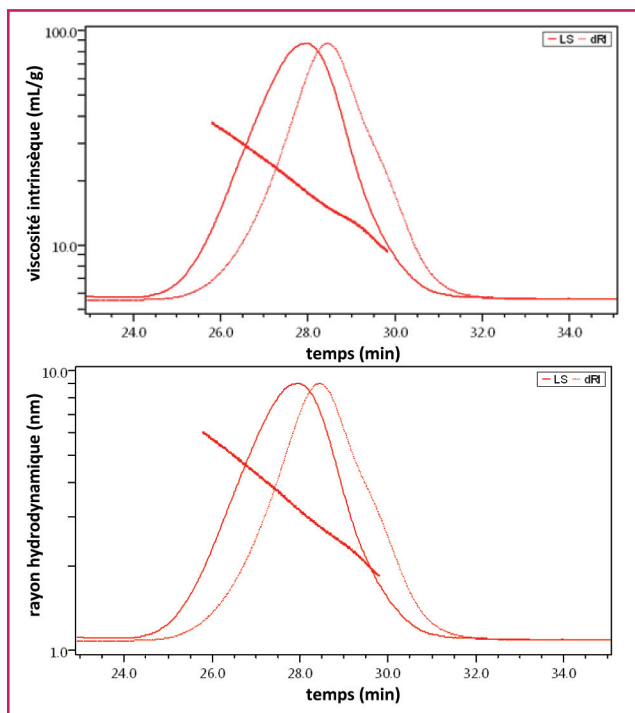


Figure 7 - Couplage SEC/MALS/viscosimétrie, distribution des $[\eta]$ (a) et des R_h (b) du CMP en solution aqueuse NaCl 0,1 mol/L.

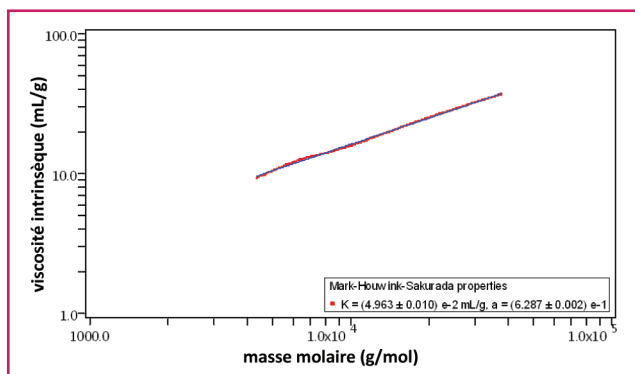


Figure 8 - Couplage SEC/MALS/viscosimétrie, relation de Mark-Houwink du CMP en solution aqueuse NaCl 0,1 mol/L.

de 9 et $11,5 \times 10^3$ g/mol respectivement (avec $\bar{D} = 1,3$). La figure 7 illustre la distribution des viscosités intrinsèques et des rayons hydrodynamiques avec une excellente précision.

Les grandeurs moyennes en masses donnent $[\eta]_w = 17 \text{ mL/g}$ et $R_{hw} = 3 \text{ nm}$. Les R_h sont obtenus sur la base d'une conformation sphérique (ici une pelote statistique). Pour valider cette hypothèse, il suffit de tracer la relation de Mark-Houwink (éq. 11) comme illustré figure 8 qui indique bien un coefficient a de l'ordre de 0,6 en accord avec une conformation de type pelote statistique en bon solvant.

Conclusion

La SEC est une technique d'analyse (mais aussi préparative) intéressante basée sur la séparation stérique des polymères en solution. Elle permet l'accès aux grandeurs moyennes en masse et en nombre ainsi qu'à la dispersité des masses molaires (à la condition de disposer d'un

étalonnage réalisé avec des étalons de même conformation en solution). Ce dernier point constitue la limite principale de cette technique qui peut être palliée grâce à l'ajout en ligne d'un détecteur de diffusion de la lumière statique multi-angle (MALS) qui permet l'accès en temps réel et simultané aux masses molaires des fractions éluées et donc aux grandeurs moyennes. Si la taille des macromolécules est suffisante (supérieure à 20 nm environ), la diffusion de la lumière anisotrope permet aussi la détermination des rayons de giration. Dans le cas de polymères de tailles plus faibles, l'ajout en ligne d'un détecteur de diffusion dynamique ou quasi-élastique de la lumière (QELS) permet l'accès aux rayons hydrodynamiques jusqu'à des tailles de quelques nanomètres.

Enfin, si la ligne de chromatographie est aussi équipée d'un détecteur viscosimétrique, l'accès aux viscosités intrinsèques et aux R_h devient possible avec également la détermination des paramètres de Mark-Houwink qui donnent de précieuses informations quant à la conformation des macromolécules étudiées en solution.

Références

- [1] Flory P.J., *Principles of polymer chemistry*, Cornell Univ. Press, New York, **1953**.
- [2] Grubisic Z., Rempp P., Benoit H., A universal calibration for gel permeation chromatography, *J. Polym. Sci. Part C: Polymer. Lett.*, **1967**, 5, p. 753.
- [3] Wyatt P.J., Light scattering and the absolute characterization of macromolecules, *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 272, p. 1.
- [4] Renard D., Lavenant-Gourgeon L., Ralet M.C., Sanchez C., *Acacia senegal* gum: continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges, *Biomacromolecules*, **2006**, 7, p. 2637.
- [5] Sanchez C., Schmitt C., Kolodziejczyk E., Lapp A., Gaillard C., Renard D., The acacia gum arabinogalactan fraction is a thin oblate ellipsoid: a new model based on small-angle neutron scattering and ab initio calculation, *Biophys. J.*, **2008**, 94, p. 629.
- [6] Renard D., Garnier C., Lapp A., Schmitt C., Sanchez C., Structure of arabinogalactan-protein from acacia gum: from porous ellipsoids to supramolecular architectures, *Carbohydr. Polym.*, **2012**, 90, p. 322.
- [7] Picton L., Bataille I., Muller G., Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation, *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 42, p. 23.
- [8] Edward J.T., Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation, *J. Chem. Educ.*, **1970**, 47, p. 261.
- [9] Haney M.A., A new differential viscometer, *Am. Lab.*, **1985**, 17, p. 41.
- [10] Huggins M.L., The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration, *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, 64, p. 2716.
- [11] Ali G., Rihouey C., Larreta-Garde V., Le Cerf D., Picton L., Molecular size characterization and kinetics studies on hydrolysis of pullulan by pullulanase in an entangled alginate medium, *Biomacromolecules*, **2013**, 14, p. 2234.



L. Picton

Luc Picton (auteur correspondant) et Didier Le Cerf sont professeurs des universités, Université de Normandie*.



D. Le Cerf

* Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, INSA Rouen, Université de Normandie, CNRS, PBS, F-76000 Rouen.
Courriel : luc.picton@univ-rouen.fr