

# Méthodes de séparation analytiques

Chromatographie SEC

## Introduction

- ⇒ La chromatographie d'exclusion stérique (SEC: Size Exclusion Chromatography) est une technique complémentaire à la chromatographie HPLC.
- ⇒ La SEC est dédiée à l'analyse des molécules dont les masses molaires sont généralement supérieures à  $2000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .
- ⇒ La SEC est aussi connue sous les termes chromatographie par perméation de gel (GPC) et chromatographie par filtration sur gel (GFC).
- ⇒ Lorsque les macromolécules sont très polaires et hydrosolubles, on parle de chromatographie par filtration sur gel alors que lorsqu'elles sont faiblement polaires et organosolubles, on parle de chromatographie par perméation de gel.
- ⇒ L'interprétation des données chromatographiques nécessite l'utilisation de standards dont la masse molaire est connue précisément, car les logiciels transforment souvent les grandeurs chromatographiques (temps de rétention ou volume de rétention) en distribution de masses molaires.
- ⇒ Comme l'HPLC, la SEC peut être réalisée de façon analytique ou à des fins préparatives. Dans ce dernier cas, les pompes et colonnes utilisées sont dimensionnées en conséquence.

## Chromatographie SEC

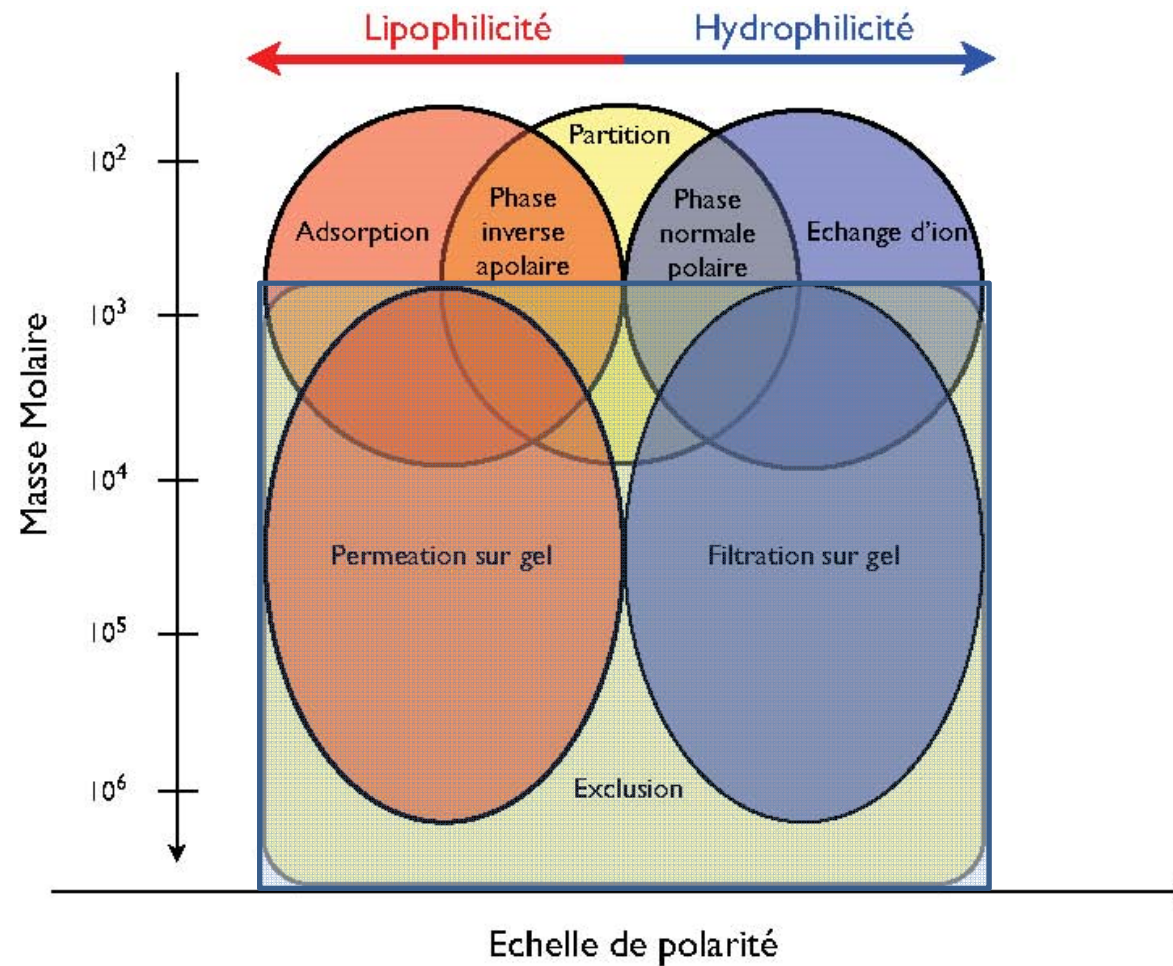


Chromatographie SEC Agilent

## Chromatographie SEC

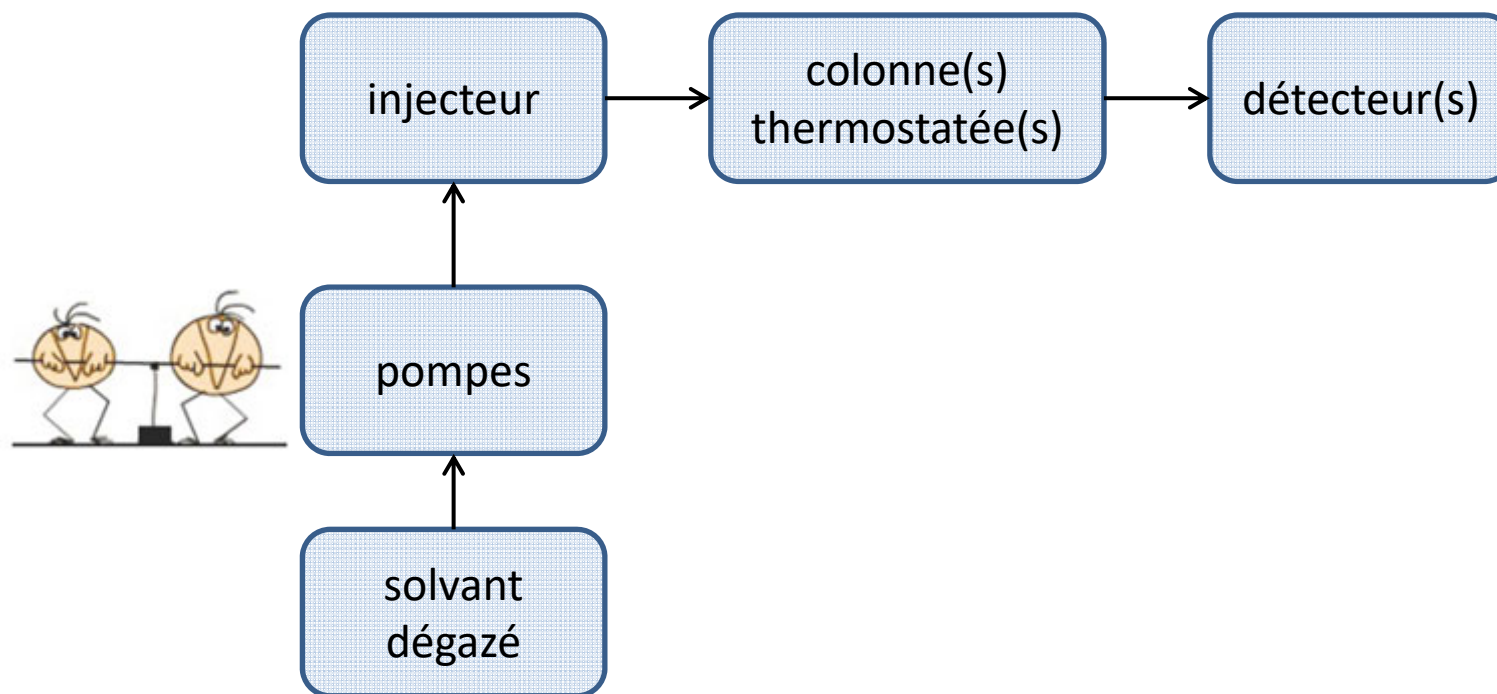


## Domaine de la chromatographie SEC



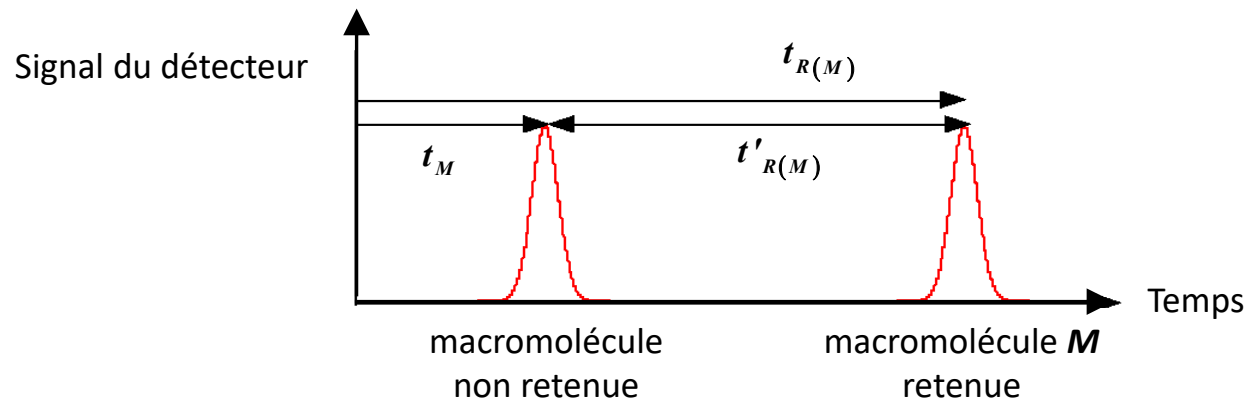


## Principe de la chromatographie HPLC



⇒ L'éluant est en général constitué d'un seul solvant.

⇒ Une chromatographe SEC génère un chromatogramme en temps:



⇒ En SEC le soluté non retenu est communément appelé: soluté totalement exclu.

⇒ Les chromatogrammes peuvent aussi être convertis en volume de rétention.

## Eluant

⇒ L'éluant est en général constitué d'un seul solvant organique ou aqueux. L'éluant est choisi en fonction de la nature des macromolécules à séparer (hydro- ou organosolubles), de la nature de la phase stationnaire et du ou des détecteur(s) utilisé(s).

## **Pompes**

- ⇒ Les pompes SEC sont utilisées avec des pressions plus basses que celles utilisées en HPLC. Les pressions appliquées sont de l'ordre de 2 à 80 bars avec un maximum de 100 bars.
- ⇒ Les débits des pompes sont adaptés aux colonnes SEC utilisées ainsi qu'à leur nombre. En présence d'une seule colonne, les débits sont en général de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  et peuvent tomber à  $0,5\text{-}0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  lorsque l'on a 3 colonnes en série.
- ⇒ Des séparations peuvent être réalisées avec des débits allant jusqu'à  $3\text{-}4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  et une pression d'environ 220 bars. Dans cette approche, la séparation est réalisée à l'aide d'une seule colonne avec une phase stationnaire spécifique.

## **Injecteurs**

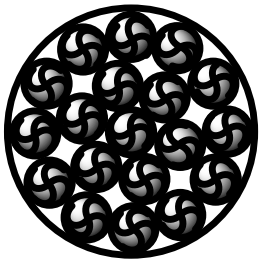
- ⇒ Les injecteurs sont des vannes haute pression manuelles munies d'une boucle d'injection de volume calibré. Les injecteurs peuvent être automatiques, à vannes motorisées, avec passeur d'échantillons.
- ⇒ Dans le cas d'injecteurs automatiques, le système est munit des mêmes boucles d'injection.



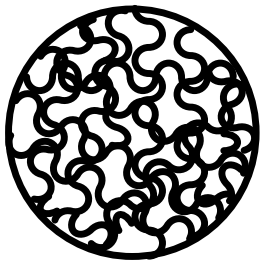
## La colonne chromatographique: caractéristiques physiques

- ⇒ Les colonnes chromatographiques se présentent sous la forme d'un tube d'acier. Les colonnes standards font 30 cm de longueur et 7,5 mm de diamètre interne. Les débits de phase mobile sont de l'ordre de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .
- ⇒ Les particules constituant le gel de phase stationnaire font entre 3 et 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les particules constituant la phase stationnaire engendrent une perte de charge  $\Delta P$  dans la colonne obéissant à la loi de Darcy.
- ⇒ Les particules de la phase stationnaire présentent des pores dont les diamètres s'étendent entre 4 et 200 nm. Le diamètre des pores est défini par le taux de réticulation du gel.
- ⇒ Les phases stationnaires doivent résister à l'effet d'écrasement dû aux fortes pressions imposées par les pompes et à des températures de plus de  $100^\circ\text{C}$ .
- ⇒ On parlera de perméation de gel (GPC) lorsque la phase stationnaire est un polymère organique hydrophobe tel que le polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) et que l'éluant est un solvant organique.
- ⇒ On parlera de filtration sur gel (GFC) lorsque la phase stationnaire est un polymère hydrophile polyhydroxylé (naturel ou synthétique) et que l'éluant est une phase aqueuse.

- ⇒ On adapte en général une précolonne en amont de la colonne pour préserver cette dernière. Il s'agit d'une courte colonne de quelques cm de longueur ( $\approx 5$  cm), remplie de la même phase stationnaire que celle de la colonne utilisée.
- ⇒ Les colonnes sont garnies de particules sphériques de quelques micromètres de diamètre et d'une porosité de quelques centaines d'Angström ou d'un solide monolithe poreux constituant la phase stationnaire:



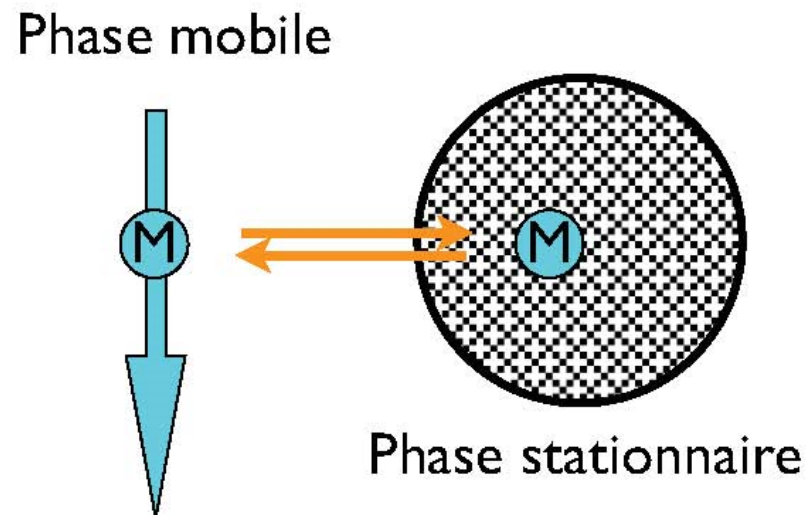
⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes de gel poreux.



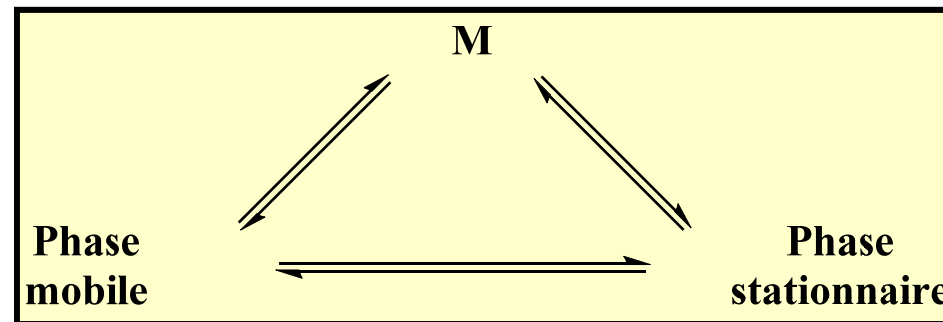
⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme d'un solide monolithe poreux.

## La colonne chromatographique: principes de rétention

- ⇒ La SEC est fondée sur la rétention sélective de macromolécules  $M$  en fonction de leur taille. La phase stationnaire est constituée d'un gel poreux.
- ⇒ Il s'agit d'un partage des macromolécules entre la phase mobile libre et la phase mobile immobilisée dans les pores de la phase stationnaire.
- ⇒ Le principe de rétention est donc basé sur la différence de pénétration des macromolécules dans les pores de la phase stationnaire. Comme dans toute chromatographie en phase liquide, on observe des interactions à 3 corps: macromolécule, phase mobile et phase stationnaire.



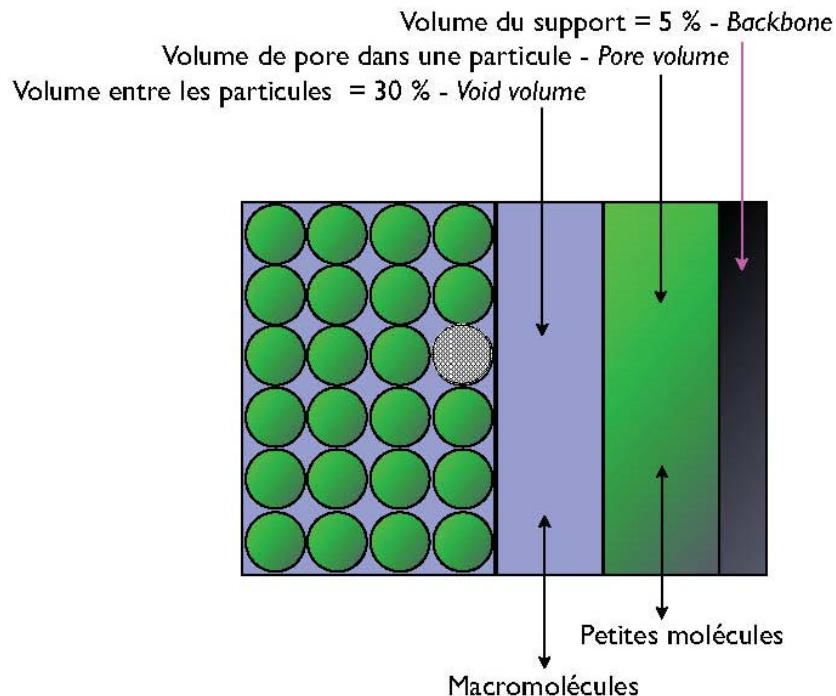
⇒ Les principes de rétention thermodynamiques sont décrits ci-après:



⇒ Le paramètre le plus important en chromatographie c'est le facteur de rétention  $k'$ . Ainsi, pour une macromolécule  $M$  on peut écrire:

$$\left. \begin{aligned}
 k'_{(M)} &= K_{D(M)} \Phi_{SM} = K_{D(M)} \frac{V_S}{V_M} \\
 k'_{(M)} &= \frac{t'_{R(M)}}{t_M} = \frac{t_{R(M)} - t_M}{t_M} = \frac{V'_{R(M)}}{V_M} = \frac{V_{R(M)} - V_M}{V_M}
 \end{aligned} \right\} V_{R(M)} = V_M + K_{D(M)} V_S$$

- ⇒ Le volume mort (volume de phase mobile effective)  $V_M$  est assimilé au volume compris entre les particules de la phase stationnaire  $V_i$  (volume interstitiel).
- ⇒ Le volume de la phase stationnaire effective  $V_S$  est assimilé au volume des pores  $V_p$ .
- ⇒ Le volume de phase mobile physique est:  $V_{mo} = V_i + V_p$ .
- ⇒ Le volume de la colonne est:  $V_c = V_{mo} + V_{st}$ .



$$\begin{aligned}V_M &= V_i \\V_S &= V_p \\V_{mo} &= V_i + V_p \\V_c &= V_{mo} + V_{st} = V_i + V_p + V_{st}\end{aligned}$$

⇒ On s'aperçoit ici que le volume de phase stationnaire apparent est différent du volume de phase stationnaire physique. Le volume de phase stationnaire apparent  $V_{st}'$  est:  $V_{st}' = V_p + V_{st}$ .

⇒ La relation chromatographique de base devient:

$$V_{R(M)} = V_M + K_{D(M)} V_S \Rightarrow V_{R(M)} = V_i + K_{D(M)} V_p$$

⇒ Si la taille des macromolécules est plus grande que celle des pores de la phase stationnaire, alors ces dernières ne séjournent que dans le volume de phase mobile effective. Leur volume de rétention sera:

$$V_{R(M)} = V_M = V_i \Rightarrow K_{D(M)} = 0$$

⇒  $K_{D(M)} = 0$ : toutes les macromolécules constituant l'échantillon sont totalement exclues en raison de leur taille et de la taille des pores de la phase stationnaire. L'expression thermodynamique de  $K_{D(M)}$  engendre que d'un point de vue mathématique on devrait écrire  $K_{D(M)} \rightarrow 0$  car une exponentielle n'est jamais nulle.

⇒  $V_M$  est en général mesuré à l'aide d'une macromolécule de forte masse molaire comme du bleu de dextran ( $2 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) ou du dextrane ( $5 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) qui sont des polyholosides.



⇒ Si la taille des macromolécules est plus petite que celle des pores de la phase stationnaire, alors elles se partageront entre les phase mobiles et stationnaires. Leur volume de rétention sera:

$$V_{R(M)} = V_i + K_{D(M)} V_p$$

⇒ Le volume de rétention maximal sera atteint pour  $K_{D(M)} = 1$ , car dans ce cas on aura:

$$V_{R(M)} = V_i + V_p$$

⇒ Ceci traduit le fait que tous les pores de la phase stationnaire sont accessibles aux macromolécules. Ce volume est encore appelé volume de perméation totale  $V_t$ . Pour déterminer  $V_t$ , on utilisera une petite molécule comme D<sub>2</sub>O ou un sel minéral coloré (sel de fer).

⇒ Le volume de perméation totale  $V_t$  est équivalent au volume de phase mobile physique:

$$V_t \approx V_{mo}$$

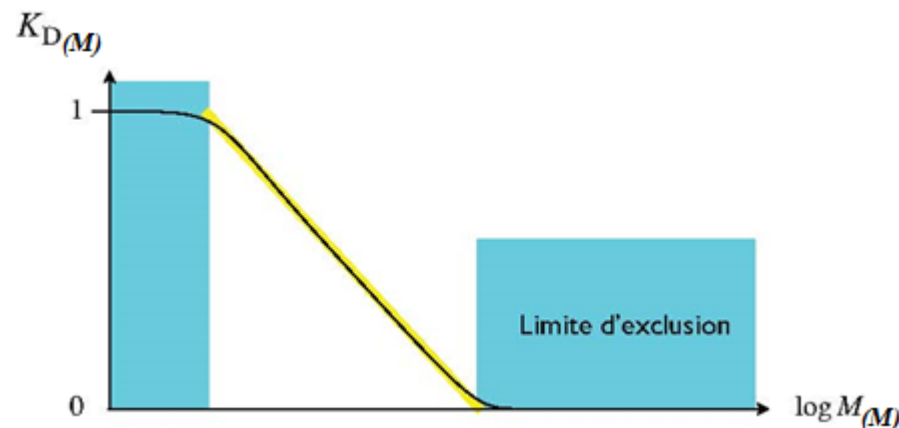
⇒ Le coefficient de distribution  $K_{D(M)}$  représente le degré de pénétration de la macromolécule  $M$  dans le volume  $V_p$ . Pour une exclusion stérique pure on a:  $0 < K_{D(M)} < 1$ .

⇒ Dès lors, tous les macromolécules seront éluées avec un volume de rétention  $V_{R(M)} < V_t \approx V_{mo}$ . Après passage d'un volume égal à  $V_t \approx V_{mo}$ , plus aucune macromolécule ne séjourne encore dans la colonne, l'analyse est terminée.

⇒ Le rayon d'une macromolécule en solution  $R_g$  (rayon de giration) est relié à la longueur  $a$  des monomères constituant la macromolécule, la masse molaire  $M_0$  des monomères, la masse molaire  $M_M$  de la macromolécule. Il existe alors une relation entre la taille et la masse molaire.

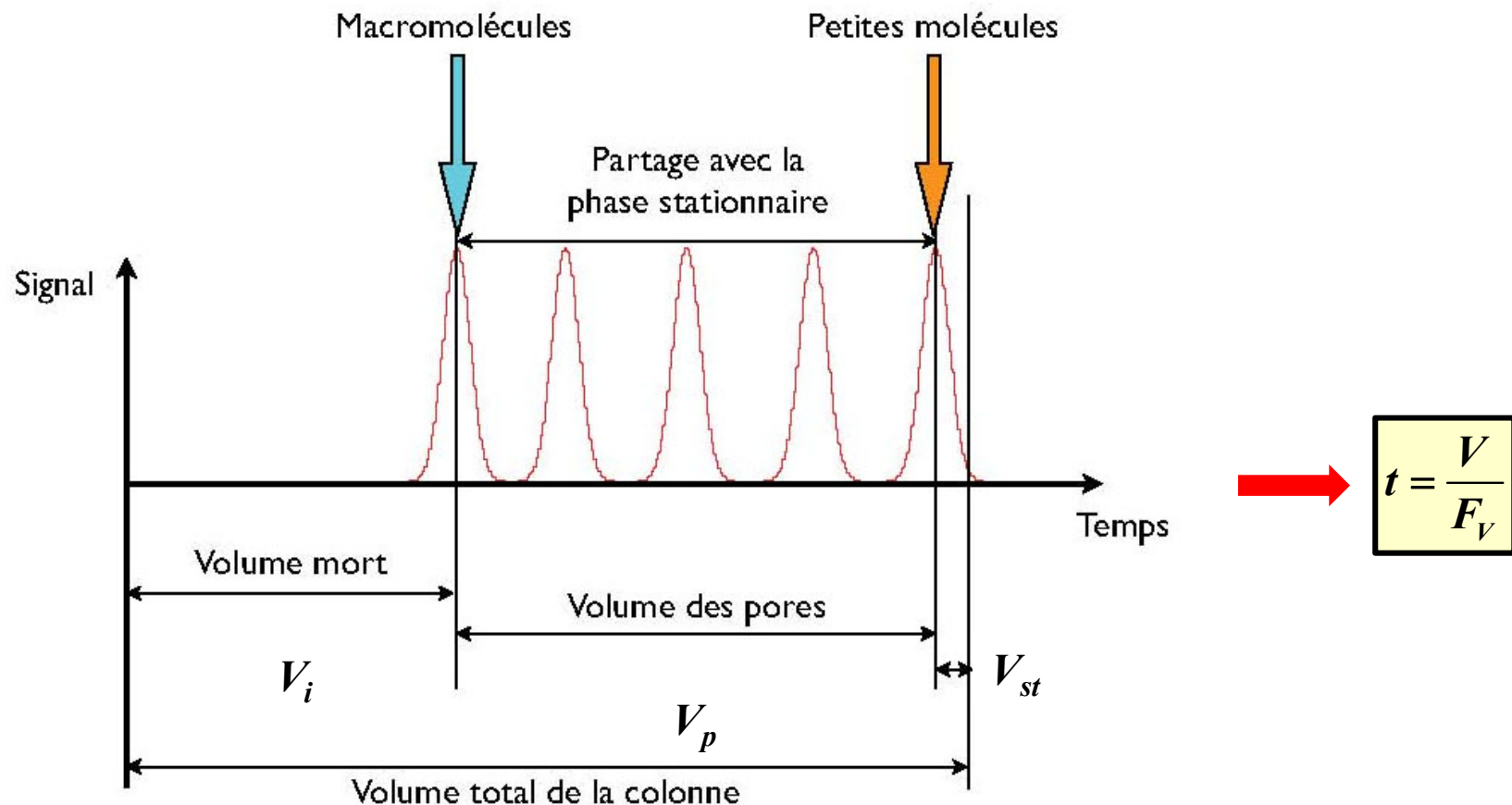
⇒ On observe une corrélation entre  $K_{D(M)}$  et  $M_M$ :

$$R_g = a \left( \frac{M_M}{M_0} \right)^{0,588}$$



↪ Les macromolécules de fortes masse molaires sont totalement ou en partie exclues des pores de la phase stationnaire. Elles sont peu ralenties et migrent plus rapidement que des petites molécules de plus faible masse molaire.

⇒ Chromatogramme d'exclusion stérique à débit volumique  $F_V$  constant:



⇒ Si  $K_{D(M)} > 1$ , cela signifie que  $V_{R(M)} > V_t \approx V_{mo}$ , comme en chromatographie HPLC par exemple.

⇒ Dans ce cas il ne s'agit plus de chromatographie d'exclusion stérique pure mais il se superposera un autre mécanisme de rétention comme de l'adsorption, des interactions hydrophobes, ioniques...

⇒ On recherchera alors des phases stationnaires pour lesquelles ces interactions secondaires seront minimales.

⇒ Le facteur de rétention  $k'_{(M)}$  est donné par:

$$k'_{(M)} = K_{D(M)} \frac{V_p}{V_i} = \left[ \exp \left( -\frac{\Delta_D G^0_{(M)}}{RT} \right) \right] \frac{V_p}{V_i}$$

⇒ La constante de distribution  $K_{D(M)}$  peut s'exprimer comme:

$$K_{D(M)} = \exp \left( -\frac{\Delta_D G^0_{(M)}}{RT} \right) = \exp \left( -\frac{\Delta_D H^0_{(M)}}{RT} + \frac{\Delta_D S^0_{(M)}}{R} \right)$$

↪ En exclusion stérique pure, les phénomènes de séparation ont été déterminés comme très peu dépendant de la température, d'où:

$$K_{D(M)} = \exp \left( -\frac{\Delta_D H_{(M)}^0}{RT} + \frac{\Delta_D S_{(M)}^0}{R} \right) \approx \exp \left( \frac{\Delta_D S_{(M)}^0}{R} \right)$$

$$k'_{(M)} \approx \left[ \exp \left( \frac{\Delta_D S_{(M)}^0}{R} \right) \right] \frac{V_p}{V_i}$$

↪ En exclusion stérique pure, le facteur enthalpique est négligeable, la séparation est sous contrôle entropique.  $k'$  est pratiquement indépendant de  $T$ .

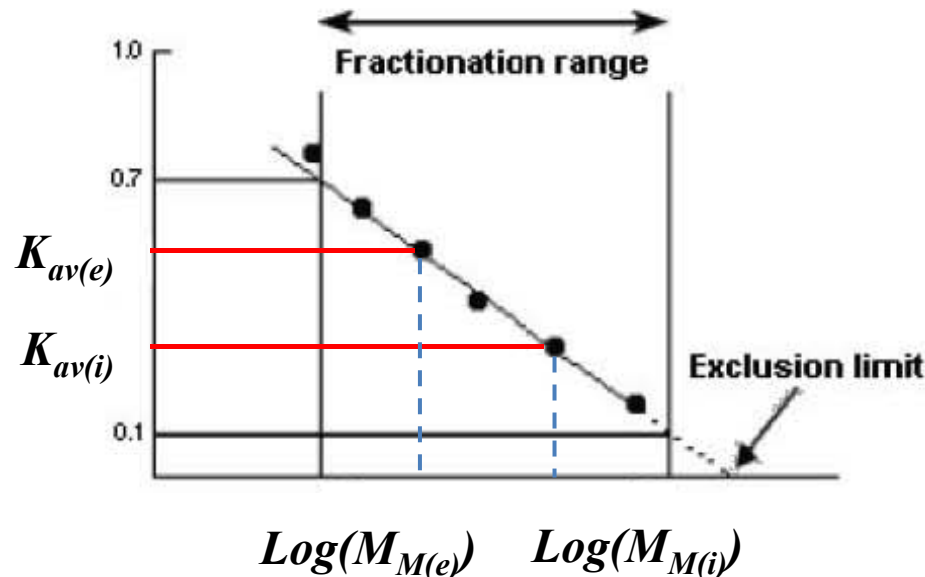
↪ Comme la mobilité des macromolécules diminue à l'intérieur des pores par rapport à celle en phase mobile, la variation d'entropie est négative d'où  $K_D < 1$ .

↪ Dans le cas où  $K_D > 1$ , le facteur enthalpique devient non négligeable, démontrant ainsi que d'autres mécanismes de rétention (adsorption...) que l'exclusion pure interviennent.

⇒ En se rapportant aux grandeurs mesurables expérimentalement, on définit  $K_{av}$ , la fraction du volume de phase stationnaire où diffuse une macromolécule  $M$  donnée:

$$K_{av(M)} = \frac{V_{R(M)} - V_i}{V_c - V_i}$$

⇒ En utilisant un étalon dont on connaît la masse molaire  $M_{M(e)}$ , on peut déterminer la masse molaire  $M_{M(i)}$  d'une macromolécule  $i$ . On mesure  $K_{av(e)}$  et  $K_{av(i)}$  pour accéder à  $M_{M(i)}$ .



$$\Delta K_{av} = K_{av(i)} - K_{av(e)} = \frac{V_{R(i)} - V_{R(e)}}{V_c - V_i}$$



⇒ D'un point de vue cinétique, les équations de Van Deemter et de Knox sont toujours valables:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

et

$$h = A\bar{v}^{1/3} + \frac{B}{\bar{v}} + C\bar{v}$$

## La colonne chromatographique: l'éluant

⇒ L'éluant doit dissoudre l'échantillon, gonfler le gel (sans le dissoudre) et être compatible avec le(s) détecteur(s) à disposition.

⇒ A température ordinaire, la solubilité des macromolécules est faible et la viscosité de l'éluant est importante.

⇒ On procède en général à une chromatographie à des températures adéquates pour augmenter la solubilité des macromolécules tout en diminuant la viscosité de l'éluant.

⇒ Le tableau ci-dessous retrace les principaux éluants utilisés en chromatographie SEC:

Solvant	Température d'utilisation (°C)	Domaine d'utilisation
Chloroforme	ambiante	Silicones, polymères du type époxy, polyesters aliphatiques, esters cellulosiques
<i>m</i> -crésol	30-135	Polyesters, polyamides, polyuréthanes
Décaline	135	Polyoléfines
Diméthylformamide	20 - 85	Polyacrylonitriles, polyuréthanes, esters cellulosiques
Hexafluoroisopropanol	20 - 40	Polyesters, polyamides
Tétrachloro-1,1,2,2-éthane	20-100	Composés de masses moléculaires faibles
Tétrahydrofuranne	20 - 45	Usage général : chlorure de polyvinyle, polystyrènes, polyéthers aromatiques, époxy, esters cellulosiques
Toluène	20 - 70	Élastomères, caoutchouc, esters vinyliques
Trichloro-1,2,4 benzène et <i>o</i> -dichlorobenzène	130-160	Polyoléfines
Trifluoroéthanol	20 - 40	Polyamides
Hexaméthylphosphorotriamide	100	Polyamides
Eau et solutions tampons	20 - 65	Biopolymères, polyélectrolytes

⇒ Suivant la nature organique ou aqueuse de l'éluant, on distingue la GPC (Gel Permeation Chromatography) et la GFC (Gel Filtration Chromatography) respectivement.

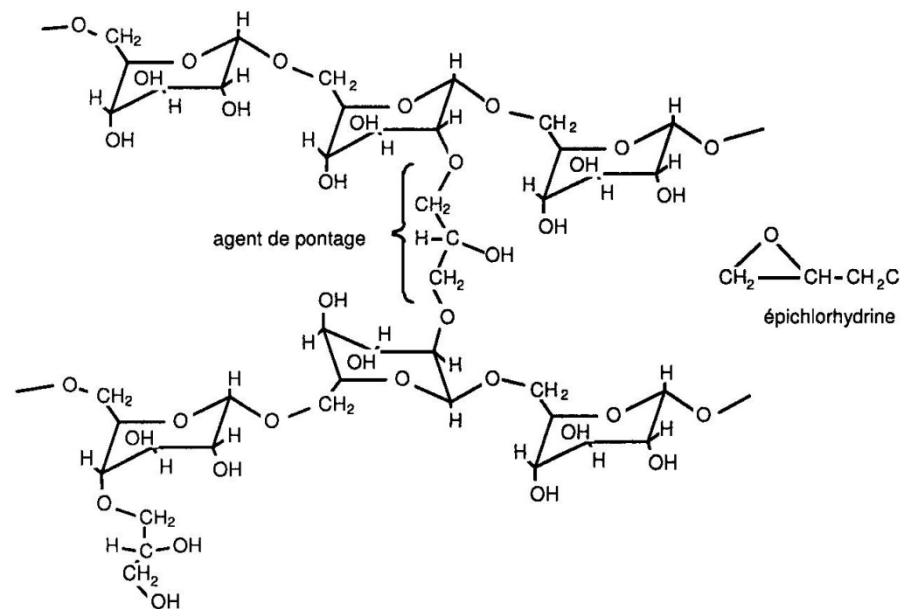
## La colonne chromatographique: phases stationnaires

### *Généralités*

- ⇒ Le gel constituant la phase stationnaire peut être un gel mou, semi-rigide ou rigide. Les gels mous et semi-rigides sont des xérogels alors les gels rigides sont des aérogels. Le gel ne doit pas générer d'interaction spécifique avec les macromolécules à séparer.
- ⇒ La distinction entre gel mou et semi-rigides se situe majoritairement au niveau du taux de réticulation de ces derniers. Les gels rigides sont formés d'une structure solide comme la silice par exemple.
- ⇒ Les gels mous nécessitent de faibles pressions et débits ( $P < 2$  bars). Les facteurs de rétention  $k'$  peuvent aller jusqu'à 3. Leur taux de gonflement est assez élevé.
- ⇒ Les gels semi-rigides ont un taux de réticulation plus important que celui des gels mous. Ils acceptent des pressions et débits plus importants que les gels mous. Leur taux de gonflement est plus faible. Les facteurs de rétention  $k'$  peuvent s'entendre entre 0,8 et 1,2.
- ⇒ Les gels rigides sont formés d'une structure solide qui ne gonfle quasiment pas. Ils acceptent des pressions et débits très importants.

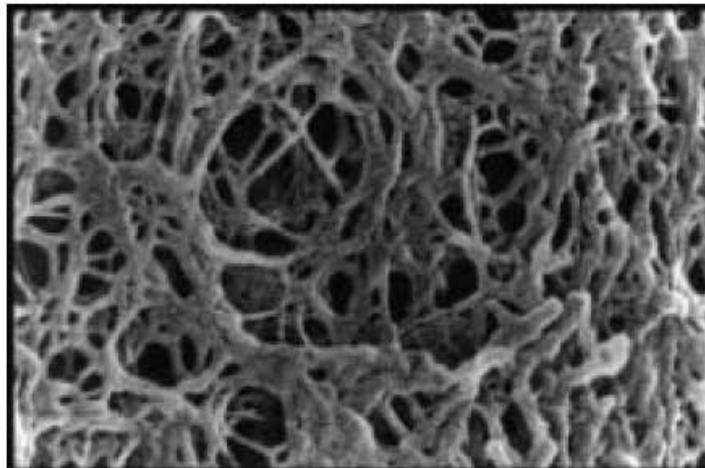
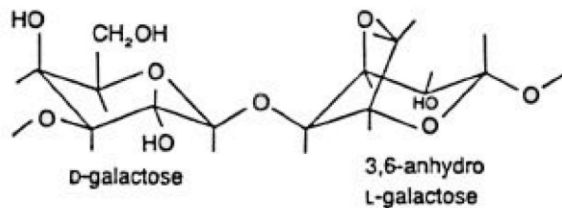
## *Gels mous*

⇒ Ce sont des polymères avec un taux de réticulation relativement faible. Il s'agit souvent de polyholosides comme le dextran (séphadex), l'agarose... Le dextran est rendu insoluble par réaction de réticulation avec l'épichlorhydrine.



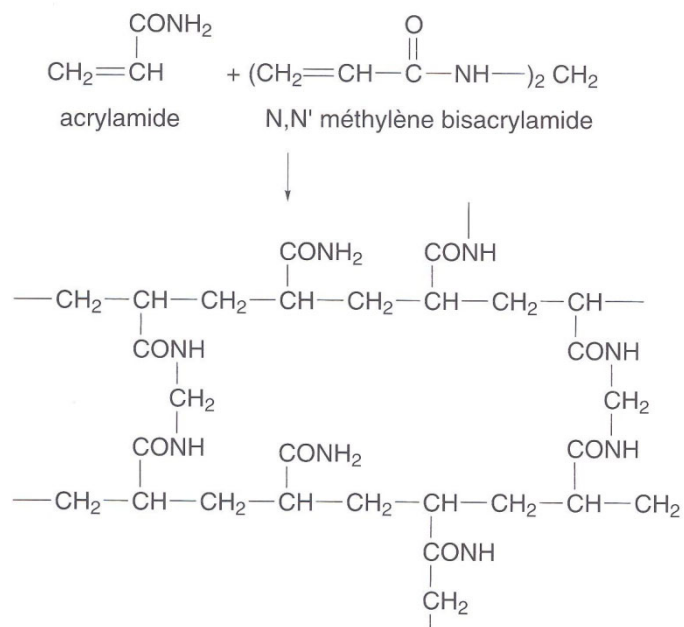
Gel de dextran réticulé (ponté) par de l'épichlorhydrine

- ⇒ La résistance mécanique augmente avec le taux de réticulation tandis que le diamètre des pores diminue.
- ⇒ L'agarose est un polyholoside d'origine marine dont la structure chimique est donnée ci-après. Le gel est sensible aux solvants organiques, aux températures supérieures à 30°C et aux bactéries.

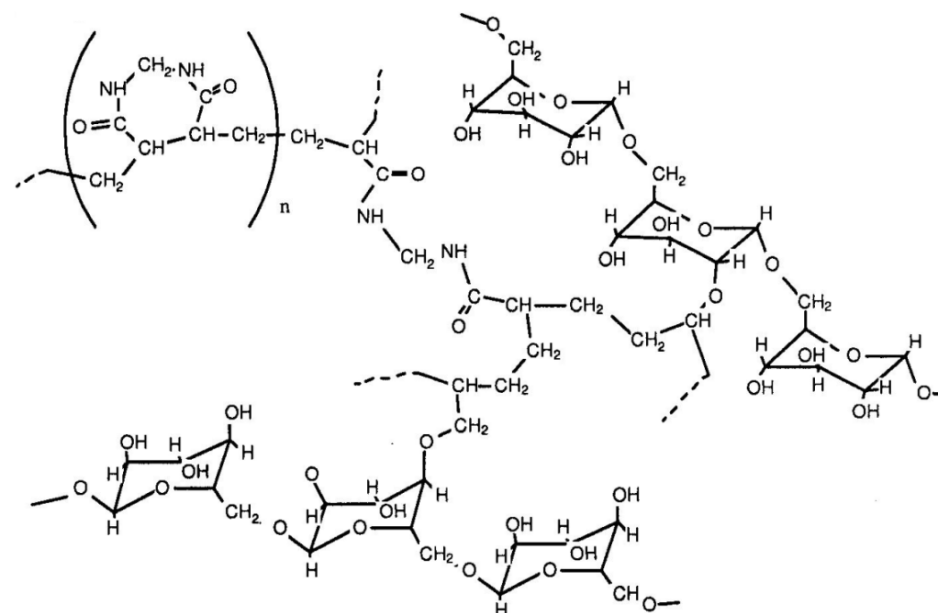


Gel d'agarose

⇒ Il existe des gels polyacrylamides et mixte polyacrylamide-dextrane.



Gel de polyacrylamide



Gel de polyacrylamide-dextrane

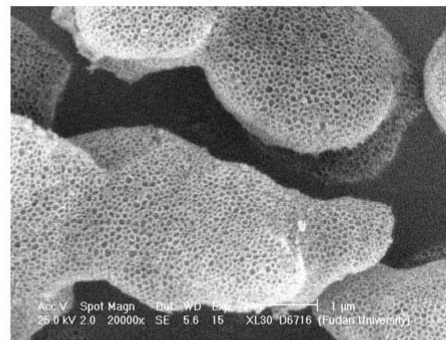
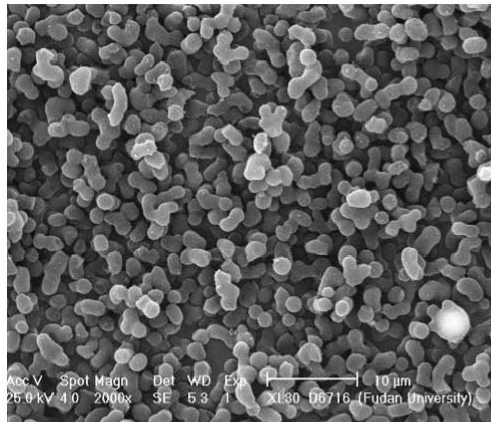


### *Gels semi-rigides*

⇒ Gels de polystyrène modifié ou non, polystyrène-divinylbenzène modifié ou non, polyacétate de vinyle, polyvinylalcool, polyglycérométhacrylates, gels mixte polyacrylamide-dextrane à haut taux de réticulation.

### *Gels rigides*

⇒ Les gels rigides sont des gels à base de silice modifiée ou non, ou à base de verres poreux. Les gels à base de silice modifiée portent des greffages glycéropropyle:  $-(CH_2)_3-O-CH_2-CH(OH)-CH_2OH$ .



Silice à structure méso-macroporeuse



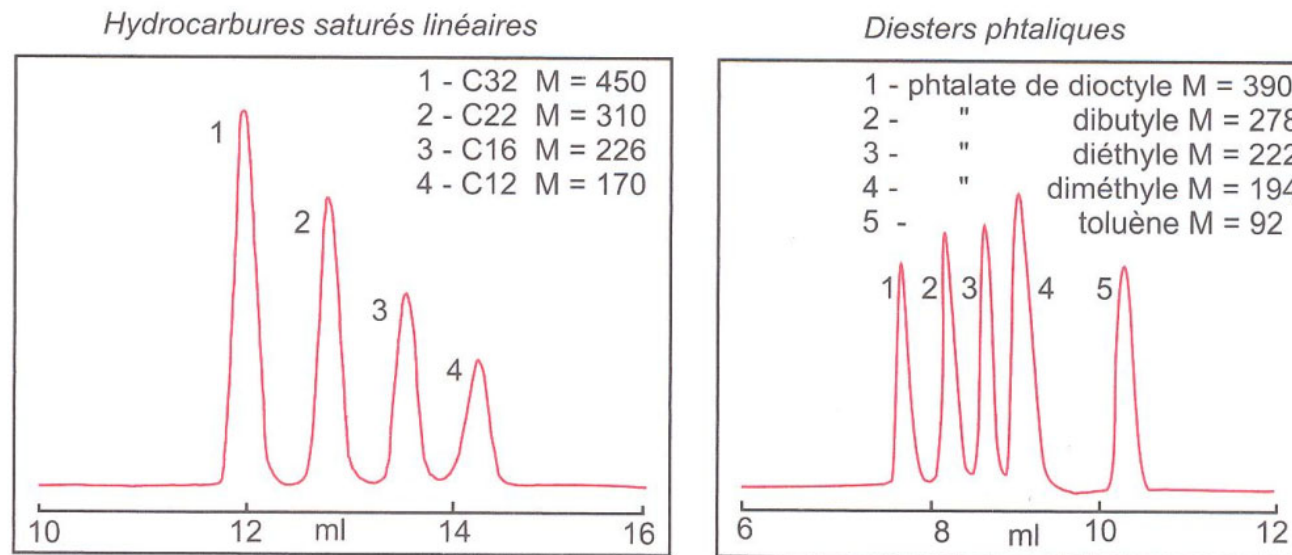
~ 100 nm in pore diameter

## Caractéristiques physiques et chimiques des phases stationnaires

⇒ Pour avoir une large plage de séparation, on utilise 2, 3, 4... colonnes en série au lieu d'une colonne à large spectre. De cette manière, on gagne en résolution.

Nom commercial	Nature chimique	Diamètre des particules (µm)	Domaine de masses couvertes (daltons)	Méthode	Fabricant	Nom commercial	Nature chimique	Diamètre des particules (µm)	Domaine de masses couvertes (daltons)	Méthode	Fabricant
Aquapore-OH	silice greffée	10	$10^2 - 2,5 \times 10^6$	GFC	Brownlee	Shodex Aqpak	silice greffée	10	$\rightarrow 8 \times 10^5$	GFC	Showa Denko
µ-Bondagel	glycéropropyle	10	$2 \times 10^3 - 7 \times 10^6$	GFC+GPC	Waters	Shodex GPC	PS-DVB	6, 10	$10^2 - 5 \times 10^7$	GPC	Showa Denko
Hamilton PRP-1	silice greffée	10	$2 \times 10^3 - 10^5$	GPC	Hamilton	Shodex Ionpak	PS-DVB à groupes sulfonate	10	$10^2 - 5 \times 10^7$	GFC	Showa Denko
Hypersil-WP 300	polyéther	5, 10	$50 - 10^6$	GPC	Shandon	Shodex OHPak B	polyester		$10^3 - 2,5 \times 10^7$	GFC	Showa Denko
LiChrogel PS	PS-DVB	5, 10	$10^2 - 10^7$	GPC	Merck	Shodex OHPak Q	alcool polyvinyle		$10^2 - 5 \times 10^3$	GFC	Showa Denko
LiChrosorb Diol	silice greffée	5, 10		GFC	Merck	µ-Spherogel	PS-DVB	10	$10^2 - 2 \times 10^6$	GPC	Beckman
LiChrospher Diol	glycéropropyle	10	GPC		Merck	µ-Styragel	PS-DVB	10	$50 - 2 \times 10^7$	GPC	Waters
LiChrospher Si	silice greffée	10	$5 \times 10^4 - 8 \times 10^6$	GPC	Merck	Supelcosil LC-1	silice greffée	5	$10^2 - 5 \times 10^6$	GPC	Supelco
Macrosphere/R	glycéropropyle	10	$3 \times 10^4 - 3 \times 10^6$	GPC	Alltech	Supelcosil LC-Diol	triméthyle	5		GFC	Supelco
MCI Gel CQP	polyméthacrylate	10		GPC	Mitsubishi		silice greffée				
MCI Gel CQS	polyacrylate	10		GPC	Mitsubishi	Supelcosil LC-Si	diol	5		GPC	Supelco
	avec un polymère hydrophile	10		GFC		Superose 6 et 12	silice			GFC	Pharmacia
Microgel	PS-DVB	5, 10	$50 - 10^6$	GPC	Chrompack	Synchrom GPC	agarose réticulé	10	$10^3 - 10^7$	GFC	Synchrom
PL aquagel	polyacrylamide	10	$50 - 3 \times 10^4$	GFC	Polymer Laboratories	TSK Type H (*)	silice greffée	8 - 10	$10^2 - 4 \times 10^8$	GPC	Toyo Soda
PL gel	PS-DVB	5, 10	$10^2 - 4 \times 10^7$	GPC	Polymer Laboratories	TSK Type PW (*)	PS-DVB modifié	10, 13, 17	$10^2 - 3 \times 10^7$	GFC	Toyo Soda
µ-Porasil GPC 60 Å	silice	10	$10^2 - 10^4$	GFC	Waters	TSK Type SW (*)	silice modifiée	10, 13	$2 \times 10^2 - 10^6$	GFC	Toyo Soda
RoGel	PS-DVB	5, 8, 10	$10^2 - 10^5$	GPC	Alltech	Ultrashtyragel	polyméthacrylate		$10^2 - 7 \times 10^6$	GFC	Waters
RoGel-P	PS-DVB greffé	5, 8, 10	$10^2 - 10^5$	GFC	Alltech	Zorbax GF	PS-DVB	7-8	$50 - 10^7$	GPC	Waters
Separon HEMA	polyalcool	10		GFC	Reichert		silice stabilisée avec de la zircone et greffée diol	4, 6	$10^2 - 10^7$	GFC	Du Pont
Serva Si Polyol	polyméthacrylate hydrophile	3, 5, 10	$5 \times 10^3 - 2 \times 10^7$	GPC	Serva	Zorbax PSM	silice	6	$10^2 - 10^7$	GFC+GPC	Du Pont
	silice					Zorbax PSM	silice silanisée	6	$10^2 - 10^7$	GPC	Du Pont

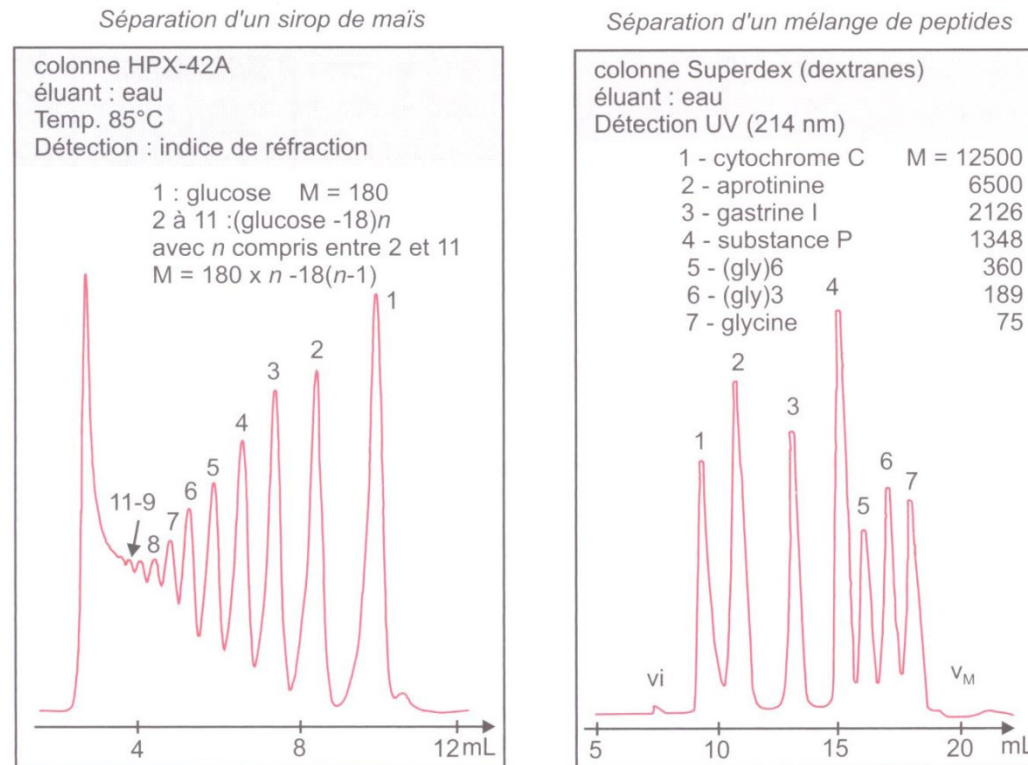
⇒ GPC: phase mobile organique/phase stationnaire hydrophobe.



Conditions : colonne PLgel 5  $\mu$ m, pores de 5 nm, dimensions : 7,5 x 300 mm.  
Élution par le tétrahydrofurane, débit 1 mL/min.

⇒ Le petit diamètre des pores du gel permet de séparer des macromolécules de faible masse molaire.

⇒ GFC: phase mobile aqueuse/phase stationnaire hydrophile.



⇒ La phase aqueuse peut être constituée par un tampon dont le pH doit être compris entre 2 et 8. En dehors de ce domaine, le gel se dégrade. Il peut s'agir aussi d'une solution salée de force ionique définie.

⇒ Lorsque l'on prépare soi-même la colonne chromatographique, il faut prendre en compte la capacité de gonflement de la phase stationnaire sèche en présence de l'éluant.

⇒ La capacité de gonflement de la phase stationnaire correspond à la quantité d'éluant capable d'être absorbée par unité de masse de gel sec. Ainsi, un gel Sephadex G10 absorbera 1 mL d'éluant par gramme de gel alors qu'un gel Sephadex G200 absorbera 20 mL d'éluant par gramme de gel sec. La capacité de gonflement définit le volume d'éluant nécessaire par rapport à la masse de gel sec introduit dans la colonne chromatographique.

### La colonne chromatographique: le soluté

⇒ La quantité d'échantillon à injecter dans la colonne chromatographique dépend de la masse molaire de ses constituants. On doit éviter tout écoulement anormal dans la colonne provoqué par des effets de viscosité.

Masse moléculaire	Concentration p/v, %	Volume injecté maximal (μL)
50 000	0,5	100
50 000 à 100 000	0,25	100
600 000 à $3 \times 10^6$	0,05	100
$> 3 \times 10^6$	0,01	20

## Détecteurs

⇒ Le détecteur réfractométrique (RID) est le détecteur de choix pour ce type de chromatographie car on observe une grande variation de l'indice de réfraction entre l'éluant et les macromolécules.

⇒ Les détecteurs UV-Visible et Fluorimétrique peuvent aussi équiper un chromatographe SEC.

Type	Response	Noise level	$C_N$ $\text{g cm}^{-3}$	Linear range	Flow cell volume, $\mu\text{l}$
Uv-visible absorption	selective	$10^{-4}$ au	$10^{-8}$	$10^4$ – $10^5$	1–8
Fluorescence	selective	$10^{-7}$ au	$10^{-12}$	$10^3$ – $10^4$	8–25
Conductivity	selective	$10^{-2}$ $\mu\text{S cm}^{-1}$	$10^{-7}$	$10^3$ – $10^4$	1–5
Amperometric	selective	0.1 nA	$10^{-10}$	$10^4$ – $10^5$	0.5–5
Refractive index	universal*	$10^{-7}$ riu	$10^{-6}$	$10^3$ – $10^4$	5–15



- ⇒ Le détecteur à diffusion laser à petits angles (Diffusion de la lumière) discrimine les macromolécules selon leur rayon de giration et donc selon leur masse molaire.
- ⇒ Un chromatographe SEC est en général équipé de plusieurs détecteurs.
- ⇒ La détection peut être directe ou nécessiter la dérivation chimique des macromolécules (rare).
- ⇒ On peut réaliser des couplages avec un spectromètre de masse (LC/MS), un spectrophotomètre infrarouge (LC/FTIR), une spectromètre RMN (LC/RMN), un analyseur minéral (ICP-MS, ICP-OES, FAAS...), un polarimètre (rare).

### Facteurs influençant la séparation

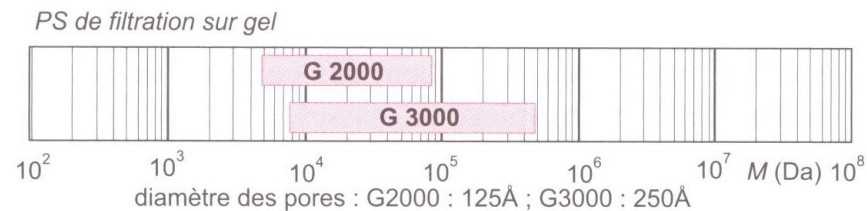
- ⇒ Les facteurs que nous allons décrire ci-après vont influencer directement la séparation par le biais de la résolution  $R_s$  entre les différents pics chromatographiques.
- ⇒ La résolution doit être optimum tout en gardant un temps d'analyse raisonnable.
- ⇒ On ne peut pas parler de critères basés sur  $k'$  ou sur la capacité de pic en SEC.

- ⇒ Les facteurs influençant la séparation seront:
- ⇒ Les aspects physiques de la colonne
- ⇒ Les aspects chimiques de la colonne
- ⇒ La nature des macromolécules à séparer
- ⇒ On abordera aussi les conséquences cinétiques issues de la variation de tous les paramètres cités ci-dessus, notamment à travers la vitesse linéaire d'écoulement moyenne optimale de l'éluant.

### *Les aspects physiques de la colonne*

- ⇒ Le nombre de macromolécules pouvant être séparées avec une bonne résolution est très limité dans la mesure où le volume d'élution ne peut être supérieur au volume de perméation total ( $K_D = 1$ ). Les facteurs de rétention  $k'$  sont en général compris entre 0,5 et 2.
- ⇒ Il faut au moins une différence de 10% en masse molaire pour que deux macromolécules puissent être correctement identifiées sur le chromatogramme.

⇒ On améliore la sélectivité en utilisant un gel dont le diamètre des pores est voisin de la taille des macromolécules à séparer. La distribution de la taille des pores doit être la plus petite possible.



différentes phases stationnaires pour filtration sur gel

- ⇒ Le nombre de plateaux théoriques est plus faible que pour les autres techniques chromatographiques mais peut atteindre  $10^5$  plateaux par mètre.
- ⇒ On peut améliorer la résolution en augmentant la longueur de la colonne. Cependant, les gels ne supportent pas des longueurs de colonne trop importantes car ils risquent de s'écraser sous la pression appliquée (loi de Darcy).

- ⇒ Pour améliorer la résolution sans augmenter la longueur de la colonne on procède par recyclage.
- ⇒ Au cours de la séparation, on réinjecte ce qui sort de la colonne à nouveau dans celle-ci.
- ⇒ On effectue ainsi plusieurs cycles de séparation qui augmentent virtuellement le nombre de plateaux théoriques de la colonne sans en augmenter la longueur.
- ⇒ La résolution est aussi entachée par l'utilisation de plusieurs colonnes en série. Elle demeure quand-même meilleure que celle obtenue avec une colonne à large spectre.
- ⇒ La température n'influence pas le facteur de rétention  $k'$ .

$$k'_{(M)} = K_{D(M)} \frac{V_p}{V_i} \approx \left[ \exp \left( \frac{\Delta_D S^{\theta}_{(M)}}{R} \right) \right] \frac{V_p}{V_i}$$

- ⇒ La température jouera néanmoins un rôle sur la viscosité de la phase mobile et de l'échantillon chromatographié (loi de Darcy). On aura tendance à réaliser ce type de chromatographie à une température supérieure à la température ambiante.

### *Les aspects chimiques de la colonne*

- ⇒ La phase stationnaire doit présenter un minimum d'interactions de Van der Waals (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes...), ioniques, d'adsorption... voir aucune de ces interactions dans l'absolu, on doit observer un phénomène d'exclusion pur:  $K_D \leq 1$ .
- ⇒ En théorie, on peut engager une grande quantité d'échantillon à séparer car la phase stationnaire ne présente pas de phénomène de saturation. Elle ne possède pas un nombre de site actif limité comme c'est le cas des phases stationnaires des autres types de chromatographie. On doit néanmoins garantir une viscosité d'échantillon adéquate, elle ne doit pas être supérieure à deux fois celle de la phase mobile.

### *La nature des macromolécules à séparer*

- ⇒ La nature des macromolécules à séparer va jouer un rôle sur:
  - ↪ la quantité d'échantillon séparable à travers la viscosité.
  - ↪ la nature de la phase mobile en regard de la solubilité l'échantillon.

⇒ la nature de la phase stationnaire par rapport à sa compatibilité avec la phase mobile et les possibles interactions secondaires qui peuvent s'établir avec les macromolécules qui constituent l'échantillon.

⇒ Le diamètre des pores de la phase stationnaire qui doit être compatible avec taille des macromolécules à séparer. On doit dans ce cas prendre en compte le rayon de giration des macromolécules lorsqu'elles sont en solution.

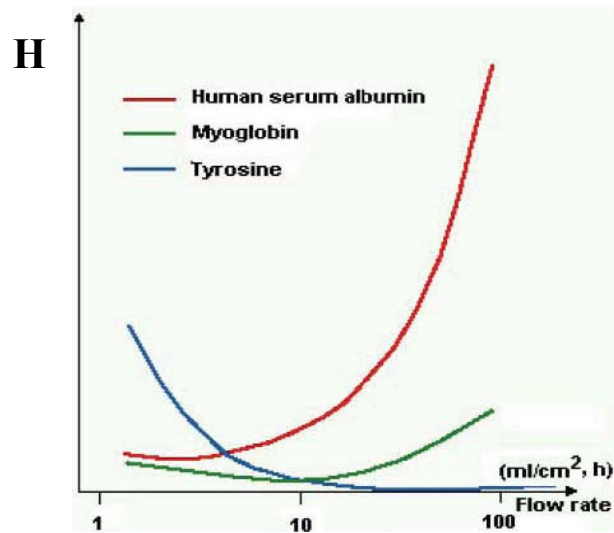
### *Conséquences cinétiques*

⇒ On doit ici se baser sur l'équation de Van Deemter pour une macromolécule  $M$ :

$$H_{(M)} = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

⇒ La courbe de Van Deemter ne passe pas par un minimum prononcé car le terme  $B$  est négligeable. Plus la vitesse linéaire d'écoulement moyenne de la phase mobile est faible, meilleure sera la séparation car les macromolécules auront tout le temps nécessaire pour pénétrer dans les pores du gel.

⇒ Il n'y a pas d'élargissement des pics lorsque  $\bar{u}$  augmente légèrement car la diffusion longitudinale  $B$  est négligeable. Au dessus d'une certaine valeur de  $\bar{u}$ , l'élargissement des pics découle directement de la résistance au transfert de masse  $C$ . Cette valeur dépend de la masse molaire de la macromolécule concernée.



⇒ Le nombre de plateaux théoriques est déterminé à l'aide de molécules totalement diffusibles comme le méthanol ou l'orthodichlorobenzène selon la nature de la phase stationnaire utilisée.

⇒ L'allure de la courbe de Van Deemter dépend donc de la masse molaire des macromolécules séparées. De grandes vitesses linéaires d'écoulement moyenne de la phase mobile sont à proscrire pour les macromolécules à forte masse molaire.