

CHAPITRE VII. CHROMATOGRAPHIE : IONIQUE & D'EXCLUSION STERIQUE

IONIQUE & D'EXCLUSION STERIQUE

PR. AYAD R.

I. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

Le terme « chromatographie ionique » a longtemps été utilisée au sens large et désignait toutes les techniques reposant sur les interactions ioniques. De nos jours, la chromatographie ionique désigne communément la chromatographie d'échange d'ions.

I.1. Définition

La chromatographie par échange d'ions sépare les molécules selon leurs groupes chargés respectifs. Les ions de l'analyte subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire, ce qui entraîne leur rétention. La phase stationnaire en question est constituée d'une matrice immobile qui contient des groupes fonctionnels chargés. Ce procédé de séparation est basé sur des processus d'échange d'ions se produisant entre les analytes dans la phase mobile et la résine fixée sur la colonne.

Il existe deux types de chromatographie ionique : la chromatographie par échange d'anions et la chromatographie par échange de cations, et le type utilisé dépend de la force ionique du groupe d'échange d'ions de la phase stationnaire.

Le **Tableau 1** montre les groupes fonctionnels typiques par type de phase stationnaire IEX. Les groupes fonctionnels d'échange d'ions forts peuvent toujours être ionisés, tandis que les conditions d'ionisation des groupes d'échange d'ions faibles peuvent varier en fonction du pH de la phase mobile. La phase stationnaire appropriée est sélectionnée en fonction de la charge et des propriétés de l'analyte.

Tableau 1. Groupes fonctionnels typiques utilisés dans la phase stationnaire d'échange d'ions

	Force ionique	Groupes fonctionnels typiques
Chromatographie par échange de cations	Forte	Acide sulfonique
	Faible	Acide carboxylique
	Forte	Ammonium quaternaire

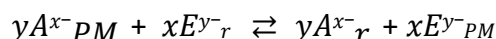
Chromatographie par échange d'anions	Faible	Amine tertiaire
---	--------	-----------------

I.2. Principe

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer les anions et les cations inorganiques et organiques. La séparation des anions est réalisée avec une colonne d'échange anionique et la séparation des cations est réalisée avec une colonne d'échange cationique.

Un éluant est utilisé pour entraîner l'échantillon à travers la colonne. Les ions d'intérêts sont ensuite détectés, principalement par conductivité ou par absorbance UV/Visible.

En chromatographie ionique, la séparation est basée sur un processus d'échange des ions de l'éluant E de charge y et ceux du soluté A de charge x entre la phase mobile PM et la résine r selon l'Équation :



Cet équilibre est défini par la constante d'équilibre K

$$K_{A,E} = \frac{[A^{x-}]_r^y [E^{y-}]_{PM}^x}{[E^{y-}]_r^x [A^{x-}]_{PM}^y}$$

La séparation résulte donc de l'affinité des ions et de la PM pour la phase stationnaire PS. Plus un ion a d'affinité pour la PS, plus le temps de rétention est important. En chromatographie ionique cette affinité dépend, dans l'ordre de :

- La densité de charge de l'ion solvaté : Lorsque le soluté s'ionise dans la PM aqueuse, des interactions ion-dipôle conduisent à la formation d'une nouvelle structure. Plus l'ion est de petite taille, plus l'hydratation sera importante. La densité de charge et la rétention seront donc plus faibles. De manière générale, plus la valence d'un ion est importante, plus l'ion sera retenu.
- La polarisabilité : relate la capacité d'un ion à se déformer sous l'influence d'un champ électrique. Plus un ion aura un rayon ionique important, plus il sera polarisable et plus il sera retenu.

En réalité, si l'échange d'ions est l'interaction principale qui intervient dans la rétention en chromatographie ionique, ce n'est pas la seule : des interactions non ioniques interviennent également. Les interactions non ioniques les plus importantes peuvent être

attribuées à des liaisons de type Van der Waals (interactions dipolaires), π - π ou anions- π et des interactions hydrophobes. En chromatographie ionique les interactions secondaires sont difficiles à identifier clairement et à estimer.

I.3. Les phases stationnaires

En chromatographie ionique, les phases stationnaires sont composées deux parties : le substrat et le groupement échangeur. Ces derniers sont principalement des groupements ammoniums quaternaires en chromatographie d'échange d'anions.

I.3.1. Les caractéristiques des phases stationnaires

Les colonnes sont généralement caractérisées par leur capacité d'échange d'ions, c'est-à-dire leur nombre de site échangeurs d'ions par gramme de résine (en meq/g) ou pour tout le volume de colonne (en meq/col).

Les colonnes de chromatographie ionique se différencient également selon le substrat utilisé, le groupement fonctionnel et le type de greffage. L'influence des caractéristiques des PS utilisées pour les colonnes (taille, distribution de la taille, porosité...) sur les grandeurs chromatographiques en IC suit les mêmes principes qu'en HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance).

La tendance actuelle pour les phases stationnaires de chromatographie liquide consiste à diminuer le diamètre de particules pour obtenir des colonnes plus efficaces et des séparations plus rapides. Seulement la diminution du diamètre des particules entraîne également une augmentation de la pression et un compromis doit être fait lors du choix de la PS.

I.3.2. Les substrats

Il existe différents types de substrats pour les phases stationnaires en chromatographie ionique : les polymères, la silice et les monolithes.

Bien que la silice greffée mène à des colonnes plus efficaces et plus résistantes mécaniquement, elles ne sont utilisables que dans une gamme de pH comprise entre 2 et 8 ce qui limite les possibilités en terme d'éluant et de solutés. En effet, pour des pH inférieurs à 2 la silice peut s'hydrolyser et pour des pH supérieurs à 8, la silice risque de se dissoudre. Ce type de phase n'est donc pas compatible avec l'utilisation de l'éluant hydroxyde, c'est pourquoi les colonnes à base de polymère sont les plus répandues. Exps: Le copolymère polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) et le copolymère éthylvinylbenzène-divinylbenzène (EVB-DVB) sont les substrats les plus largement utilisés en chromatographie ionique en raison

de leur résistance à une gamme de pH allant de 0 à 14 qui facilite la diversification des éluants à des concentrations variées.

La copolymérisation du styrène avec le DVB permet également l'obtention d'une résine mécaniquement stable et de ce fait, d'obtenir une colonne plus résistante aux fortes pressions sur le long terme. Le groupement échangeur peut être fonctionnalisé directement sur la surface du substrat par dérivation chimique. Il existe également les résines dites « greffées » ou « hyper-ramifiées ». Enfin, le groupement échangeur d'ions peut être fonctionnalisé sur une bille de latex liée au substrat, ce sont les résines pelliculaires

➤ Les résines pelliculaires

Cette PS possède une structure particulière : elle est composée d'un substrat lié par des interactions électrostatiques à des nanobilles de chlorure de polyvinyle ou de polyméthacrylate dont la surface est poreuse et permet l'échange d'ions. Cela résulte en une PS composée de deux régions avec des propriétés chimiques différentes :

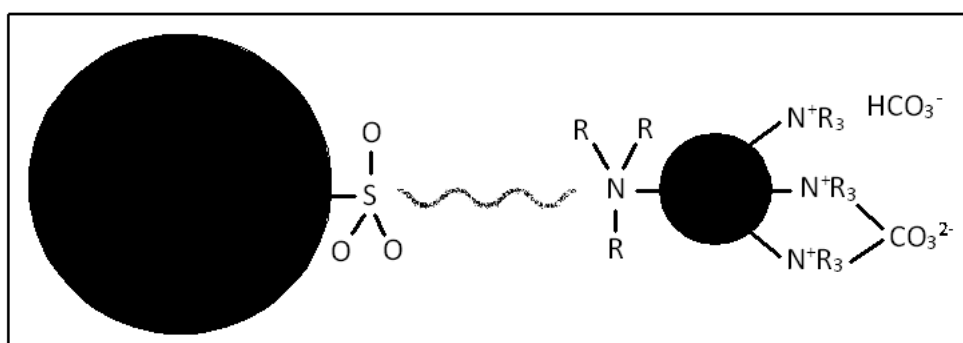


Fig.1. Résine pelliculaire

- Un substrat mécaniquement stable sulfonaté.
- Une couche de nanobilles portant les groupements échangeurs d'anions

Ces résines pelliculaires sont très intéressantes pour :

- Leur efficacité selon la taille des billes de latex et le degré de sulfonation de la surface
- La diminution du phénomène de gonflement et de rétractation grâce à la fonctionnalisation de la surface.

I.4. La phase mobile

Les éluants servant de phase mobile sont des solutions aqueuses chargées d'ions salins ou organiques et si nécessaire, d'un peu de méthanol ou d'acétone pour faciliter la dissolution de certains échantillons. Le pH est ajusté en fonction de la séparation à réaliser.

I.5. Appareillage

Depuis sa création et au fil des avancées technologiques, le chromatographe ionique a beaucoup évolué. Il s'est petit à petit différencié de l'HPLC grâce à des tubulures non métalliques biocompatibles, la présence d'un supprimeur et d'un générateur d'éluant ionique.

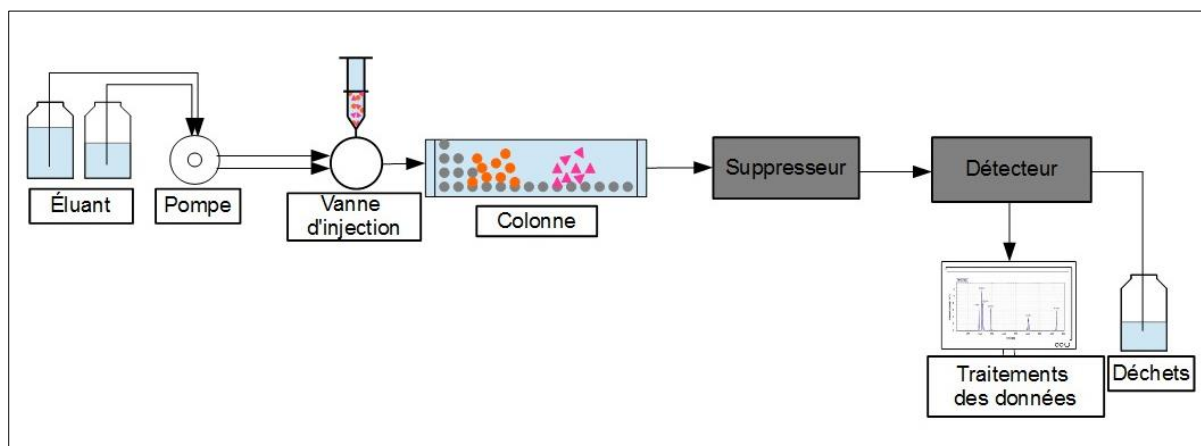


Fig.2. Schéma du montage de la chromatographie d'échange ionique

I.5.1. La détection conductimétrique

L'analyse des composés sous forme ionique fait du conductimètre un détecteur de choix pour la chromatographie ionique. Tous les appareils de chromatographie ionique en sont d'ailleurs équipés. La conductivité électrique dépendant de la concentration, un lien direct peut donc être établi entre la résistance d'un ion et sa concentration.

- **Le détecteur conductimétrique** est composé de deux électrodes entre lesquelles est appliquée une tension. La conductance G , mesurée par le détecteur au cours de l'analyse, varie lorsqu'une espèce ionique traverse la cellule. Cette conductance étant définie comme l'inverse de la résistance, elle est donc dépendante de la concentration des espèces ioniques. L'eau fréquemment utilisée comme diluant pour les échantillons, possède une conductivité considérée comme nulle. Lorsque l'eau traverse la cellule, sa conductance étant plus faible que celle de l'éluant, le signal devient négatif. Ce pic négatif est utilisé comme mesure du temps mort.

I.5.2. Le supprimeur

Les colonnes de très haute capacité (environ 1 meq/g) mènent à des temps de rétention élevés qu'il faut corriger avec l'utilisation d'un éluant fort. Ce dernier induit généralement une difficulté voire une impossibilité à utiliser la détection conductimétrique

en raison de la forte concentration de l'éluant. Dans un premier temps, deux solutions ont été envisagées pour palier à ce problème :

La première était d'utiliser une détection UV, et la seconde était d'utiliser des colonnes de plus faibles capacités d'échange avec des éluants eux aussi moins forts. Ces deux solutions limitant les applications aux composés contenant des chromophores ou augmentant considérablement le temps d'analyse, une autre solution a rapidement vu le jour :

l'utilisation d'un supprimeur. Ce dispositif est aujourd'hui largement utilisé en chromatographie ionique pour augmenter le rapport signal sur bruit car il permet de supprimer le signal de la PM en la neutralisant tout en maximisant la réponse du soluté.

I.5.3. Le générateur d'éluant

Les éluants les plus classiquement utilisés en échange d'anions sont l'hydroxyde de sodium ou de potassium et le carbonate de sodium. L'utilisation répandue de ces éluants est principalement due à leur facilité d'utilisation puisque des supprimeurs électrolytiques et des générateurs d'éluants sont dédiés pour ces phases mobiles. Le générateur d'éluant repose sur un principe simple.

Dans le cas de l'éluant hydroxyde, il est composé d'une anode et d'une cathode qui produisent respectivement des ions H_3O^+ et OH^- grâce à l'électrolyse de l'eau. Les ions H^+ produits par l'électrode vont remplacer les ions K^+ du réservoir électrolytique. Ces ions K^+ vont traverser la membrane échangeuse de cations pour rejoindre les ions OH^- produits par la cathode et former du KOH.

Ce type de système permet un gain de reproductibilité et de répétabilité. Il permet également d'éviter la carbonatation de l'hydroxyde de potassium. Le principal inconvénient d'un tel système est l'impossibilité d'ajouter un pourcentage de modifiant organique pour l'élution.

I.6. Applications

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille : ions minéraux (tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. C'est une méthode analytique de référence en analyse des eaux, et est adaptée aux milieux biologiques.

II. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour size exclusion chromatography en anglais) est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique (tailles). Elle est notamment utilisée pour faire l'étude de polymères. Suivant la nature des deux phases en présence, elle est encore désignée par *chromatographie sur gel perméable* (GPC pour *gel permeation chromatography*) ou par *filtration sur gel* (GFC pour *gel filtration chromatography*).

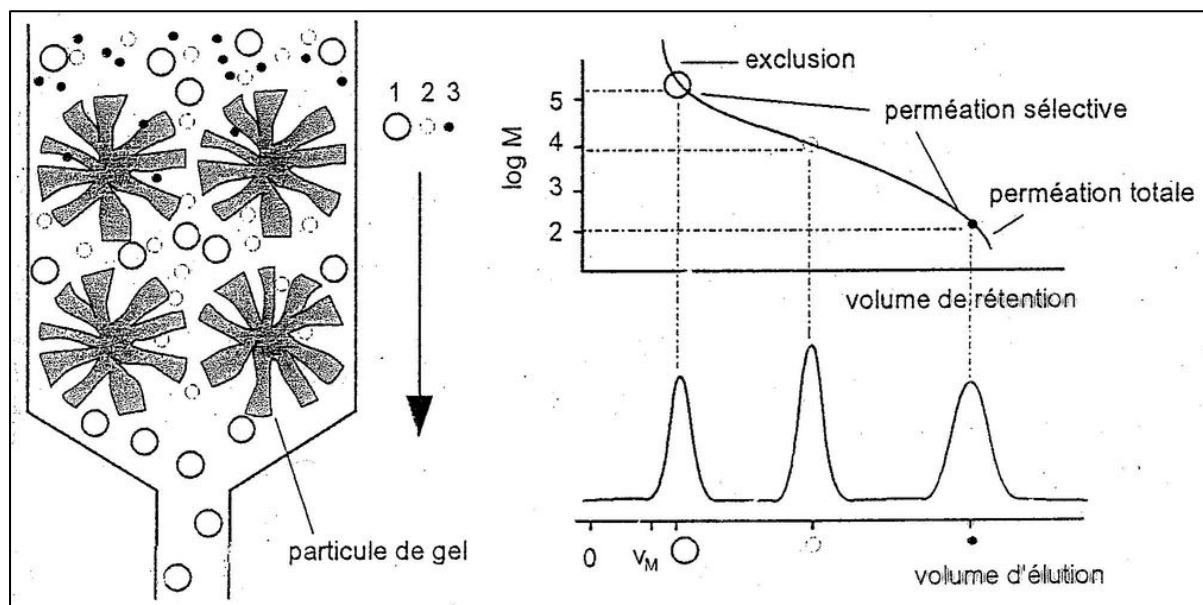


Fig.3. Schéma simplifié du principe de la chromatographie d'exclusion stérique. Le chromatogramme représente la séparation de trois polymères de tailles différentes en solution. Les molécules ayant le plus grand volume hydrodynamique (1) arrivent en tête, suivies des plus petites (2) puis (3).

II.1. Définition et principe

Cette technique de séparation repose sur la capacité des molécules à pénétrer ou non dans les pores d'un matériau stationnaire. Plus précisément, une colonne remplie de billes poreuses agit comme un tamis moléculaire : les molécules de grande taille sont exclues de ces pores et s'écoulent rapidement à travers la colonne, tandis que les plus petites s'infiltreront dans les cavités et mettent plus de temps à être éluées.

Ce phénomène repose sur un équilibre thermodynamique entre le volume interstitiel de la colonne (volume mort) et le volume poreux accessible aux analytes. La relation entre le

volume d'élution V_e d'une macromolécule et les volumes de la phase stationnaire et de la phase mobile est décrite par l'équation suivante : $V_e = V_o + K \times V_p$

Où :

- V_o représente le volume mort, soit l'espace non accessible aux macromolécules exclues,
- V_p est le volume de la phase stationnaire,
- K est le coefficient de partage, fonction de la taille et de la conformation des macromolécules.

Ainsi, plus une molécule est volumineuse, plus son temps d'élution sera court, tandis que les plus petites mettront plus de temps à traverser la colonne en raison de leur interaction avec la phase stationnaire.

II.2. Différence avec les autres techniques chromatographiques

Contrairement aux méthodes chromatographiques classiques telles que la chromatographie d'affinité, la chromatographie d'échange d'ions ou encore la chromatographie de partage, la SEC ne repose pas sur des interactions chimiques entre les analytes et la phase stationnaire. Elle offre ainsi plusieurs avantages :

- **Absence d'interactions chimiques** : aucune adsorption des analytes sur la phase stationnaire, minimisant le risque de dénaturation des biomolécules sensibles.
- **Méthode isocratique** : contrairement à d'autres techniques nécessitant un gradient de solvant, la SEC utilise une phase mobile unique et constante tout au long de l'analyse.
- **Excellente reproductibilité** : les conditions analytiques étant peu variables, la SEC garantit une séparation stable et fiable dans le temps.

Cependant, cette absence d'interaction chimique limite également son champ d'application. La SEC n'est pas adaptée pour séparer des molécules de masses molaires similaires mais de structures chimiques différentes.

II.3. Influence de la phase stationnaire et de la phase mobile

II.3.1. La phase stationnaire utilisée en SEC est composée de **matériaux poreux rigides**, adaptés à la séparation des macromolécules. Plusieurs types de matériaux peuvent être employés en fonction de la nature des analytes étudiés :

- **Gels de silice poreuse**, particulièrement adaptés aux solvants organiques.

- **Polymères réticulés** comme le polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB), utilisés pour l'analyse des polymères synthétiques.
- **Matrice d'agarose ou de dextrane**, couramment utilisée en biochimie pour la séparation des protéines et autres biomolécules hydrophiles.

II.3.2. Types de phases stationnaires et leur impact sur l'analyse

Le choix du matériau de remplissage de la colonne est crucial en SEC. La phase stationnaire est constituée de particules poreuses rigides, adaptées à la séparation des macromolécules en solution.

- **Silice poreuse** : Utilisée principalement pour les solvants organiques. Elle offre une bonne stabilité chimique mais peut présenter des interactions non spécifiques avec certains analytes.
- **Polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB)** : Polymère réticulé très utilisé pour l'analyse des polymères synthétiques. Il est compatible avec une large gamme de solvants organiques.
- **Matrice d'agarose ou de dextrane** : Employée pour la séparation des biomolécules et des protéines en phase aqueuse. Elle permet une séparation douce et adaptée aux macromolécules fragiles.

Le choix de la phase stationnaire influence directement la **plage de séparation** et la **résolution chromatographique**. Une colonne mal adaptée peut conduire à une mauvaise discrimination des analytes ou à une élution simultanée de molécules de tailles différentes.

II.3.3. La phase mobile : Le choix du **solvant** est tout aussi crucial pour assurer une séparation optimale et préserver l'intégrité des échantillons. Le solvant doit répondre aux critères suivants :

- **Être un bon solvant pour les macromolécules étudiées**, afin d'éviter les phénomènes de précipitation ou d'aggrégation.
- **Ne pas interagir chimiquement avec la phase stationnaire**, pour garantir une séparation uniquement basée sur la taille.
- **Avoir une viscosité adaptée**, afin de limiter les effets de diffusion et d'assurer un débit constant dans la colonne.

En fonction du type d'échantillon, différents solvants sont utilisés :

- **Tétrahydrofurane (THF)** ou **chlorure de méthylène** pour les polymères en solution organique.

- **Tampons aqueux (phosphate, TRIS, NaCl)** pour les biomolécules et les protéines.
- **Solvants à haute température** (o-dichlorobenzène, trichlorobenzène) pour l'analyse des polyoléfines.

II.4. Domaine de séparation et calibration des colonnes

Chaque colonne de SEC possède un domaine de séparation spécifique, défini par la taille des pores du matériau de remplissage. Un échantillon contenant des molécules trop grandes sera élué immédiatement avec le volume mort de la colonne (V_0), tandis que des molécules trop petites seront éluées avec le volume total de solvant (V_t), sans information sur leur taille moléculaire.

Afin de déterminer précisément la masse molaire moyenne des analytes, les colonnes doivent être **étalonnées à l'aide de standards moléculaires de référence**. Ce processus de calibration suit deux approches principales :

- **Étalonnage conventionnel** : une courbe d'étalonnage est établie en injectant des polymères de masse molaire connue, permettant de relier le volume d'élution à la masse moléculaire.
- **Étalonnage universel** : en couplant la SEC à un détecteur viscosimétrique, il est possible de normaliser les résultats et d'obtenir une mesure plus précise, indépendante du type de polymère analysé.

Grâce à cette calibration, il devient possible d'évaluer la **distribution des masses moléculaires** d'un échantillon et d'en extraire des paramètres fondamentaux comme la **masse moléculaire moyenne en nombre (M_n)**, la **masse moléculaire moyenne en poids (M_w)** et l'**indice de polydispersité ($I_p = M_w/M_n$)**, indicateur clé de l'homogénéité d'un polymère.

II.5. Appareillage

Un système de chromatographie d'exclusion stérique comprend plusieurs éléments essentiels permettant le bon déroulement de l'analyse :

- **Réservoir de phase mobile** : Contient le solvant ou tampon utilisé pour transporter les analytes à travers la colonne. Il doit être dégazé et filtré pour éviter toute contamination ou formation de bulles pouvant perturber l'analyse.
- **Système de pompage** : Garantit un débit constant de la phase mobile à travers la colonne. Il doit être stable et précis pour éviter les fluctuations de pression qui pourraient altérer la séparation.

- **Injecteur** : Permet d'introduire l'échantillon dans la colonne. L'injection doit être effectuée de manière reproductible pour garantir des volumes identiques à chaque analyse et éviter les variations dans les temps d'élution.
- **Colonne chromatographique** : Cœur du système, elle est remplie de particules poreuses permettant la séparation des molécules en fonction de leur taille. Le choix de la colonne dépend des analytes à étudier et des caractéristiques du matériau de remplissage.
- **Détecteurs** : Dispositifs placés à la sortie de la colonne, permettant de mesurer les signaux générés par les analytes élués. Leur choix dépend de la nature des échantillons et des informations recherchées.

➤ **Types de détecteurs utilisés en SEC**

Différents détecteurs peuvent être couplés à une SEC afin de fournir des informations complémentaires sur les analytes séparés.

- **Réfractomètre différentiel (RI)** : Il est le détecteur le plus couramment utilisé en SEC. Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre la phase mobile pure et l'échantillon élué. Il est universel, applicable à une large gamme de polymères et biomolécules, mais sa sensibilité est parfois limitée pour les échantillons à faible concentration.
- **Détecteur à diffusion de la lumière (RALS/LALS/MALLS)** : Il permet une détermination directe de la masse molaire absolue des analytes, indépendamment des standards d'étalonnage. Il est basé sur la capacité des macromolécules à diffuser la lumière selon leur taille et leur conformation. Ce type de détecteur est particulièrement utilisé pour les études de structure des polymères et des protéines.
- **Viscosimètre différentiel** : Il mesure la viscosité intrinsèque des analytes en sortie de colonne. Il est utilisé pour caractériser la conformation des macromolécules (linéaire, ramifiée, globulaire) et permet d'accéder à des informations complémentaires sur la taille et la forme des polymères.
- **Détecteur UV-Visible** : Il est utilisé pour les analytes ayant une absorption spécifique dans l'ultraviolet, comme certaines protéines ou polymères contenant des groupements chromophores. Il permet de réaliser des analyses sélectives en fonction de la nature chimique des macromolécules.

- **Détecteur couplé à la spectrométrie de masse (SEC-MS) :** Il combine la séparation SEC avec une identification des analytes par spectrométrie de masse. Il est principalement utilisé dans l'analyse des biomolécules complexes, telles que les protéines et les polysaccharides, permettant d'identifier précisément la composition des fractions séparées.
- **Système d'acquisition et de traitement des données :** Convertit les signaux électriques des détecteurs en chromatogrammes exploitables. Il permet d'analyser les temps d'élution et de calculer les paramètres liés aux masses moléculaires.

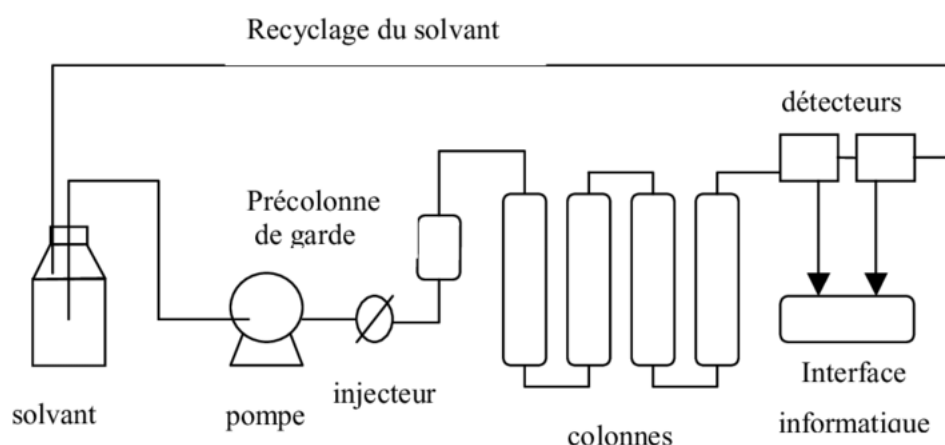


Fig.4. Système de chromatographie d'exclusion stérique

II.6. Conditions expérimentales et optimisation des analyses

Pour garantir des résultats précis et reproductibles, plusieurs paramètres expérimentaux doivent être soigneusement contrôlés :

- **Débit de la phase mobile :** Un débit trop élevé peut réduire la résolution chromatographique en diminuant le temps d'interaction des analytes avec la phase stationnaire. Un débit trop faible peut allonger inutilement le temps d'analyse.
- **Température de la colonne :** Une température stable est essentielle pour éviter les variations de viscosité du solvant et assurer une élution homogène des analytes. Certaines analyses nécessitent une élévation de température pour améliorer la solubilité des polymères.
- **Volume d'injection :** Il doit être optimisé pour éviter les effets d'élargissement de pic. Une injection trop volumineuse peut altérer la séparation et réduire la qualité du chromatogramme.

- **Solvant utilisé** : Il doit être choisi en fonction des analytes à analyser. En SEC, la phase mobile ne joue pas un rôle actif dans la séparation, mais elle doit être compatible avec l'échantillon pour assurer une bonne dissolution des macromolécules.

II.6.1. Méthodologie d'analyse en SEC

Le protocole classique d'une analyse SEC suit plusieurs étapes clés :

1. **Préparation de l'échantillon** : L'échantillon est solubilisé dans un solvant adapté, puis filtré pour éliminer les particules pouvant obstruer la colonne.
2. **Injection de l'échantillon** : Une seringue ou un système automatique introduit un volume précis d'échantillon dans la phase mobile.
3. **Séparation chromatographique** : Les analytes traversent la colonne et sont séparés en fonction de leur taille.
4. **Détection des analytes** : Les signaux sont enregistrés par les détecteurs et convertis en chromatogrammes.
5. **Interprétation des résultats** : Les temps d'élution sont comparés à ceux d'un étalonnage pour déterminer la masse molaire moyenne et la distribution des analytes.

II.6.2. Interprétation des chromatogrammes

Un chromatogramme SEC représente l'évolution de l'intensité du signal détecté en fonction du temps d'élution. L'interprétation de ces chromatogrammes permet de déterminer plusieurs paramètres analytiques clés :

- **Temps de rétention des analytes** : Plus une molécule est volumineuse, plus son temps de rétention sera court. À l'inverse, les molécules de plus petite taille mettent plus de temps à traverser la colonne.
- **Courbe de distribution des masses moléculaires** : Elle permet de visualiser la répartition des différentes tailles de macromolécules dans l'échantillon analysé.
- **Calcul des masses molaires moyennes** : Trois grandeurs sont généralement extraites des chromatogrammes :
 - **Masse molaire moyenne en nombre (M_n)** : Correspond à la masse moyenne pondérée par le nombre de molécules.
 - **Masse molaire moyenne en poids (M_w)** : Représente la masse moyenne pondérée par la masse des macromolécules.
 - **Masse molaire moyenne en z (M_z)** : Sensible aux fractions de haute masse molaire, elle est utilisée pour décrire la partie la plus lourde de la distribution.

- **Indice de polydispersité ($I_p = M_w/M_n$)** : Il traduit l'hétérogénéité de la distribution des masses moléculaires. Un indice proche de 1 indique un polymère parfaitement homogène, tandis qu'une valeur plus élevée traduit une distribution large des tailles moléculaires.

II.6 3. Précision et reproductibilité des analyses

Afin d'assurer la robustesse des résultats, plusieurs précautions doivent être prises lors des analyses SEC :

- **Calibration rigoureuse des colonnes** : Un étalonnage précis à l'aide de standards certifiés est indispensable pour garantir la justesse des calculs de masse molaire.
- **Contrôle de la stabilité du débit** : Toute fluctuation du système de pompage peut entraîner des erreurs d'élution et fausser les résultats.
- **Température constante** : Une variation de température peut affecter la viscosité de la phase mobile et modifier le comportement d'élution des analytes.
- **Filtration et préparation des échantillons** : Une mauvaise dissolution ou la présence d'agréats peut perturber la séparation chromatographique et provoquer des distorsions dans les chromatogrammes.

II.7. Applications industrielles et scientifiques

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique analytique largement utilisée dans de nombreux secteurs industriels et scientifiques. Son aptitude à séparer les macromolécules en fonction de leur taille la rend essentielle pour le contrôle qualité, la recherche et le développement de matériaux polymères, de biomolécules et de formulations complexes.

II.7.1. Analyse des polymères : contrôle qualité et optimisation des formulations

En chimie des matériaux, la structure et la distribution des masses moléculaires influencent directement les propriétés mécaniques, thermiques et chimiques des polymères. La SEC est utilisée pour :

- **Déterminer la masse molaire moyenne des polymères** et leur indice de polydispersité, garantissant la cohérence des lots de production.
- **Contrôler la distribution des chaînes polymères**, ce qui est essentiel pour optimiser les propriétés d'un matériau (élasticité, résistance, solubilité).
- **Détecter la présence d'impuretés ou de fragments de faible masse molaire**, qui peuvent altérer les performances d'un polymère.

- **Valider les conditions de polymérisation**, en analysant les fractions de monomères résiduels et en contrôlant l'achèvement des réactions chimiques.

La SEC est ainsi un outil de choix pour les industriels de la plasturgie, de l'automobile, des composites et des revêtements, leur permettant de s'assurer que leurs matériaux répondent aux exigences de qualité et de durabilité.

II.7.2. Caractérisation des protéines et des macromolécules biologiques

En biochimie et en biotechnologie, la SEC est couramment employée pour l'analyse des protéines, des enzymes et des complexes biomoléculaires. Contrairement aux autres méthodes chromatographiques qui peuvent interagir chimiquement avec les analytes, la SEC permet une séparation douce, préservant la structure native des protéines.

Les principales applications en biologie moléculaire incluent :

- **L'étude des agrégats protéiques**, particulièrement en recherche pharmaceutique pour évaluer la stabilité des formulations biologiques (anticorps monoclonaux, vaccins).
- **La purification des biomolécules**, notamment lors de la production de protéines recombinantes, en retirant les contaminants de petite taille.
- **L'analyse des interactions macromoléculaires**, en déterminant les conformations et les poids moléculaires des complexes protéines-protéines ou protéines-ADN.
- **Le dessalage et la préparation des échantillons**, en éliminant les sels et les petites molécules avant des analyses ultérieures.

II.7.3. Utilisation en industrie pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire

La SEC est également largement utilisée dans les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire pour garantir la qualité et la sécurité des produits finis.

- **En pharmacie**, elle est utilisée pour analyser la distribution des masses moléculaires des polymères utilisés comme excipients, mais aussi pour contrôler la stabilité des formulations protéiques et l'élimination des contaminants dans les produits biopharmaceutiques.
- **Dans l'industrie cosmétique**, la SEC permet de caractériser les polymères présents dans les gels, crèmes et formulations capillaires afin de garantir la stabilité des textures et l'efficacité des principes actifs. Elle est aussi employée pour vérifier la migration de certains additifs dans les emballages cosmétiques.

- **Dans l'agroalimentaire**, la SEC est utilisée pour analyser les polysaccharides présents dans les additifs alimentaires, mais aussi pour caractériser la structure des protéines végétales et animales utilisées dans les formulations alimentaires et les substituts protéiques.

II.7.4. Importance dans la recherche et développement

La chromatographie d'exclusion stérique permet aux chercheurs d'analyser la structure et le comportement des macromolécules, en offrant une vision précise de leur distribution en taille et de leurs propriétés physico-chimiques.

- **Développement de nouveaux matériaux**, en caractérisant la structure et la réactivité des polymères innovants.
- **Étude des biomatériaux et des nanotechnologies**, où la taille et la conformation des macromolécules jouent un rôle fondamental dans leurs propriétés fonctionnelles.
- **Analyse des systèmes macromoléculaires complexes**, tels que les micelles, les hydrogels ou les réseaux polymères utilisés en ingénierie biomédicale.