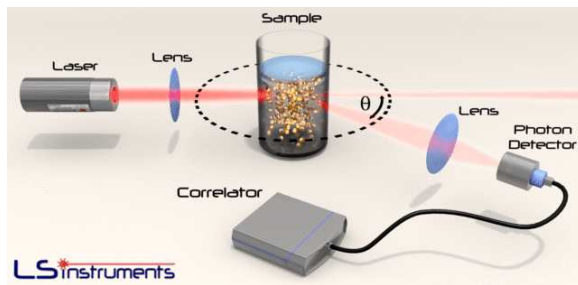


Diffusion de rayonnement (lumière statique et dynamique) Application à l'étude de macromolécules en solution



Master 2 Polymères et surfaces

Université Rouen Normandie



Luc Picton

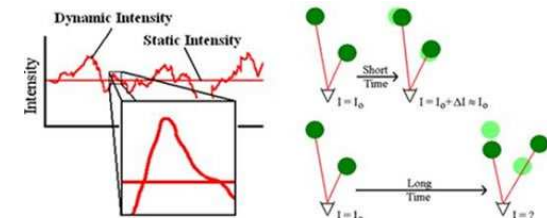
Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces
UMR6270 CNRS Université Rouen Normandie



Batiment Dulong, Mont Saint Aignan

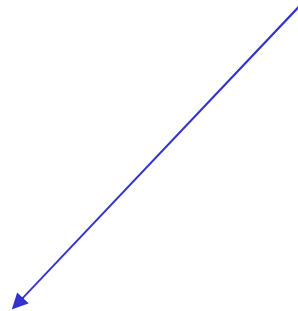
@ luc.picton@univ-rouen.fr

02 35 14 00 71



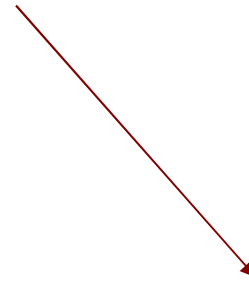
Diffusion de rayonnement
(lumière statique et dynamique)
Application à l'étude de macromolécules en solution

Que nous apportent les expériences de diffusion de rayonnement?



Propriétés statiques

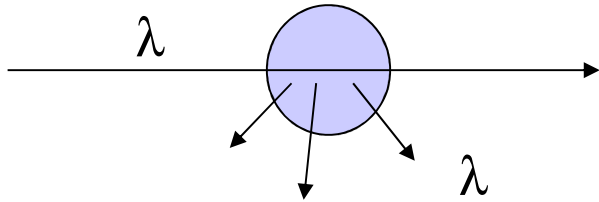
Occupation de l'espace
Masse molaire
rayons de giration
conformation, structure
interactions



Propriétés dynamiques

Mouvements des molécules
Coefficient de diffusion
rayons hydrodynamiques

Les techniques de diffusion de rayonnement sont basées sur les interactions électromagnétiques - matière



3 cas à envisager :

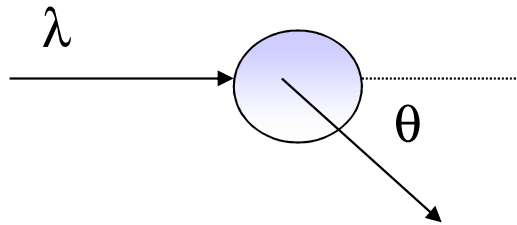
- Pas d'interaction : transmission
- Absorption d'énergie
chaleur,
réaction chimique,
ré émission (fluorescence, phosphorescence)
- **Diffusion élastique à la même λ
dans toutes les directions de l'espace**

Impossible de décrire le mouvement de chaque particule par la mécanique classique.

Le mouvement d'une particule donnée est imprévisible.

D'un point de vue macroscopique, les propriétés peuvent être décrites par des lois statistiques

Intérêt de la diffusion



L'intensité diffusée dépend

- de λ et de θ
- de la taille et de la structure des particules diffusantes

La diffusion statique de la lumière (static light scattering SLS)

moyenne dans le temps l'intensité diffusée
sur toutes les conformations possibles et les mouvements de fluctuations

Multi Angle Laser Light Scattering (MALLS)

En faisant varier l'angle et la concentration
on peut alors accéder

- à la masse molaire moyenne en poids
- au facteur de forme
- aux rayons de giration (dans certains cas)
- au paramètre thermodynamique de solvation

Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering DLS)

Quasi-Elastic Light Scattering (QELS)

Photon Correlation Spectroscopie (PCS)

Les fluctuations de l'intensité diffusée dues aux mouvements locaux (mouvements Browniens) de particules diffusantes dans le temps peuvent être corrélées à courtes distances (ou sur des temps courts).

La fonction d'auto-corrélation de ces fluctuations temporelles de l'intensité diffusée peut alors être reliée au

- **Coefficient de diffusion,**
- **lui même relié au rayon hydrodynamique (R_h).**

Remarque : les techniques de diffusion de rayonnement sont différentes selon les sources de rayonnement : lumière (polarisabilité des molécules),

RX (nuages électroniques), neutrons..

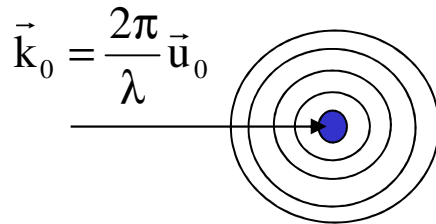
Mais elles répondent toutes aux mêmes formalismes

Diffusion Statique de la Lumière

I- Propriétés et principes

Si on considère une onde plane monochromatique de longueur d'onde λ .

L'équation de propagation s'écrit :



$$\Psi(\mathbf{x}, t) = \Psi_0 \cdot e^{i(\omega t - \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{x})}$$

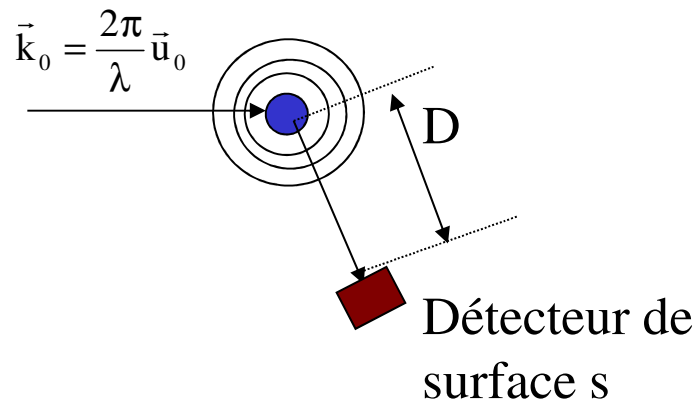
$k_0 = 2\pi/\lambda$ la norme du vecteur d'onde
 $\omega = 2\pi c/\lambda$ la pulsation

Cette onde peut être vue comme un ensemble de particules (faisceau de photons ou de neutrons) se déplaçant à la même vitesse et dans des directions parallèles.

Quand cette onde interagit avec un centre diffusant quelconque, elle est diffusée dans toutes les directions de l'espace. L'onde diffusée est **sphérique**.

L'hypothèse de diffusion **élastique** suppose que les particules ne perdent pas d'énergie lorsqu'elles sont diffusées

I-1 longueur de diffusion (b) pour un centre diffusant



● Centre diffusant

D : distance échantillon-détecteur

Remarque : l'onde diffuse avec une symétrie sphérique et la diffusion est élastique (même λ)

La probabilité que les photons soient réémis dépend de la surface des particules diffusantes : on définit alors la section efficace de diffusion (*surface de la particule diffusante « vue » par le rayonnement*)

$\sigma = (\text{nombre de particules diffusées}) / (\text{nombre de particules incidentes : flux})$

$$\sigma = \frac{I_{\text{diff}}}{\Phi} = 4\pi b^2$$

b : longueur de diffusion, intrinsèque à la particule diffusante (interaction de rayonnement)

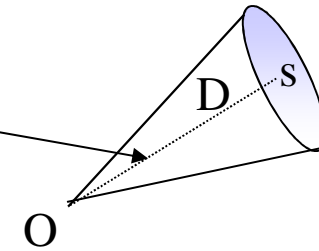
Intensité sur le détecteur

Si l'intensité totale diffusée dans toutes les directions est indépendante de D
 par contre l'intensité recueillie par le détecteur D
 est proportionnelle au rapport des aires (Ω)

$$I_{\text{détecteur}} = I_{\text{diffusée}} \cdot \Omega$$

$$\Omega = \frac{s}{4\pi D^2}$$

Ω , l'angle solide
 s la surface du détecteur
 D la distance échantillon-détecteur



$$I_{\text{détecteur}} = I_{\text{diffusée}} \cdot \frac{s}{4\pi D^2} \cdot \left(\frac{b^2}{b^2}\right)$$

$$\sigma = \frac{I_{\text{diff}}}{\Phi} = 4\pi b^2 \longrightarrow I_{\text{diffusée}} \cdot \frac{1}{4\pi b^2} = \Phi$$

$$I_{\text{détecteur}} = \Phi \cdot s \cdot \left(\frac{b}{D}\right)^2$$

On peut alors exprimer la fonction d'onde
 par rapport à l'angle solide, donc par rapport à D

$$\Psi(D, t) = \Psi_0 \cdot \left(\frac{b}{D}\right) \cdot e^{i(\omega t - kD)}$$

Longueur de diffusion en fonction du rayonnement

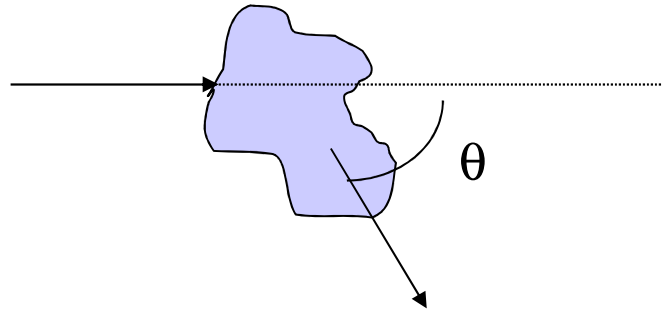
Lumière : $b=(k_0.n)^2.\alpha$

avec $b>0$, n : indice de réfraction et α : polarisabilité

RX : $b=Z.r_e$
avec Z : numéro atomique, $r_e = 0,282.10^{-12}\text{cm}$ (rayon de l' e^-)

Neutrons b lié aux interactions nucléaires
expérimental ($>$ ou < 0)

I-2 Diffusion pour un ensemble de centres diffusants



Chaque particule va diffuser la lumière
mais tous ces rayonnements émis
vont interférer entre eux



Ces interférences vont permettre de déterminer
la structure du composé diffusant

Si N particules diffusent
 $i = (1, 2, \dots, N)$

l'onde diffusée par la particule 1, au point O est :

$$\Psi_1 = \Psi_0 \cdot \left(\frac{b_1}{D}\right) \cdot e^{i(\omega t - kD)}$$

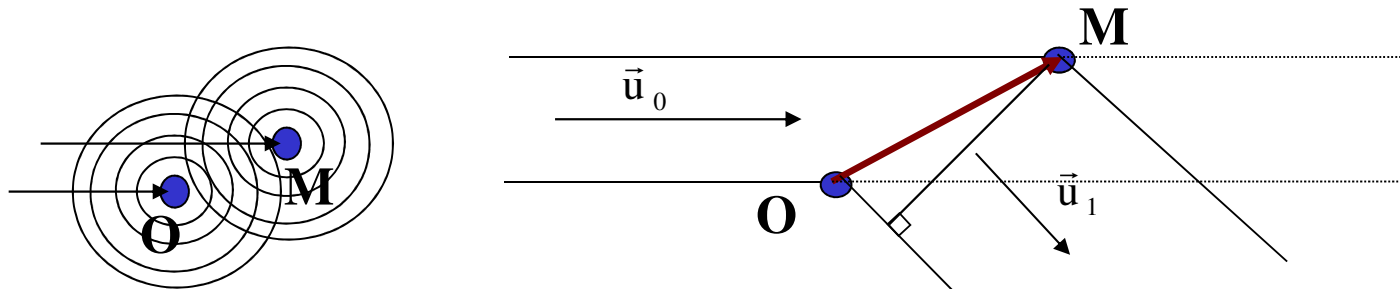
l'onde diffusée par la particule i au point M est :

$$\Psi_i = \Psi_0 \cdot \left(\frac{b_i}{D}\right) \cdot e^{i(\omega t - kD - \varphi_i)}$$

Il apparaît
une différence de phase
entre ces 2 ondes de
déphasage : φ_i

Vecteur de diffusion ou fonction d'onde : q

Les ondes diffusées par différentes particules vont interférer.
 Pour calculer ces interférences, il faut calculer les différences de marche
 des ondes diffusées dans une direction donnée définie par exemple
 par un vecteur unitaire \vec{u}_1

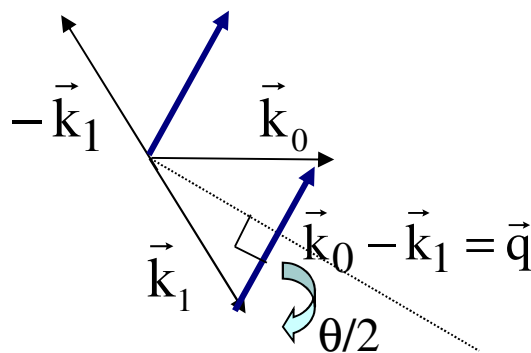


Différence de marche : $\Delta x_i = \vec{r}_i \cdot \vec{u}_0 - \vec{r}_i \cdot \vec{u}_1 = \vec{r}_i \cdot (\vec{u}_0 - \vec{u}_1)$

Différence de phase
 des ondes diffusées

$$\Delta \varphi_i = \vec{r}_i \cdot (\vec{k}_0 - \vec{k}_1) = \vec{r}_i \cdot \vec{q}$$

avec $k_0 = k_1 = \frac{2\pi}{\lambda}$



$$\sin(\theta/2) = \frac{q/2}{k}$$

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Si $\varphi(x, t)$ est l'onde diffusée
 par une origine O, l'onde
 diffusée par un point M,
 tel que $\vec{OM} = \vec{r}$, est
 $\varphi(x, t) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}}$

Ordre de grandeur du vecteur de diffusion (fonction d'onde) q

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

q est un paramètre très important de la diffusion
il permet d'étudier la structure et la conformation des particules
diffusantes en fonction de l'échelle d'observation
(fonction de λ et de θ)
 q est homogène à l'inverse d'une longueur d'onde
donc à l'inverse d'une longueur.

q^{-1} est l'ordre de grandeur de la taille d'observation
 q représente en fait l'inverse de l'échelle d'observation
quand $q \nearrow$, on \nearrow le « grossissement » de notre observation

Lumière :	$300\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$ $10^\circ < \theta < 150^\circ$	$0,002 < q < 0,05$ objet de 500nm à 20nm
Neutrons	$0.3\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,3^\circ < \theta < 20^\circ$	$0,02 < q < 5$ objet de 50nm à 0,2nm
RX	$0,1\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,1^\circ < \theta < 10^\circ$	$0,006 < q < 10$ objet de 160nm à 0,1 ¹² nm

Expression de la fonction d'onde d'une particule i

$$\Psi_i = \frac{\Psi_0}{D} \cdot e^{i(\omega t - kD)} \cdot b_i \cdot e^{-iqr_i} \quad q \cdot r \text{ est le déphasage } \phi_i$$

Si on considère le cas général de la diffusion par un échantillon constitué de N atomes identiques, l'onde diffusée est la somme des ondes diffusées par chaque atome :

$$\Psi_{\text{totale}} = \Psi = \sum_{i=1}^N \Psi_i = \frac{\Psi_0}{D} \cdot e^{i(\omega t - kD)} \cdot \sum_{i=1}^N b_i \cdot e^{-iqr_i}$$

L'intensité diffusée est égale au carré du module de l'onde.

C'est à dire la moyenne dans le temps et sur toutes les orientations et conformations des centres diffusants

$$\langle I_{\text{diff}} \rangle = \langle \Psi \cdot \Psi^* \rangle$$

$$I_{\text{diff}} = I_q = \left\langle \frac{\Psi_0^2}{D^2} \cdot \left(\sum_i b_i e^{-iqr_i} \right) \cdot \left(\sum_j b_j e^{+iqr_j} \right) \right\rangle$$

$$I_{\text{diff}} = I_q = \left\langle \frac{\Psi_0^2}{D^2} \cdot \sum_i \sum_j b_i b_j e^{iq(r_j - r_i)} \right\rangle$$

Expression générale de l'intensité diffusée

Pour s'affranchir de la distance échantillon-détecteur (D)
et de l'intensité incidente (I_0), on exprime la
section efficace différentielle de diffusion de l'échantillon : $I'(q)$

$$I'_q = I_0 \cdot \left(\frac{D^2}{I_0} \right) = \left\langle \sum_i \sum_j b_i b_j e^{iq(r_j - r_i)} \right\rangle$$

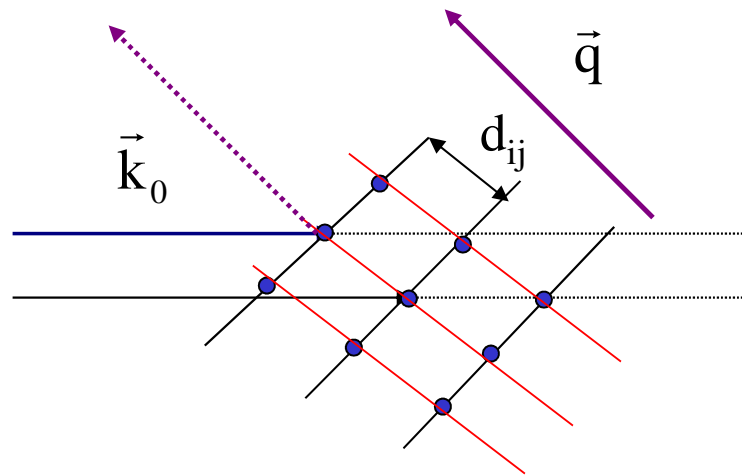
Si les centres diffusants sont identiques alors $b_i = b_j$

$$I'_q = \left\langle b^2 \cdot \sum_i \sum_j e^{iq(r_j - r_i)} \right\rangle$$

Les vecteurs r_i et r_j sont en permanence variables.
C'est la raison pour laquelle on doit exprimer l'intensité diffusée
sous la forme d'une moyenne statistique.

Diffusion par un milieu homogène : différence entre diffusion et diffraction

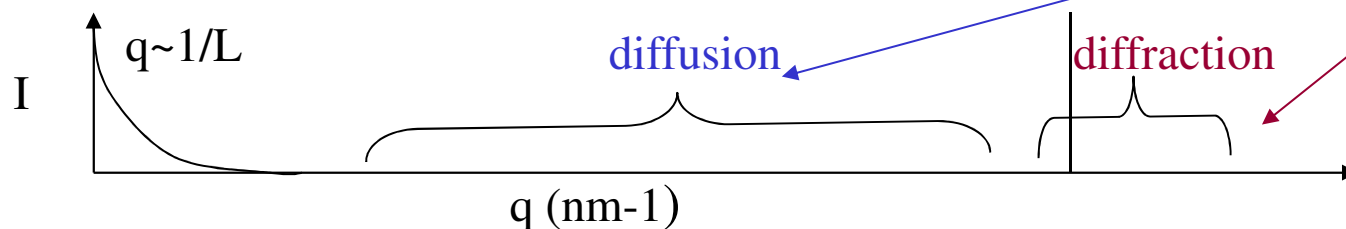
On considère la diffusion par des éléments de volume dV d'un échantillon. Si la diffusion est homogène, la longueur de diffusion (b) d'un élément de volume est alors constante dans tout l'échantillon, la section efficace différentielle est : $I'_q = \left\langle b^2 \cdot \sum_i \sum_j e^{-iq(r_{ij})} \right\rangle$



Si l'échantillon est un cristal parfait, il existe des vecteurs d_{ij} privilégiés qui se retrouvent dans tout le cristal et pour lesquels **les ondes diffusées sont en phase** : $q \cdot d_{ij} = n \cdot 2\pi$
 cette relation est la loi de Bragg, elle donne les directions des maximum d'interférence (pic de Bragg) on a alors un phénomène de diffraction.

Pour un milieu homogène, on peut observer de la **diffraction sur une très petite échelle**.

Mais à plus grande échelle, il existe toujours (à la différence d'un cristal parfait), **une différence de phase** (même très petite) qui de proche en proche va annuler l'onde résultante par interférence en opposition de phase, on entre dans le **régime de diffusion**.



En fait, à une certaine échelle de q , un milieu dit « homogène » ne l'est plus.

Expression de I_q en fonction de la densité de particule (autre formulation)

Il peut être utile pour l'exploitation et le développement expérimental des techniques de diffusion, d'exprimer l'intensité diffusée en fonction de la densité de particule $P(r)$ dans un volume dr .

Si les centres diffusants sont identiques ($b_i=b_j$)

$$I'_q = \left\langle b^2 \iint_V P(\vec{r}).P(\vec{r}').e^{-iq(r-r')} d\vec{r}.d\vec{r}' \right\rangle$$

Rq : il n'y a pas de diffusion si $q=0$: transmission

La diffusion est due aux fluctuations des centres diffusant, donc aux fluctuations de densité notamment en raison des changements d'orientation des centres diffusants (mouvements browniens).

On exprime ces fluctuations par la variation entre la densité et la densité moyenne

I-3 Intérêt de la diffusion quand $q \rightarrow 0$ ($\theta \rightarrow 0$)

Quand $q \rightarrow 0$ ($\theta \rightarrow 0$) : $e^{-iq(\vec{r}-\vec{r}')} \rightarrow 1$

$$I'_q \rightarrow I'_0 = \left\langle b^2 \iint_v P(\vec{r}).P(\vec{r}').d\vec{r}.d\vec{r}' \right\rangle$$

$$I'_q \rightarrow I'_0 = b^2 \left\langle \iint_v P(\vec{r}).P(\vec{r}').d\vec{r}.d\vec{r}' \right\rangle$$

$$I'_q = b^2 \overline{\Delta P}^2 \quad \text{Relation d 'Einstein (1910)}$$

$\overline{\Delta P}^2$ Carré moyen des fluctuations du nombre de particules diffusantes

Concrètement, ce sont les mesures de la densité de particules (ΔP) qui seront atteintes par l'expérience en fonction notamment des variations de

- concentration en soluté (C)
- angle d'observation (θ)

Dans un milieu solvant/soluté incompressible, les fluctuations de concentrations entraînent des variations de la pression osmotique (π) et de l'intensité diffusée (I'_q) qui peuvent être exprimées en fonction

- de la masse molaire du soluté (M)
- d'un développement du Viriel de la concentration (C)

Exemple : en osmométrie $\frac{\pi}{C} = RT.(\frac{1}{M} + A_2C + A_3C^2 + \dots)$

A₂ est le second coefficient du Viriel, il traduit les interactions thermodynamiques de solvation entre le soluté et le solvant

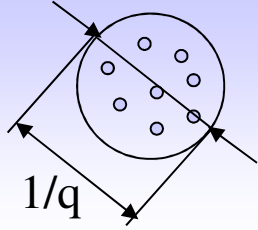
Quand	C → 0	$\pi \approx RT. \frac{C}{M}$	→	Osmométrie sensible aux faibles masses
Quand et	C → 0 q → 0	$I'_{(q \rightarrow 0)} \approx k.C.M$	→	Diffusion sensible aux fortes masses (adaptée aux polymères)

Conséquence : la diffusion de la lumière est aussi très sensible à toute présence de poussières et/ou d'agrégats qui sont sources de sur diffusion par rapport aux solutés (polymère)

I-4 Diffusion à un angle quelconque : variation de q

Nous avons déjà évoqué que $1/q$ est l'échelle de longueur de ce que l'on observe :
idéalement $1/q \sim R$, avec R dimension de l'objet observé

q faible : $R \ll 1/q$

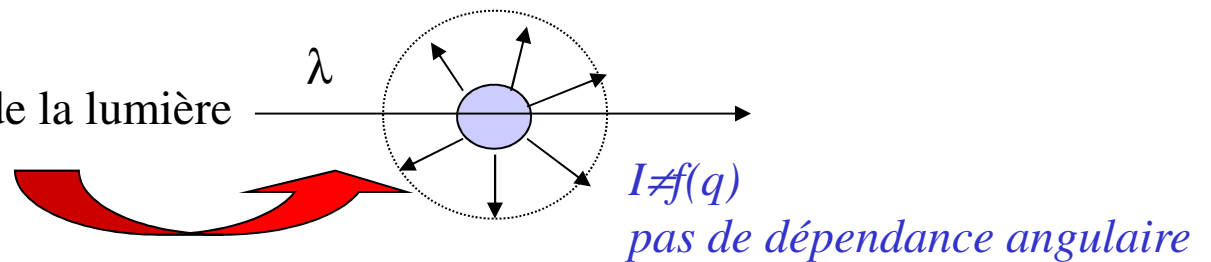


○ Objet observé de dimension R

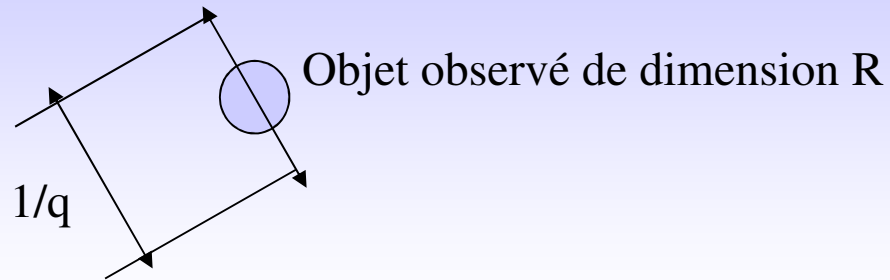
On ne peut pas distinguer la structure interne des molécules ou des macromolécules
on sonde à une **échelle trop grande par rapport aux dimensions de l'objet**

Ce cas est rencontré pour

- de très faibles valeurs de q (ou de θ) :
diffusion de la lumière à petit angle
- de très faibles valeurs de R :
diffusion isotrope de la lumière



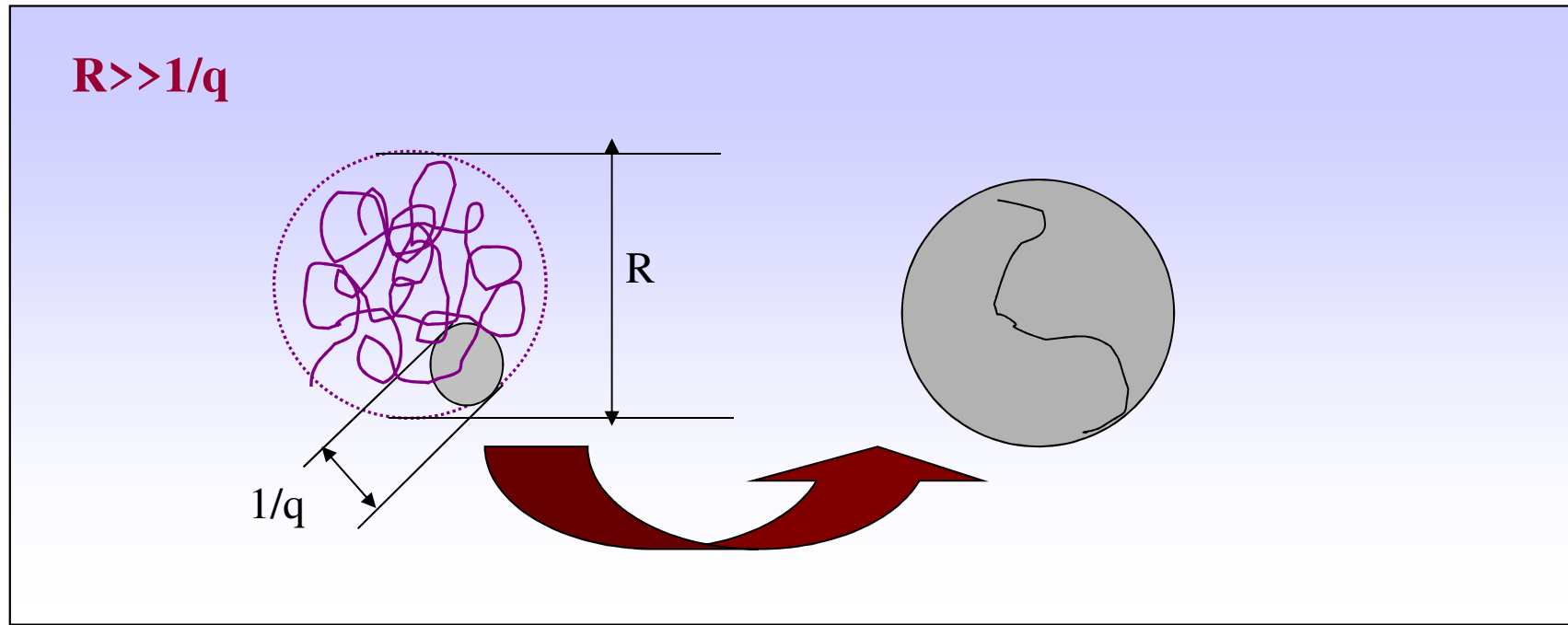
$R < 1/q$ (mais du même ordre de grandeur) : domaine de Guinier



La diffusion dépend de q donc de la dépendance angulaire, l'intensité diffusée est sensible aux dimensions de l'objet sondé en fonction de q .
On peut alors accéder au **rayon de giration (R_g)** en solution diluée afin de s'affranchir des interactions à courtes distances.

R_g est le rayon de la sphère (creuse) qui aurait le même moment d'inertie.

c est la moyenne des distances des segments au centre de gravité de la sphère équivalente



- **On ne « voit » qu'une partie de l'objet :**
on ne peut donc pas accéder aux dimensions de l'objet
mais on peut accéder aux dimensions interne de la particule diffusante
(souvent un polymère)

Remarque : Dans ce régime de diffusion, l'intensité diffusée n'est plus sensible aux interactions

**Comme nous l'avons déjà mentionné
l'échelle d'observation d'un objet de dimension R
dépend de q**

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

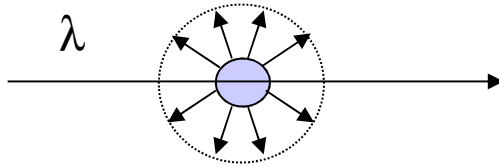
Donc l'échelle d'observation dépend de

- * λ , la longueur d'onde c'est à dire le type de rayonnement
- * θ , l'angle de diffusion

Lumière :	$300\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$ $10^\circ < \theta < 150^\circ$	$0,002 < q < 0,05$ objet de 500nm à 20nm
Neutrons	$0.3\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,3^\circ < \theta < 20^\circ$	$0,02 < q < 5$ objet de 50nm à 0,2nm
RX	$0,1\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,1^\circ < \theta < 10^\circ$	$0,006 < q < 10$ objet de 160nm à 0,1nm

I-5 Facteur de forme P(q) ou P(θ)

En régime dilué pour s'affranchir des interactions

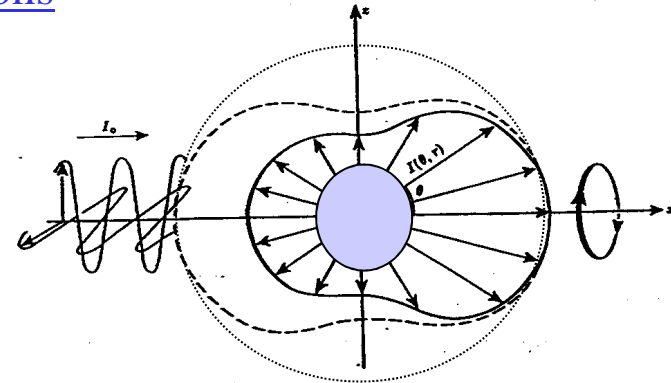


Diffusion isotrope

l'intensité diffusée est indépendante de l'angle d'observation.

$$qR \ll 1$$

$$Rg < \lambda/20$$



Diffusion anisotrope

l'intensité diffusée est dépendante de l'angle d'observation.

$$qR \leq 1$$

$$Rg > \lambda/20$$

$$P(q) = \frac{I_q}{I_0} \quad \text{Avec } P(q \rightarrow 0) = 1$$

P(q), le facteur de forme, peut être considéré comme le ratio entre l'intensité diffusée à q et l'intensité diffusée à q=0. Il est fonction de Rg et de la conformation de la macromolécule

$$I'_q = b^2 \left\langle \sum_i \sum_j e^{-iq(r_{ij})} \right\rangle \quad \text{On montre que :} \quad P(q) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_i \sum_j e^{-iq(r_{ij})} \right\rangle$$

Une moyenne sur toutes les orientations donne
$$P(q) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_i \sum_j \frac{\sin(q.r_{ij})}{q.r_{ij}} \right\rangle$$

N : nombre de centres diffusants dans la particules (macromolécules)

q : norme du vecteur d'onde

r : norme du vecteur reliant 2 centres diffusants i et j

Aux petits angles (faible valeurs de q) :

$$\frac{\sin(q.r_{ij})}{q.r_{ij}} = 1 - \frac{q^2.r^2}{6} + \frac{q^4.r^4}{5!}$$

Développement limité du 2^{ème} ordre

→ 0 quand q → 0

$$P(q) = 1 - \underbrace{\frac{q^2}{3} \frac{1}{2} \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j r_{ij}^2}_{\text{Rayon de giration}} + \frac{q^4}{5!} \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j r_{ij}^4 = 1 - \frac{q^2}{3} Rg^2 + \dots = P(q)$$

Expression générale du facteur de forme

$$Rg^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_i \sum_j \bar{r}_{ij}^2$$

Rayon de giration : distance moyenne des centres diffusant par rapport au centre de masse (barycentre)

En fonction de la **conformation de la particule**
 (le plus souvent du polymère en solution),
 les distances moyennes par rapport au barycentre de masse
 sont reliées aux dimensions réelles de l'objet par des relations différentes.

**Rg ne traduit donc pas le volume réellement occupé par
 l'objet observé**

- **Pour une sphère de rayon réel R**

$$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2$$

(alors $R_g < R$)

- **Pour un bâtonnet de longueur L et de section b**

$$R_g^2 = \frac{L^2}{12} + \frac{b^2}{2}$$

- bâtonnet fin ($b \sim 0$) $R_g^2 = \frac{L^2}{12}$

- disque très fin ($L \sim 0$) $R_g^2 = \frac{b^2}{2}$

- **Chaîne gaussienne (dans les conditions Θ)
 (pelote statistique)**

$$R_g^2 = \frac{Nl^2}{6}$$

Avec l : longueur des segments

Variations du facteur de forme $P(q)$ aux grands angles (grands q)

Rappelons que $P(q)$ varie proportionnellement à l'intensité diffusée : $P(q) \sim I(q)$

Bâtonnet fin

(Rod Like)

si $qL \gg 1$

$P(q)$ varie en q^{-1}

l'intensité diffusée est inversement proportionnelle à q

Pelote statistique

(Random Coil)

si $qRg \gg 1$

$P(q)$ varie en q^{-2}

Sphère rigide

$P(q)$ varie en q^{-4}

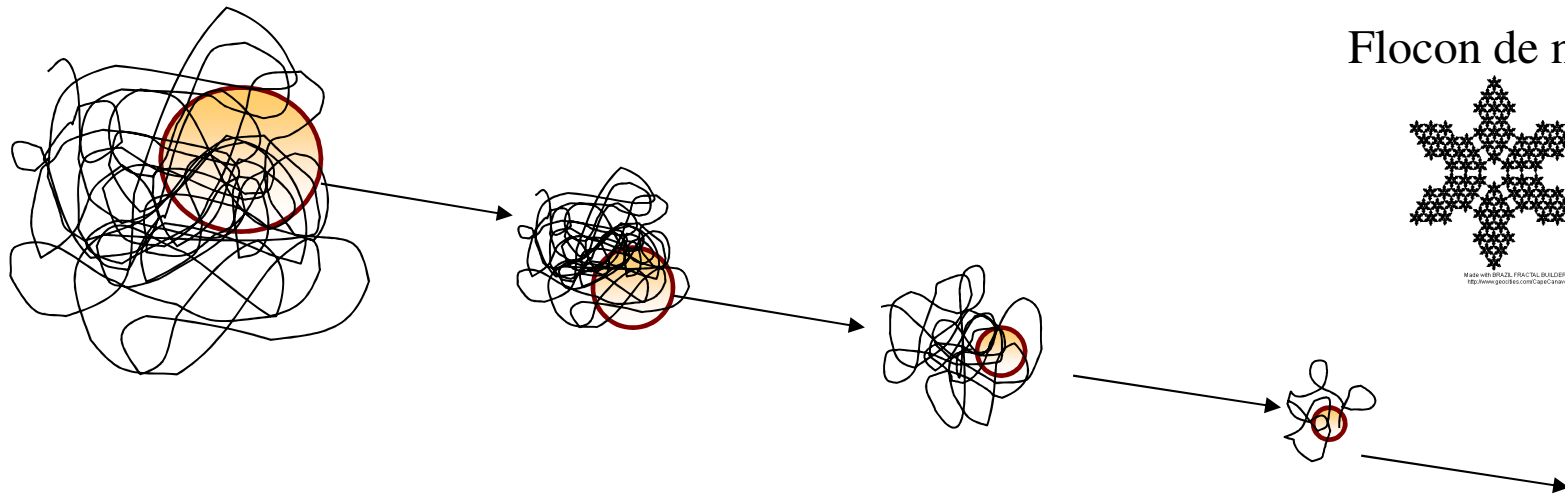
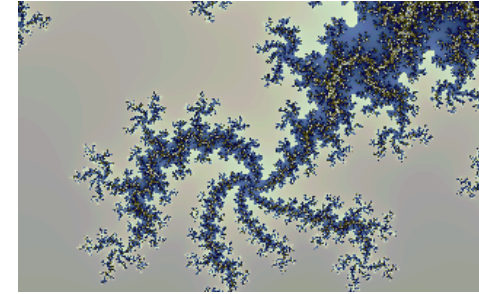
si $qR \gg 1$

I-6 Dimensions fractales

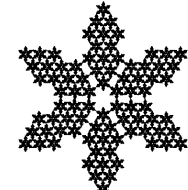
Il apparaît que $I(q)$ ou $P(q)$ sont proportionnels à q^{-D_f}

D_f peut être la dimension fractale de l'objet.

D_f représente l'auto-similarité quelque soit l'échelle d'observation



Flocon de neige



MADE WITH BRUCE FRACAL BUILDER - FREEMWARE
http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab1187

On retrouve les dimensions fractales dans de nombreux exemples naturels

Formes du chou-fleurs!

Formes des cotes de Bretagne

Forme des dépôts de neige

en fonction de l'altitude sur une montagne



Fougères

Évolution Rayon-Masse

Pelote statistique en solvant Θ en bon solvant
 $M \sim R^2$
ou $R \sim M^{1/2}$ $D_f = 2$ $D_f = 5/3$

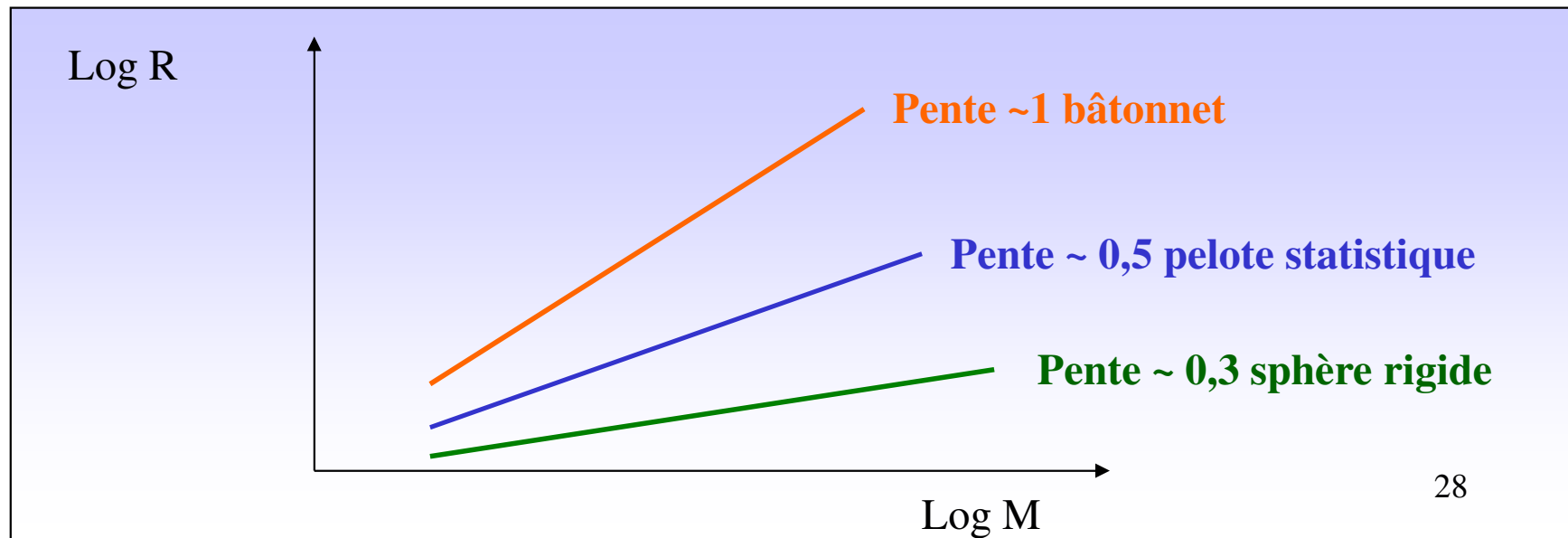
Bâtonnet $M \sim R$
 $R \sim M$ $D_f = 1$

Sphère rigide Attention, une telle conformation ne répond pas à une loi fractale

$$M \sim R^3$$
$$R \sim M^{1/3}$$

↓

$$P(q) \sim q^{-4}$$



Intérêt d'accéder aux dimensions fractales

Si l'on ne peut pas observer l'objet dans son échelle de dimension, mais que l'on peut, aux grands angles et selon le rayonnement utilisé, accéder à une échelle x plus petite telle que $x \ll R$

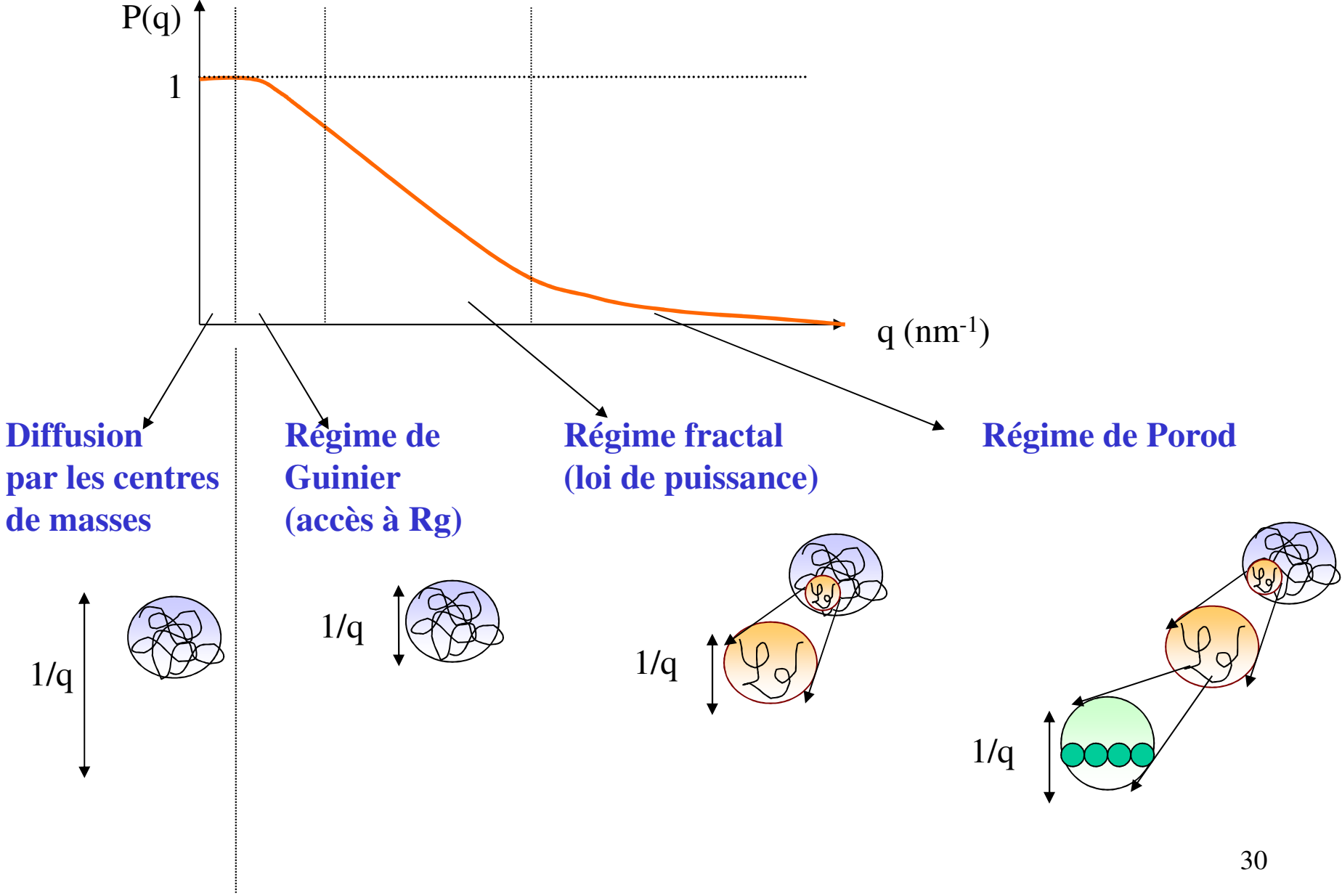
$$\text{Et comme } M \sim x^{-D_f}$$

La structure interne de l'objet peut alors renseigner sur la structure à plus grande échelle

Restrictions

- Les importantes distributions de tailles au sein d'un ensemble d'objet (polydispersité) peuvent largement fausser la détermination de D_f
- Les grandes valeurs de q ne peuvent plus être atteintes dans le régime de Porod

Conclusions sur le facteur de forme



Diffusion en régime concentré

La diffusion s'opère généralement en régime dilué afin de s'affranchir des interactions entre les objets diffusant

On peut aussi utiliser la diffusion en régime concentré si **on utilise les grands angles (grandes valeurs de q)** de façon à sonder des **zones d'échelle très petite** « à l'intérieur » du système (enchevêtré par exemple dans le cas des polymères)

Ainsi à très petite échelle, la diffusion n'est plus sensible aux interactions. On doit alors travailler avec les dimensions fractales

Il faut toutefois éviter le régime de Porod

I-7 facteur de contraste en diffusion de la lumière

$$K = b_{\text{app}}^2 \cdot \frac{N_a}{M^2} \quad \text{Le facteur de contraste en DDL}$$

$$b_{\text{app}} = b - b_0 \frac{V}{V_0}$$

b_{app} : la longueur de diffusion apparente
où V est le volume occupé par le soluté
 V_0 , le volume occupé par le solvant
 b , la longueur de diffusion du soluté
 b_0 , la longueur de diffusion du solvant

M : la masse molaire du centre (motif) diffusant

N_a : nombre d'Avogadro

En diffusion de la lumière : $b_{\text{app}} = \left(\frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \Delta\alpha$

Avec $\Delta\alpha$: polarisabilité $\Delta\alpha = \frac{1}{2\pi n_0} \cdot \left(\frac{dn}{dC} \right) \cdot \frac{M}{N_a}$

n_0 : indice de réfraction du milieu

(dn/dC) : incrément d'indice de réfraction du soluté dans le solvant

En introduisant b_{app} et $\Delta\alpha$ dans l'expression de K on obtient :

$$K = b_{app}^2 \cdot \frac{Na}{M^2}$$

$$\text{avec } b_{app} = \left(\frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \Delta\alpha = \left(\frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \frac{1}{2\pi n_0} \cdot \left(\frac{dn}{dC} \right) \cdot \frac{M}{Na}$$

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

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

Remarque :

- si $dn/dC \nearrow$, le contraste \nearrow
- $K \sim 1/\lambda^4$ la longueur d'ondes du rayonnement influence beaucoup le contraste

Facteur de contraste pour les autres techniques de diffusion de rayonnement

RX
$$K_{\text{RX}} = r_e^2 \cdot (\rho_e - \rho_{e,0})^2 \cdot v \cdot \frac{N_A}{M^2}$$

Avec les densités électroniques $\rho_e = \frac{Z}{v}$ du soluté
et $\rho_{e,0} = \frac{Z_0}{v_0}$ du solvant

Le contraste est donc fonction de la différence de densité électronique entre le soluté et le solvant

Neutrons : on fixe les longueur de diffusion expérimentalement

- le contraste est souvent bien supérieur à celui obtenu en diffusion de la lumière ou de RX
- mais le flux est bien inférieur à celui obtenu en diffusion de la lumière

Intérêt : il est possible d'éteindre le facteur de contraste d'une partie d'un mélange : « Quenching » avec du deutérium par exemple

II- Approche expérimentale en diffusion de la lumière

On définit $\Delta I = I_{\text{solution}} - I_{\text{solvant}}$

L'intensité diffusée par le soluté en régime dilué

A concentration faible (développement limité de $P(q)$)

$$\frac{KC}{\Delta R_{(q)}} = \frac{1}{M_w \cdot P(q)} + 2A_2 C + \dots$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \cdot \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \cdot \frac{1}{N_a} \quad q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

$\Delta R(q)$: Rapport de Rayleigh ($\sim I_{\text{diffusée}}$), normalisé par rapport à une référence (souvent le benzène)

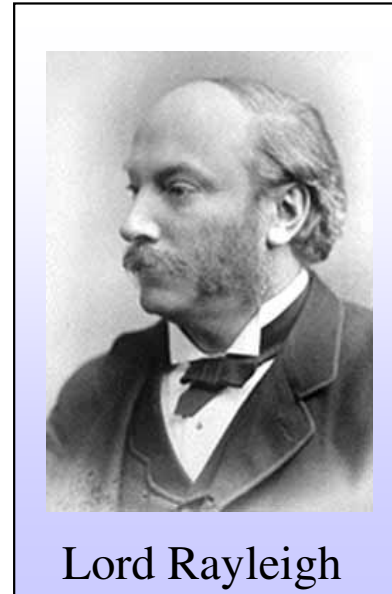
$$\frac{1}{P(q)} = 1 + \frac{q^2}{3} R_g^2 + \dots$$

A_2 : 2ème coefficient du Viriel

C : concentration en soluté

$$\frac{KC}{\Delta R(q)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{q^2}{3} R_g^2 + \dots \right) + 2A_2 C + \dots$$

Expression de la diffusion de la lumière



Accès à Rg, Mw et A₂

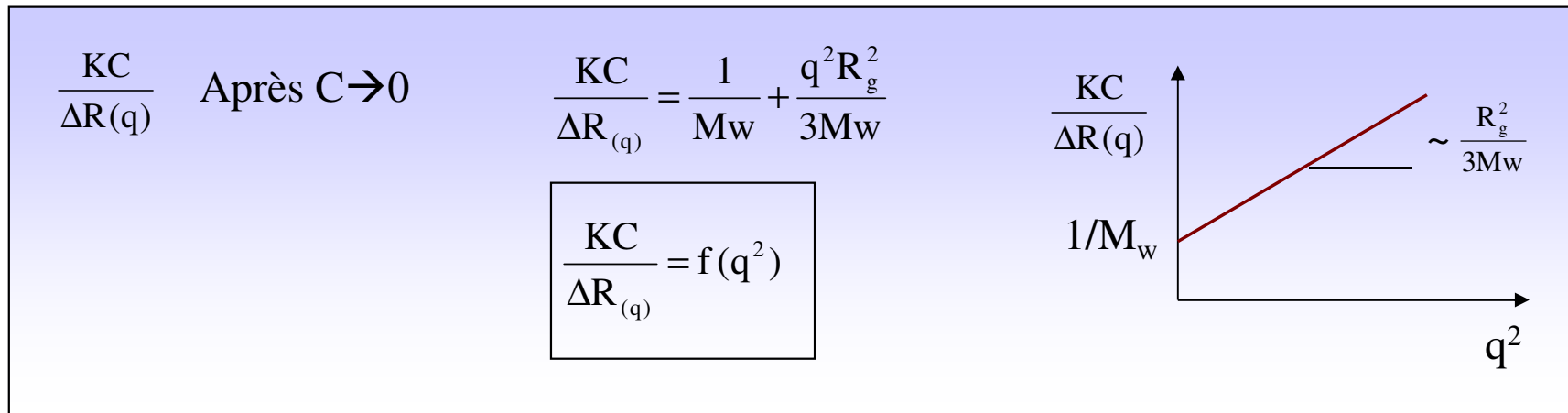
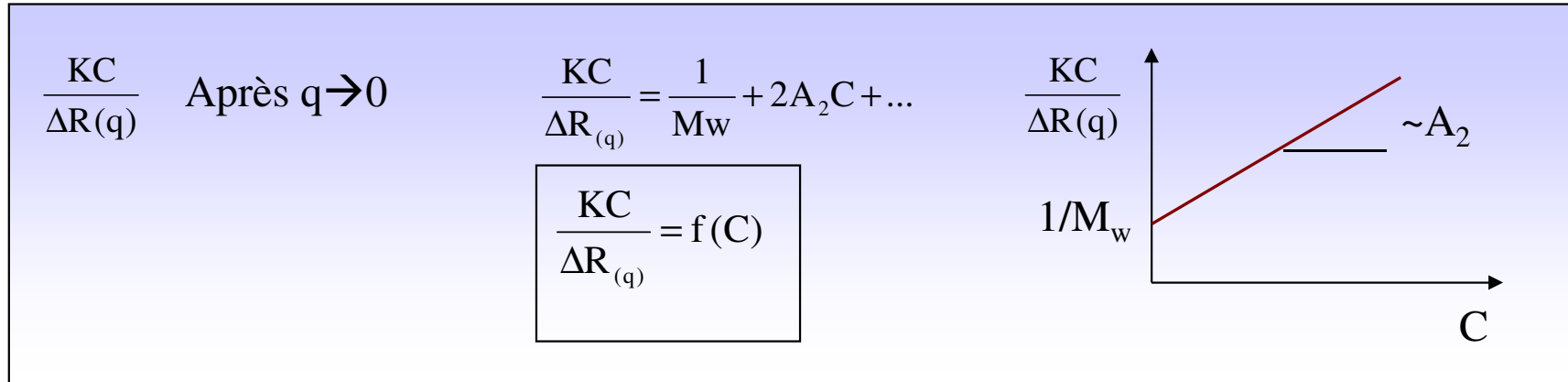


Diagramme de Zimm

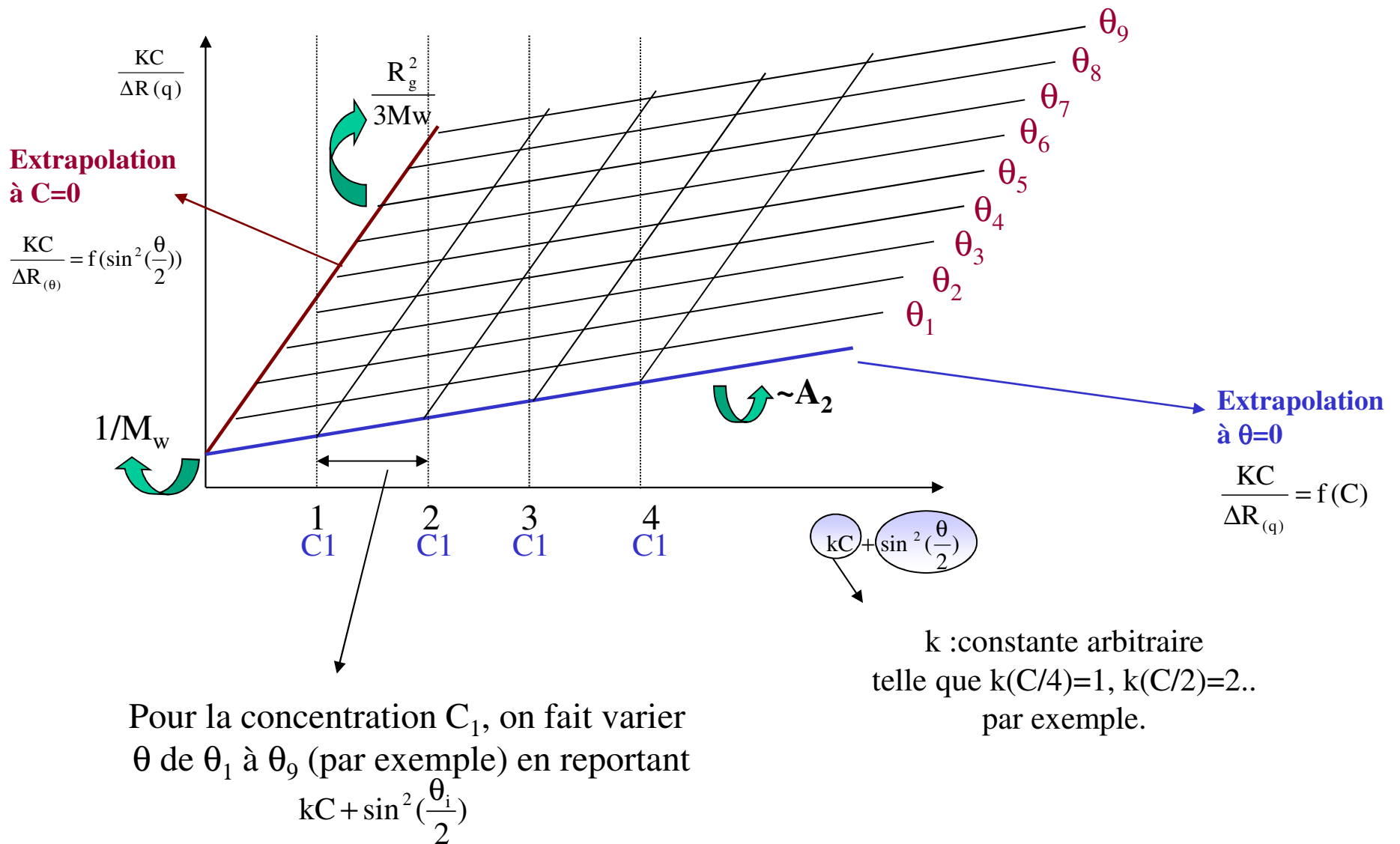
On exprime l'équation de diffusion de la lumière en fonction de θ et non de q

q est remplacé dans la relation générale de diffusion
par son expression en fonction de $\sin^2(\theta/2)$

$$q^2 = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)^2 = \frac{16\pi^2}{\lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

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

Expression de la diffusion de la lumière en fonction de θ



Remarque sur le tracé du Zimm-plot

Les petits angles sont souvent source de surdiffusion

* soit à cause de poussières : nécessité de travailler avec des solutions très bien filtrées

* soit à cause de la présence d'agrégats

Les grands angles sont parfois à éliminer en raison du facteur de forme qR_g , sortie du régime de Guinier

Quand R_g est trop grand

et/ou quand la conformation est particulièrement rigide

Attention aux masses molaires très élevées :

M_w est donnée par l'inverse de l'ordonnée à l'origine. Dans le cas de forte M_w ($1/M_w$ faible), une petite variation de $1/M_w$ entraîne une forte variation de M_w donc une grande incertitude.

Conséquence dans le cas de forte M_w , le A_2 doit être connu avec une grande précision

(dn/dc) et la concentration sont des paramètres à connaître avec beaucoup de précision

Concrètement de façon expérimentale

Il faut mesurer le rapport de Rayleigh $\Delta R(q)$ ou $\Delta R(\theta)$

On mesure :

$$\Delta R(\theta_{\text{soluté}}) = \Delta R(\theta_{\text{solution}}) - \Delta R(\theta_{\text{solvant}})$$

Le rapport de Rayleigh est un rapport entre l'intensité diffusée mesurée et l'intensité diffusée par une référence connue (Benzène, Toluène...)

$$\Delta I = \frac{I_0}{D^2} \cdot V(\theta) \cdot \Delta R(\theta)$$

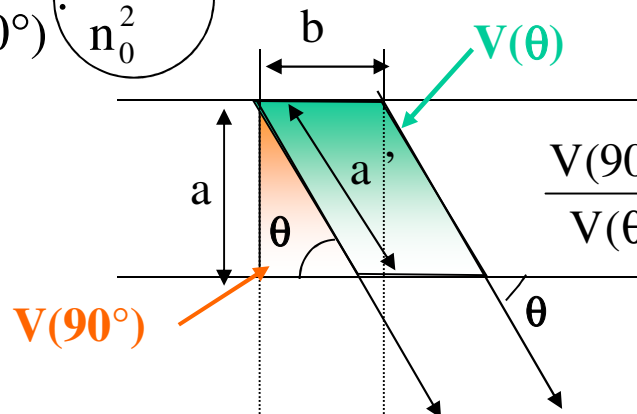
$$I_{\text{réf}} = \frac{I_0}{D^2} \cdot V(90^\circ) \cdot R_{\text{ref}}(90^\circ)$$

V: Volume diffusant à q et à 90°

$$\frac{\Delta I}{I_{\text{ref}}} = \frac{V(\theta)}{V(90^\circ)} \cdot R_{\text{ref}}(90^\circ) \cdot \frac{n_{\text{ref}}^2}{n_0^2}$$

Correction de la convergence
du faisceau entre la référence
et la solution

$$\frac{V(\theta)}{V(90^\circ)} = \frac{1}{\sin \theta}$$



$$\frac{V(90^\circ)}{V(\theta)} = \frac{abc}{a'bc} = \frac{a}{a'} = \sin \theta = \alpha$$

c : profondeur du volume

$$\Delta R(\theta) = \alpha \cdot \frac{\Delta I(\theta)}{I_{\text{ref}}(90^\circ)} \cdot \frac{n_0^2}{n_{\text{ref}}^2} \cdot R_{\text{ref}}(90^\circ)$$

Avec $\alpha = \sin \theta$

Limites expérimentales

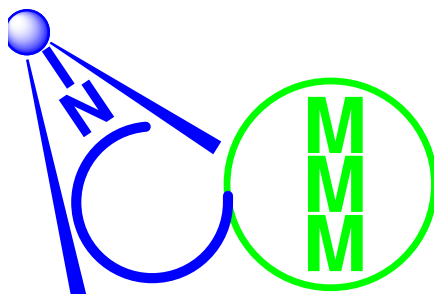
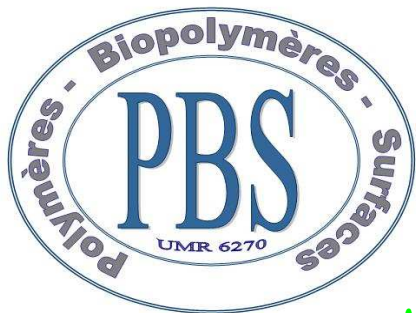
Diffusion isotrope : accès à M_w et A_2 , R_g inaccessible (si $R_g < \lambda/20$)
Diffusion anisotrope : accès à M_w , A_2 et R_g (si $R_g > \lambda/20$)

Limites sur les M_w : 10^4 à 10^7 g.mol⁻¹
modulées suivant
les conditions de concentration
le dn/dc
la sensibilité de l'appareil : λ et puissance laser

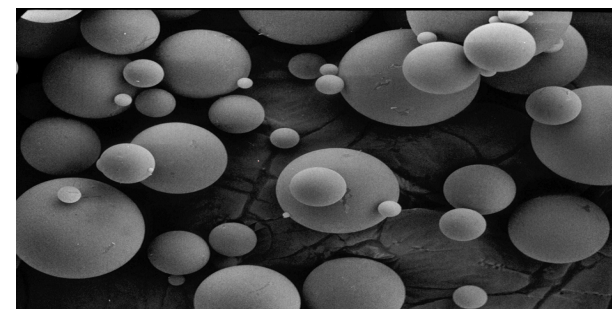
Limites sur les R_g : R_g minimum : ~15nm (limite d'anisotropie)
 R_g maximum : ~300nm (limite du régime de Guinier)

Limites de concentration : $I_{\text{diffusée}} \text{ solution} \sim 2 \text{ à } 5 \text{ fois } I_{\text{diffusée}} \text{ solvant}$
(5 à 10 si le solvant diffuse peu)

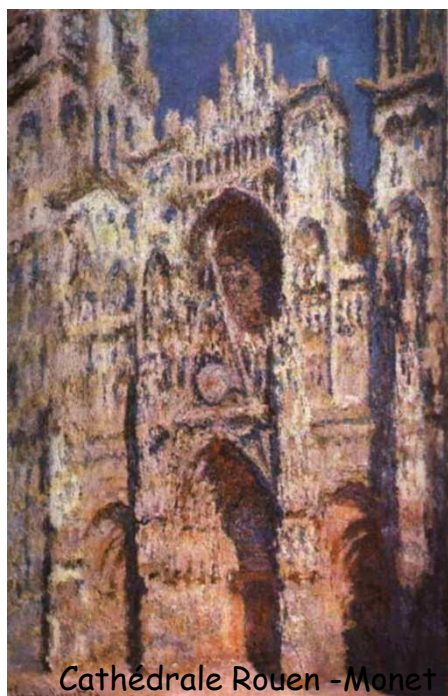
Comme $\Delta I_{\text{dif}} \approx C.M_w. \left(\frac{dn}{dC}\right)^2 \longrightarrow C \approx \frac{5}{M_w \left(\frac{dn}{dC}\right)^2}$



Institut Normand de Chimie
Moléculaire, Macromoléculaire et Médicinale
(INC3M)



Systemes Colloïdaux Complexes



Cathédrale Rouen - Monet

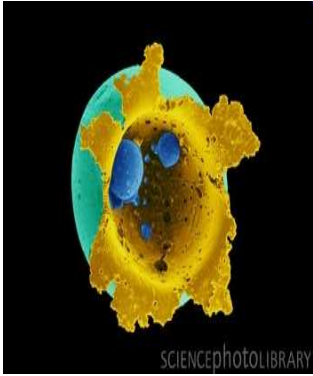


SEC ou F4 couplée MALLS/QELS/viscosimétrie : application à la caractérisation des polysaccharides

Luc Picton



Journée des Jeunes Polyméristes Lyonnais
17 septembre 2010



Problématique :

La caractérisation des polymères en solution notamment des **polysaccharides** est primordiale

Relation structure/propriétés des polymères

- Fonctionnalisation de polymères
Pour leur conférer des propriétés spécifiques
(Associative, stimuli ré pondante, vectorisation...)
- Contrôle des formulations en milieux aqueux

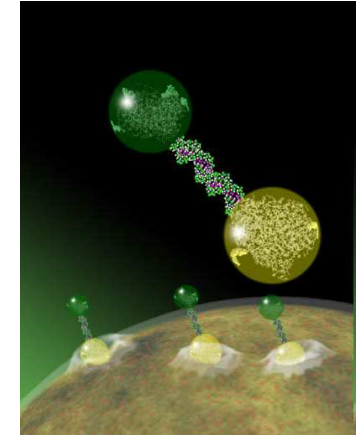
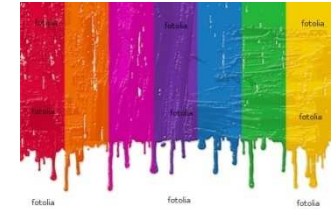


Photo : Pétrole jaillissant naturellement de la roche réservoir sous l'effet de la pression.



Propriétés visées

Contrôle rhéologique (texture : viscosifiant, gélifiant...)
Contrôle des interfaces (émulsions, dispersions...)
Système haute technologie : 'smart polymers'

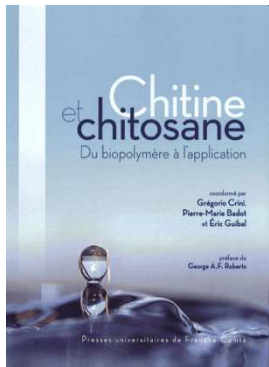


Applications

Agroalimentaire, cosmétique, forage pétrolier, galénique ('drug delivery'), industrie papetière, peinture...



Polysaccharides



Déjà intéressant intrinsèquement

Squelette semi-rigide

Forte masse molaire

Neutre ou polyélectrolyte

parfois Auto associatif

Parfois émulsifiant



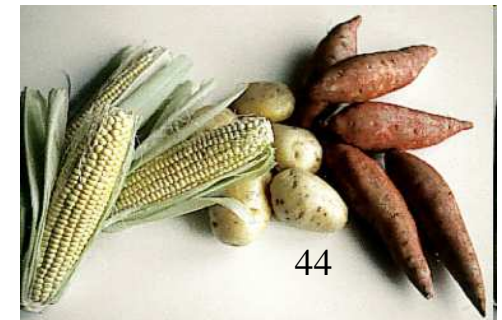
Agent de contrôle
rhéologique
(épaississant, gélifiant
émulsifiant)



Bio ressources (renouvelable)
Bonne biodégradabilité
souvent abondant
Bonne biocompatibilité

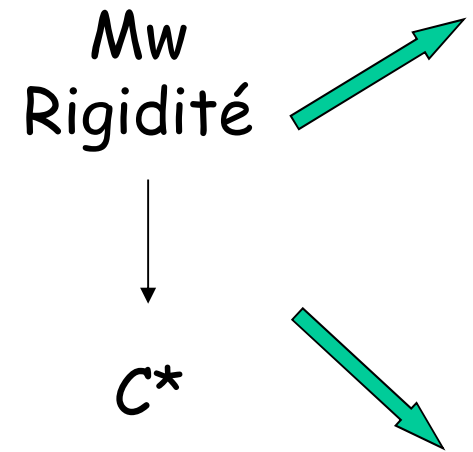
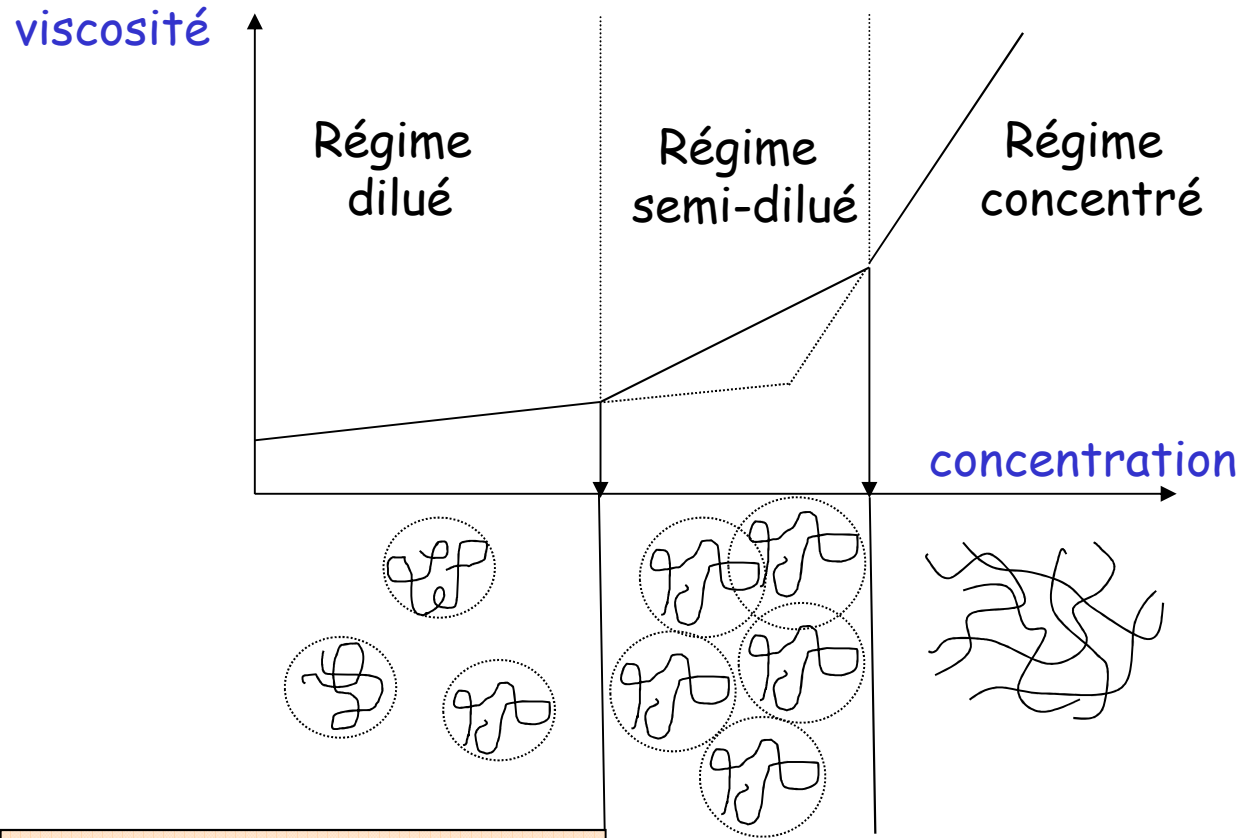


Bon candidat pour développer
- des 'smart polymers' ou polymères 'intelligents'
- des additifs de formulation 'verts'

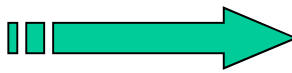


Exemple : propriétés rhéologiques :

Transition entre régime dilué et semi dilué



en dilué
Molécule isolée
Accès à une caractérisation
intrinsèque
du couple polymère/solvant



Applications les plus courantes

Quelles sont ces caractéristiques intrinsèques aux polymères en solution?

Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) ou en poids (M_p ou ' M_w ')

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

L'indice de polymolécularité (I_p) : $I_p = M_w/M_n$

Les dimensions :

R_g : le rayon de giration

(distances statistiques des éléments i de la chaîne au barycentre de masse)

R_h : le rayon hydrodynamique

(Rayon de la sphère dure ayant un coefficient de diffusion équivalent)

La viscosité intrinsèque $[\eta]$

également reliée aux dimensions par la relation de Flory-Fox

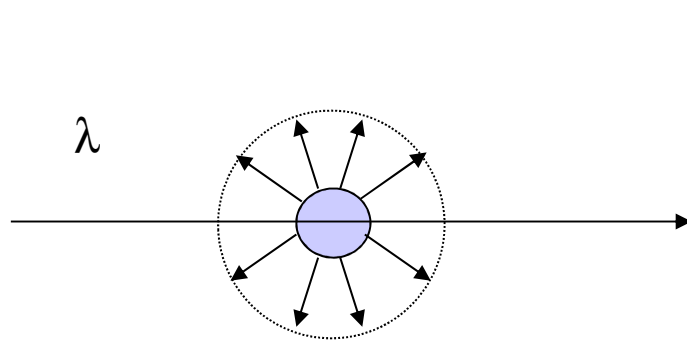
$$[\eta].M \sim V_h$$

La diffusion de la lumière statique multi angles : MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering)



Basée sur la mesure de l'intensité diffusée par un objet (macromolécule en solution) à différents angles : I_θ

$I_\theta \sim$ Masse molaire ET de la concentration



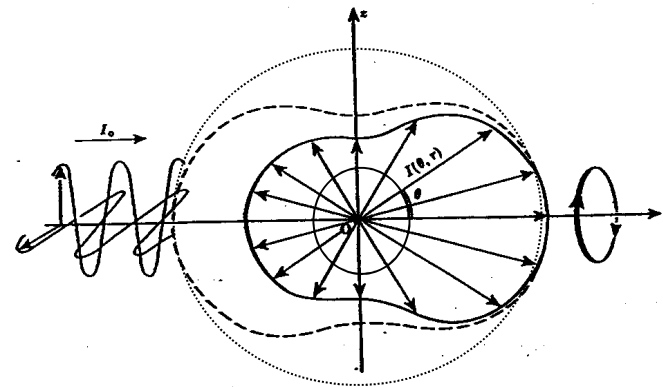
Diffusion isotrope

l'intensité diffusée est indépendante de l'angle d'observation.

$$qR_g \ll 1$$

$$R_g < \lambda/20$$

Accès Mw mais par R_g



Diffusion anisotrope

l'intensité diffusée est indépendante de l'angle d'observation.

$$qR_g \leq 1$$

$$R_g > \lambda/20$$

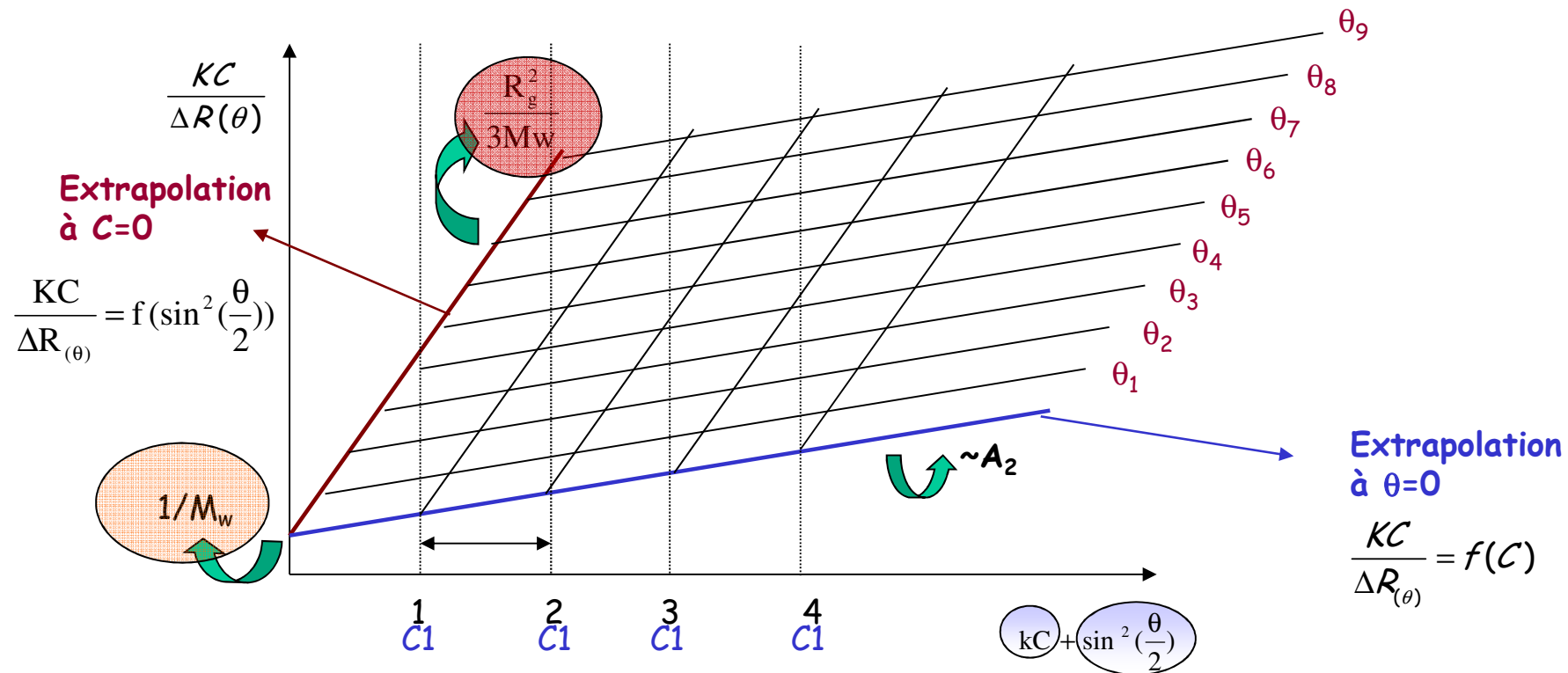
Accès Mw et R_g

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Zimm-plot

La quantité de lumière diffusée est directement proportionnelle au produit de la **masse molaire** et de la **concentration** (UV et/ou RI).

La variation d'intensité de lumière diffusée en fonction de l'angle de mesure est proportionnelle à la **taille** des molécules.



$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \dots \right) + 2A_2 C + \dots$$

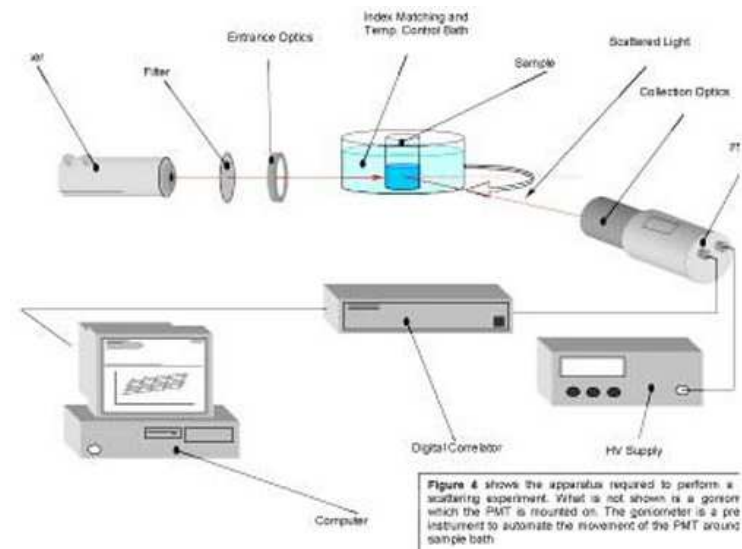
Expression de la diffusion de la lumière en fonction de θ

Diffusion de la lumière - MALLS en 'Batch'

Intérêt : Accès M_w , A_2 et parfois R_g
(si taille $> 20-30\text{nm}$)

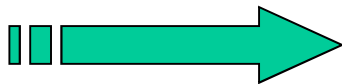
Bien adaptée aux polymères
car sensibilité \nearrow quand $M \nearrow$

Limites : surtout en milieux aqueux



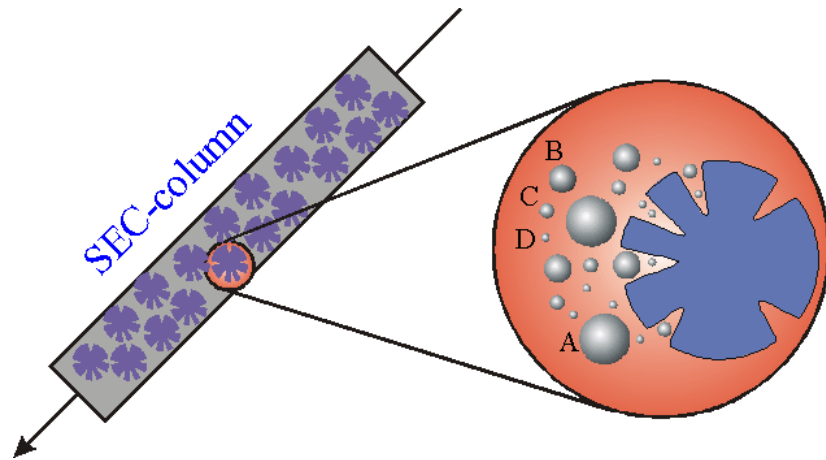
diffusion très sensible surtout aux petits angles

- Poussières : nécessité de toujours filtrer (mini sur $0,45\mu\text{m}$)
- Présence d'agrégats qui faussent le résultat final
surestimation de M_w
- Impossibilité de quantifier en quantité et en M_w les éventuels agrégats
ou la présence d'autres composés macromoléculaires
- Impossibilité d'accéder à M_n donc pas d'info sur la polymolécularité



**Solution : couplage MALLS
avec une technique de séparation stérique
SEC ou Size Exclusion Chromatography**

SEC seule :

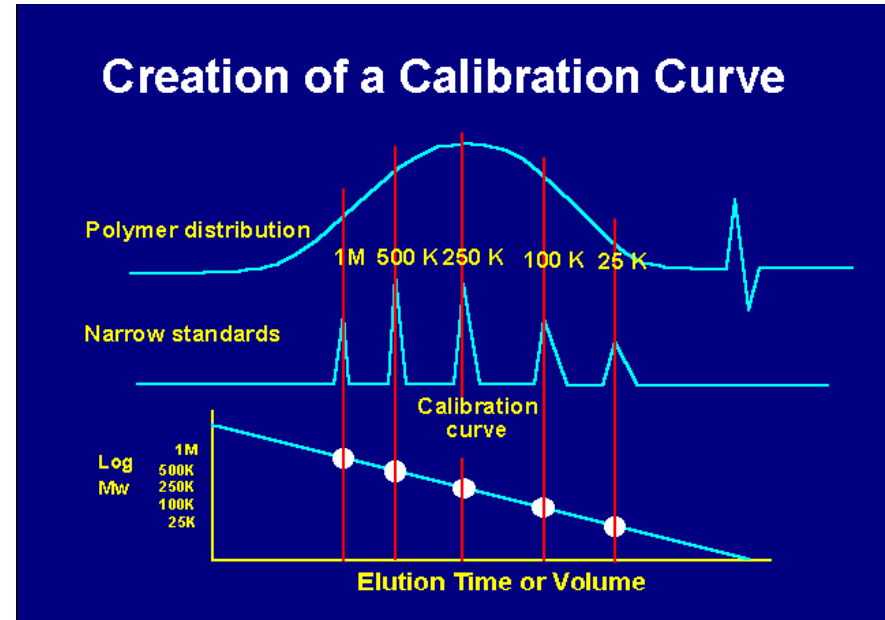


Si séparation gaussienne :

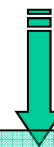
On applique

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

Ip, distribution des espèces



Il faut affecter à chaque Volume d'éluion (i.e. un volume hydrodynamique du polymère) Une masse molaire



Nécessite un étalonnage - source d'erreur

SEC seule :

Limites : - choix des colonnes (limite d'exclusion, phase stationnaire, hautes pressions)

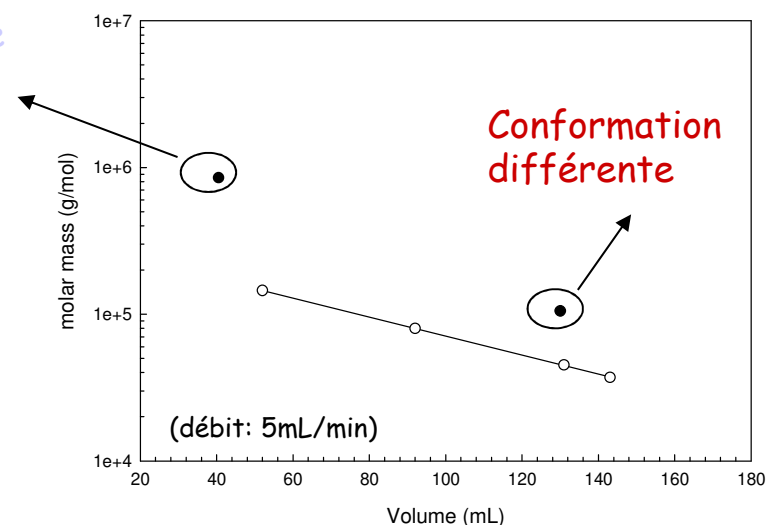
- choix des étalons utilisés pour la calibration

Exemple

temps de rétention sur gel Séphadex™ de protéines dont on connaît M.

	M (g/mol)	T rétention (min)
Thyroglobuline	850 000	8.1
Aldolase	145 000	10.4
Porine	105 000	26
Phosphatase alcaline	80 000	18.4
Ovalbumine	45 000	26.2
lactoglobuline	37 100	28,6

Hors gamme stérique



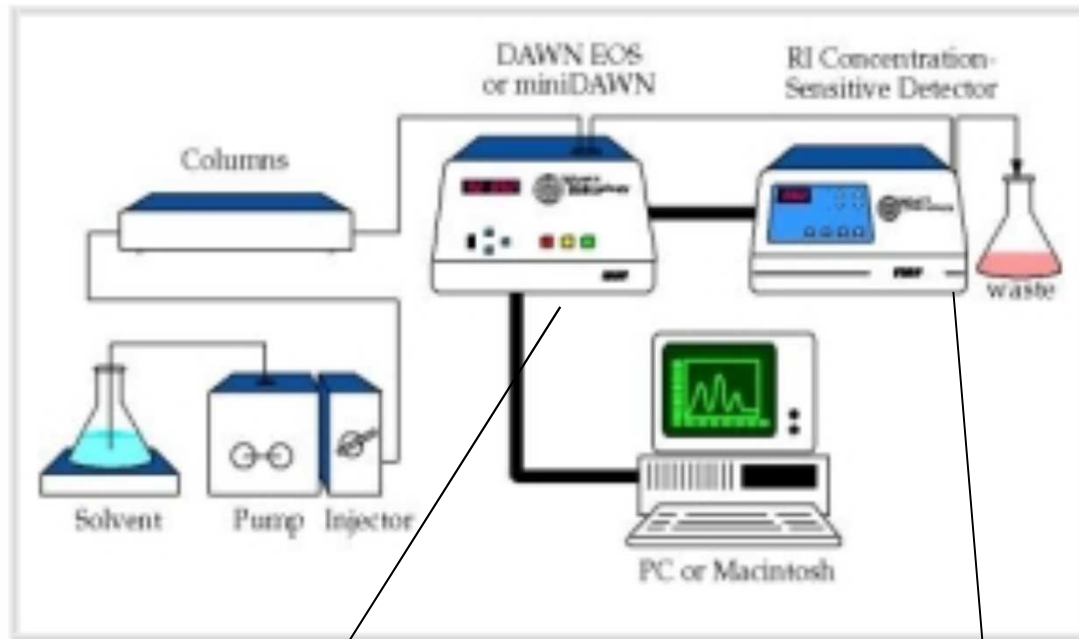
Conclusion : les étalons et le composé à analyser doivent **IMPERATIVEMENT**
Avoir la même conformation pour pouvoir associer
Volume d'élution ~ masse molaire

SEC intéressante du point de vue de la séparation
MALLS intéressante du point de vue de l'analyse

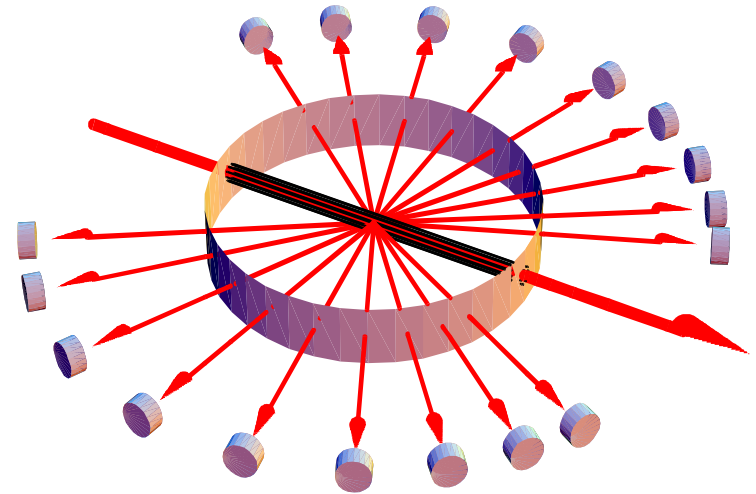


Couplage SEC/MALLS

Couplage SEC/MALLS/DRI



Laser

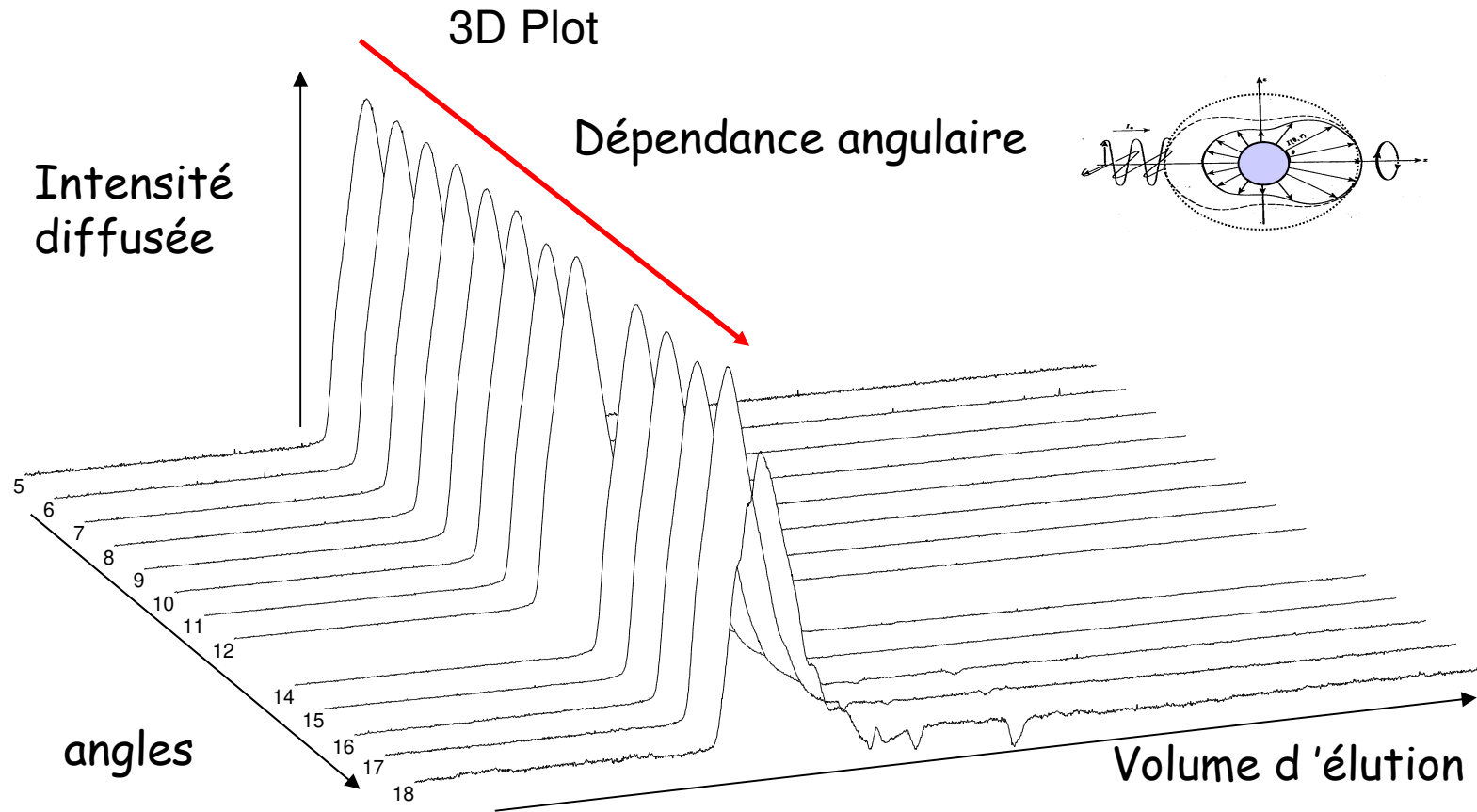


$$\frac{KC}{\Delta R(q)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{q^2}{3} R_g^2 + \dots \right) + 2A_2 C + \dots$$

Expression de la diffusion de la lumière

Avec K, la constante optique $K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \cdot \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \cdot \frac{1}{N_a}$ et q, la fonction d'onde $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$

Couplage SEC/MALLS/DRI



Couplage SEC/MALLS/DRI

Exemple sur une gomme arabique

polysaccharide exsudat de l'acacia Sénégal : agent émulsifiant, stabilisant E414



Crème Cuisine Amande (200ml) -- ECOMIL

Composition: Eau, huile d'amande*, amandes*7%, sirop d'agave*, lécithine de tournesol, gomme de xanthane, gomme arabique, sel marin, arôme d'amande*.



2 populations :

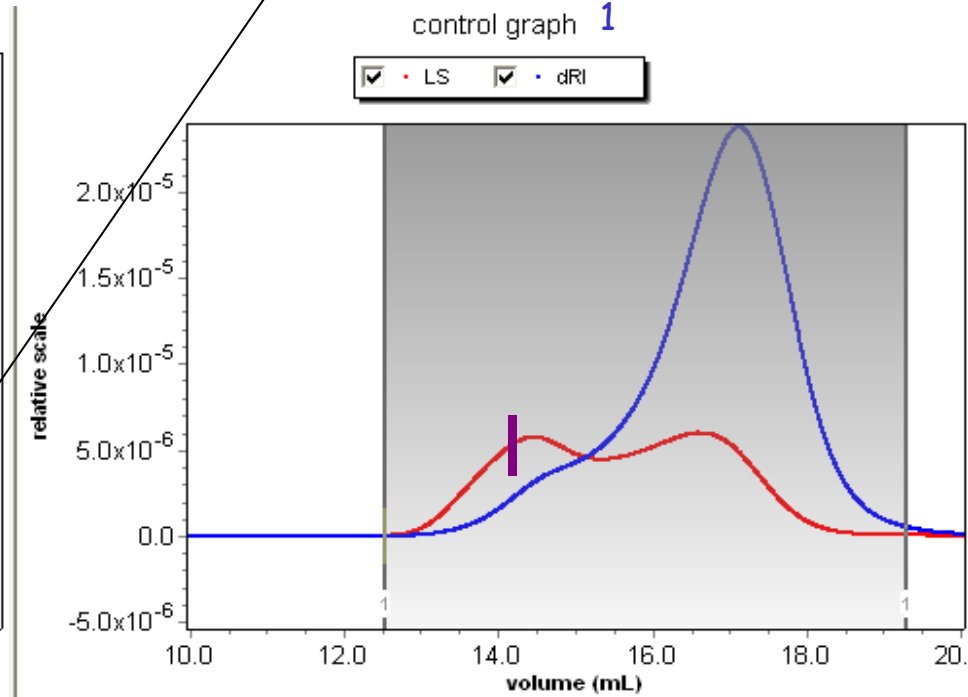
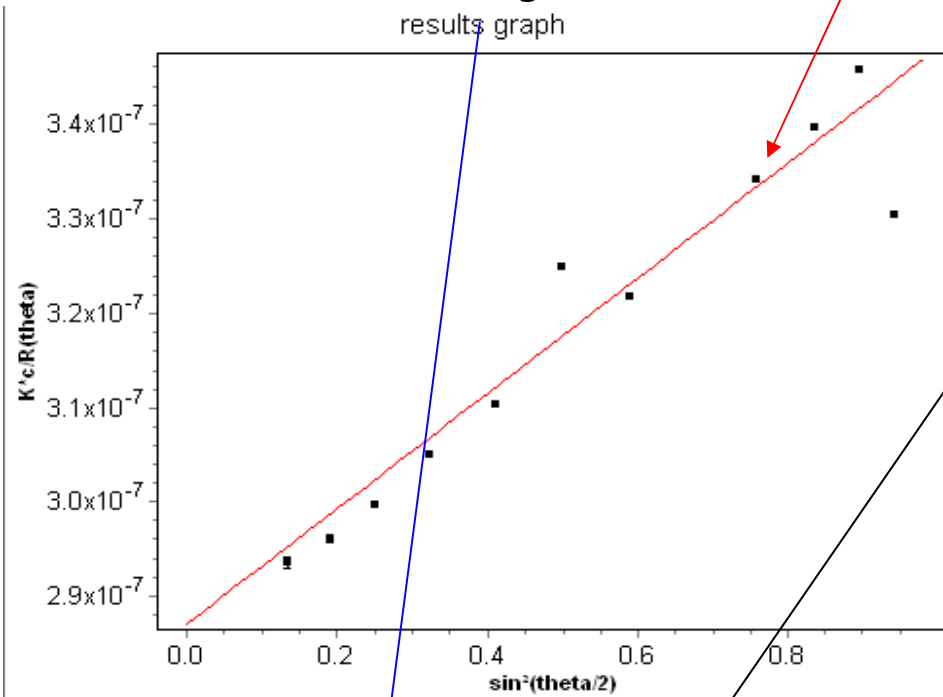
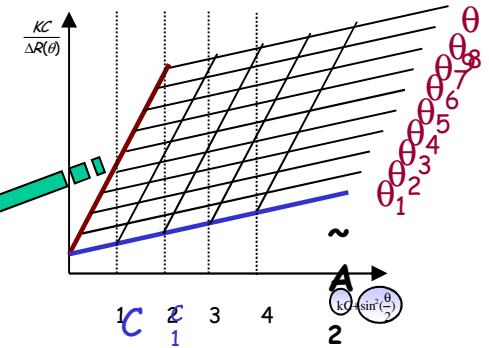
- 1- arabino-galactanes (polysaccharides très ramifiés et chargés négativement)
- 2- arabino-galactanes / protéines ou AGP (glyco-protéines amphiphiles ~ émulsifiant)

Couplage SEC/MALLS/DRI

En entrée de pic

Chaque fraction éluée correspond à une concentration très faible

Le Zimm-plot donne directement la dépendance angulaire à $C \sim 0$:
on obtient alors M et R_g

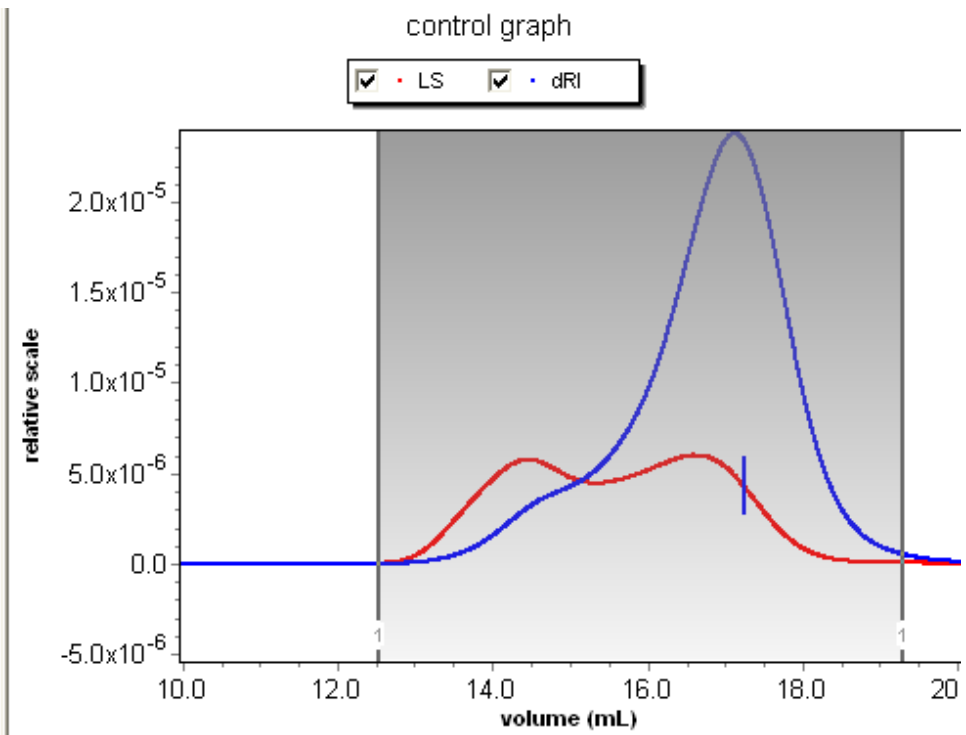
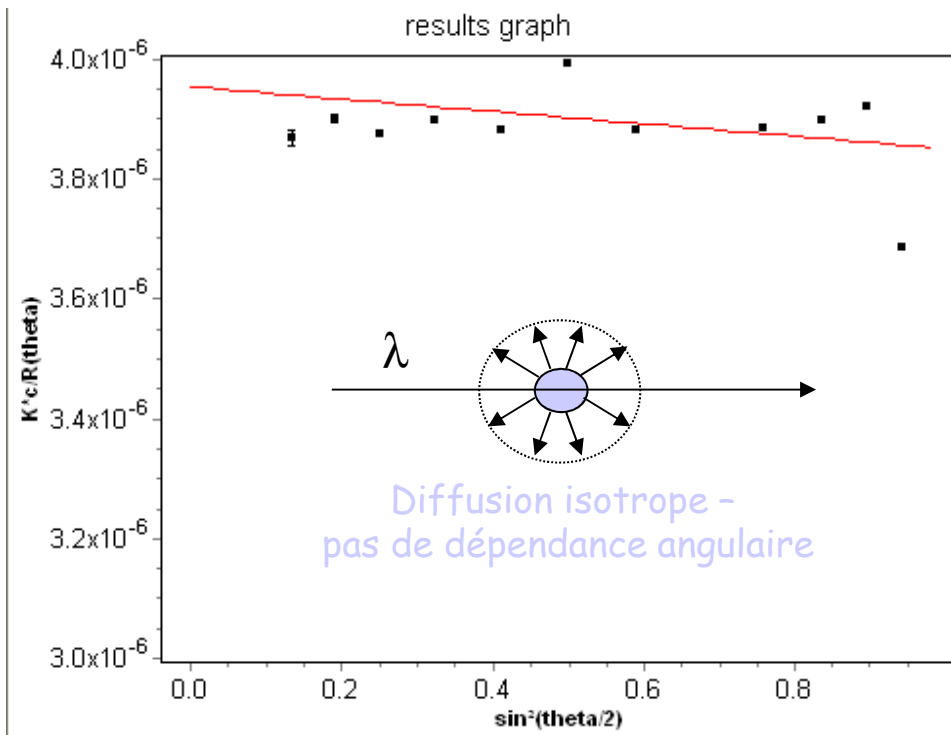


	Value
Molar Mass	$(3.526 \pm 0.052) \times 10^6$ g/mol
rms radius	33.0 ± 1.9 nm
Peak Number	1
Slice Index	1113
Model	Zimm
Fit Degree	1
Abscissa Position	14.267 mL
Concentration	$(1.747 \pm 0.010) \times 10^{-5}$ g/mL
dn/dc	0.141 mL/g

Faible volume élution, fort V_h : dépendance angulaire
 $R_g = 33 \pm 2$ nm
 $M = 3,5M \text{ g.mol}^{-1}$
 $C_i = 1,7 \cdot 10^{-5} \text{ g.mL}^{-1}$

Couplage SEC/MALLS/DRI

Gomme arabique
en sortie de pic ...



	Value
Molar Mass	$(2.550 \pm 0.038) \times 10^5$ g/mol
rms radius	0.0 ± 0.0 nm
Peak Number	1
Slice Index	1471
Model	Zimm
Fit Degree	1
Abscissa Position	17.250 mL
Concentration	$(1.658 \pm 0.001) \times 10^{-4}$ g/mL
dn/dc	0.141 mL/g

Fort volume d'élution, faible V_h

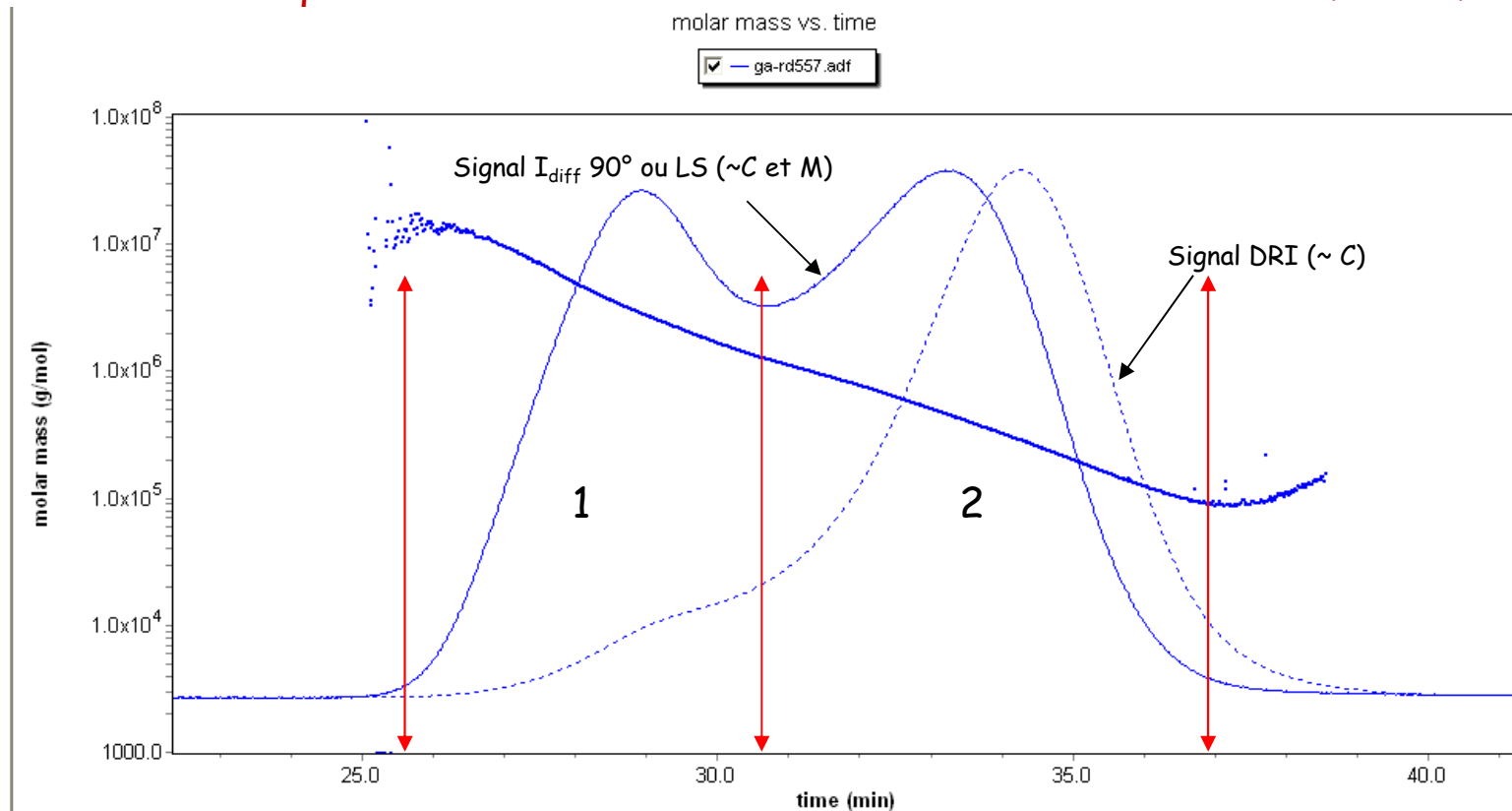
Plus de dépendance angulaire : pas de R_g possible

$M = 250\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

56

Couplage SEC/MALLS/DRI

Gomme Arabique : distribution des masses molaires et accès aux Mn et Mw



Confirme les 2 populations :

1 AGP : faible signal DRI (donc faible C)
+ fort signal LS (~ C et M : donc fortes masses molaires)

2 AG : Fort signal DRI (donc forte C)
Signal LS ~ signal LS de la population 1 : donc plus faibles masses molaires

Couplage SEC/MALLS/DRI

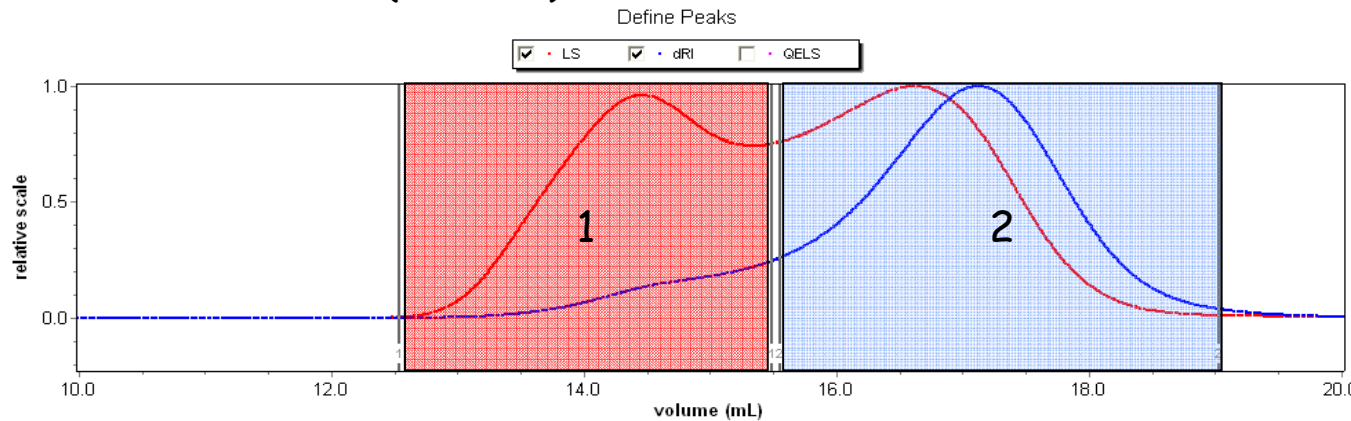
Gomme Arabique : expressions des résultats Mn et Mw

Sur chaque fraction éluée i
 DRI donne Ci donc ni
 LS donne Mi

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad \text{Et } I_p = M_w / M_n$$

En intégrant sur chaque population (1 et/ou 2)

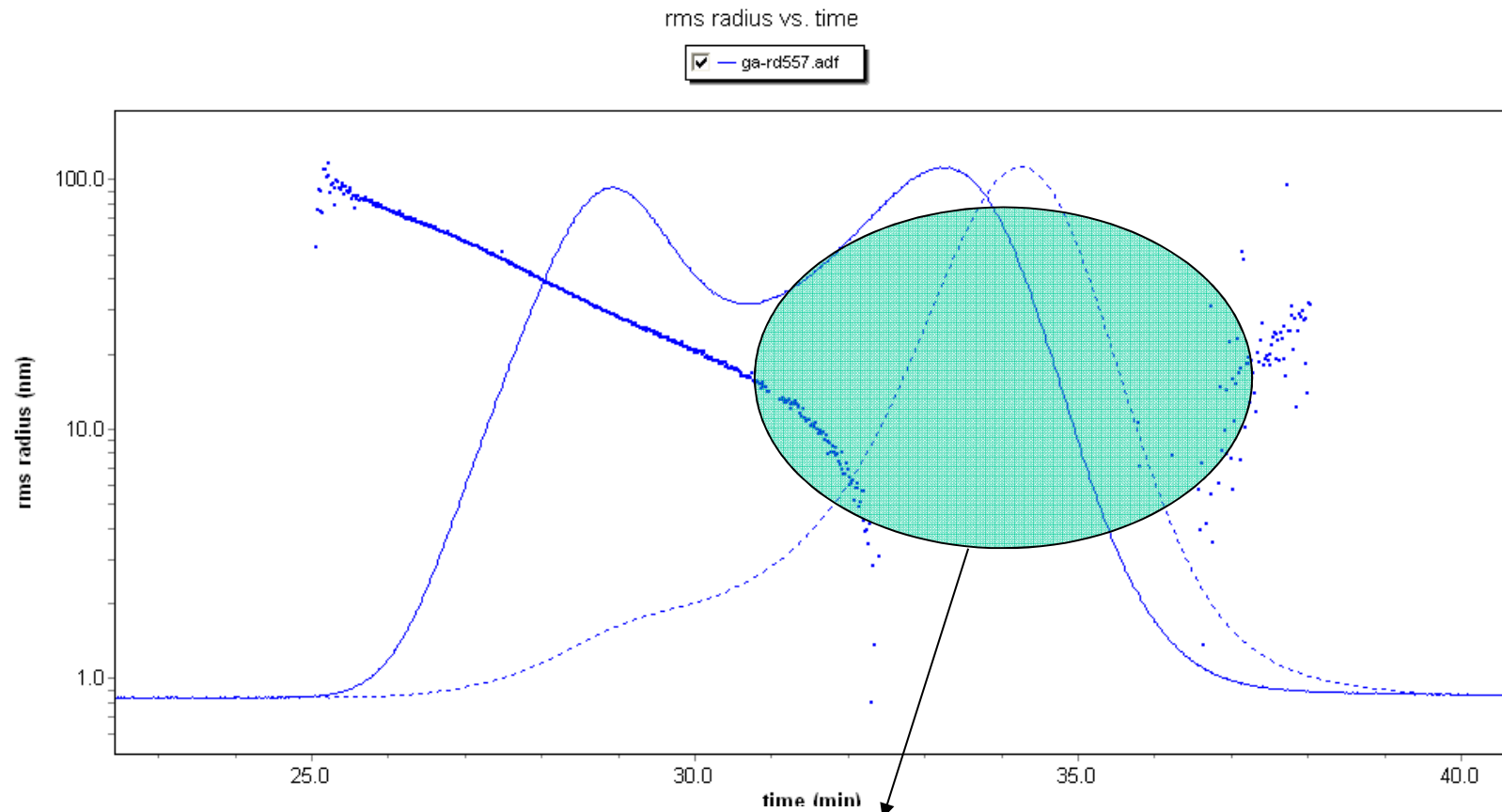
- ⇒ Mn et Mw
- ⇒ % en concentration (via DRI)



	Mn g.mol ⁻¹	Mw g.mol ⁻¹	Ip	%
1+2	280 000	650 000	2.3	100
1 AGP	1 900 000	2 600 000	« 1.3 »	12
2 AG	250 000	370 000	« 1.4 »	88

Couplage SEC/MALLS/DRI

Gomme arabique : Distribution des dimensions - Rayon de giration



Diffusion isotrope - Pas de dépendance angulaire à partir de 20nm ($< \lambda/20$)

Conséquence :
Accès impossible aux R_g moyen

Sauf sur la population 1 : $R_{g_w} \sim 27\text{nm}$

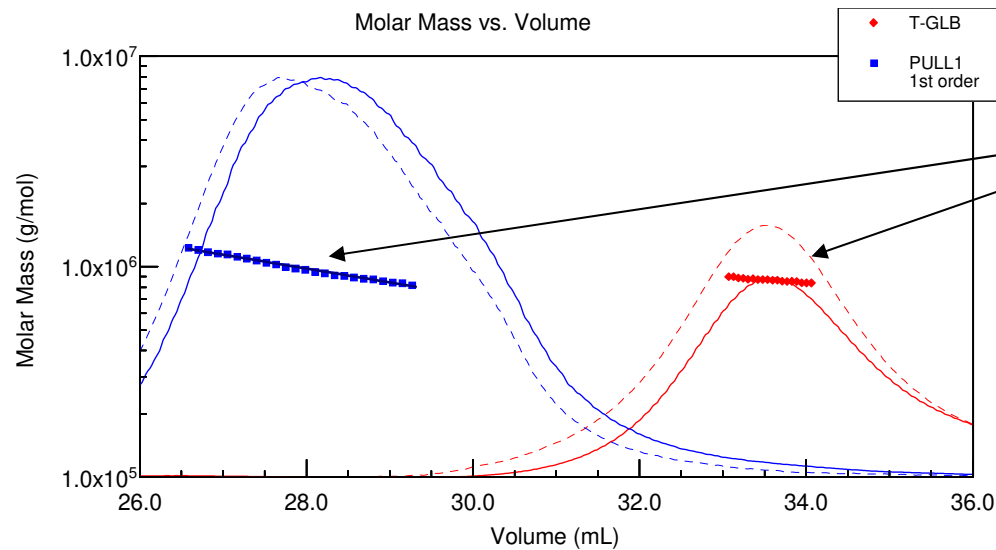
Importance de la diffusion de la lumière (MALLS) couplée à la SEC - pas d'étalonnage

Exemple : 2 échantillons :

pullulane : polysaccharide en **pelote statistique**

thyroglobuline : protéine plutôt **compacte**

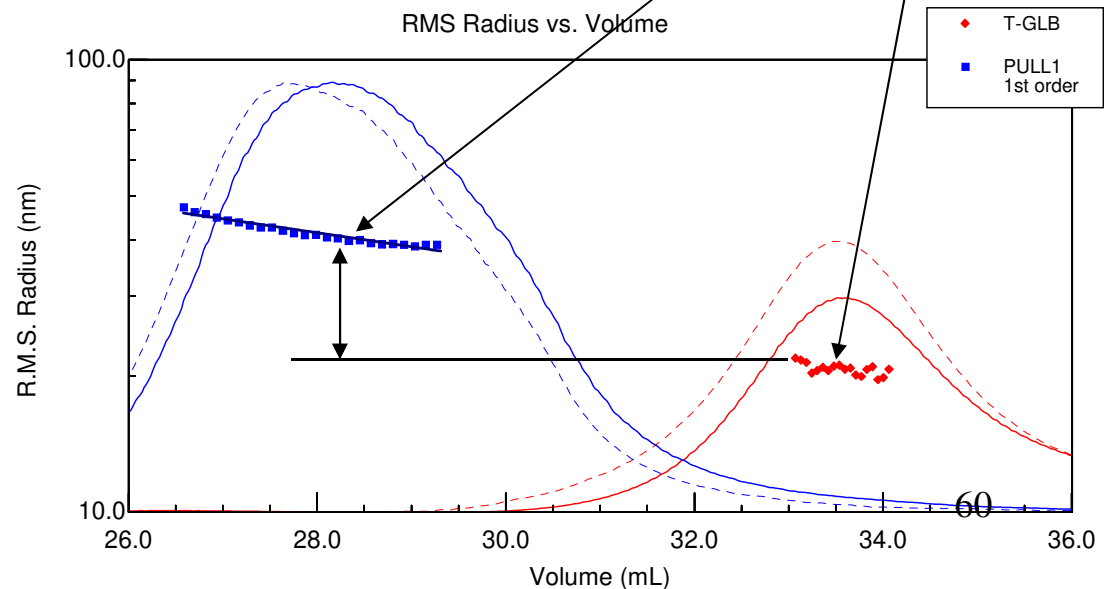
Même masse molaire $\sim 1\text{M g.mol}^{-1}$



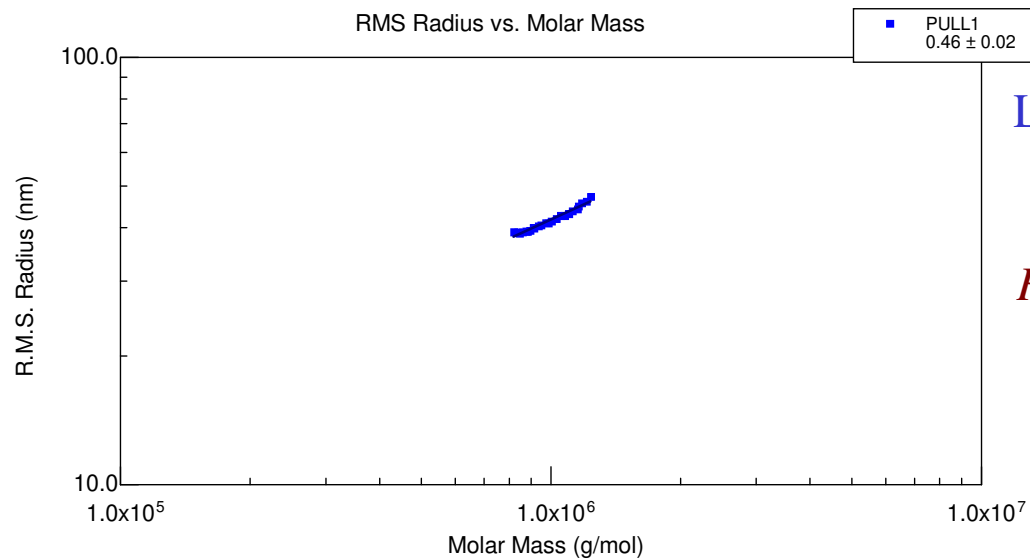
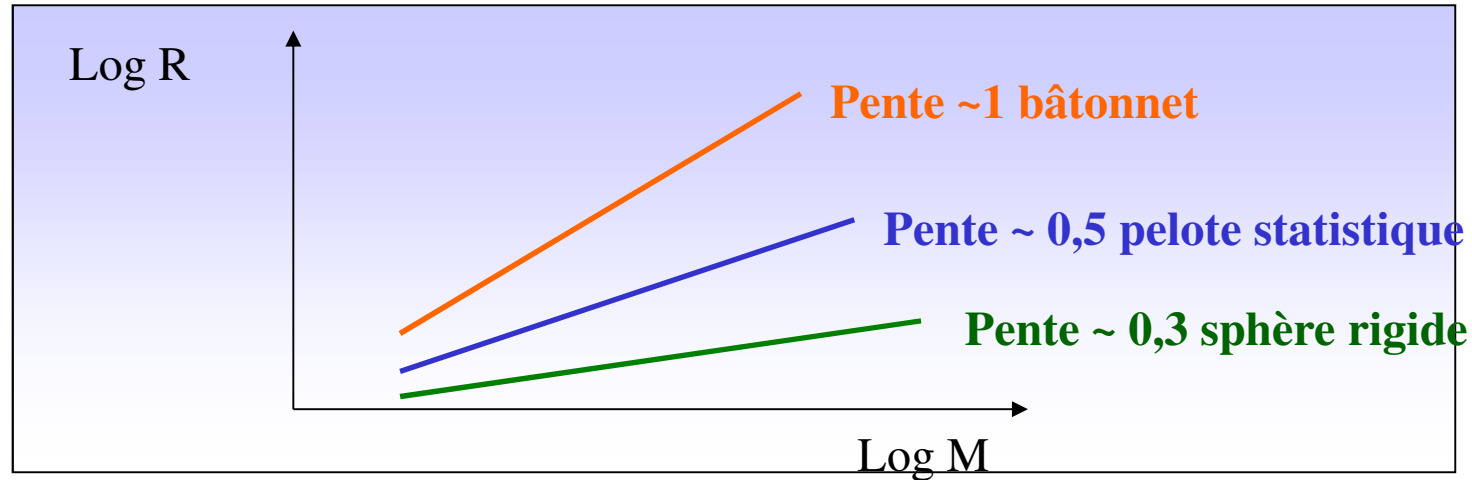
Même masse molaire
Volume d'éluion \neq
donc Volume Hydrodynamique \neq

**A masse molaire égale
le pullulane est plus volumineux
que la thyroglobuline**

**Le couplage permet
de bien caractériser un mélange
contenant les 2 macromolécules**



L'information concernant la conformation est accessible en traçant $R_g = f(M)$ en échelle bi logarithmique

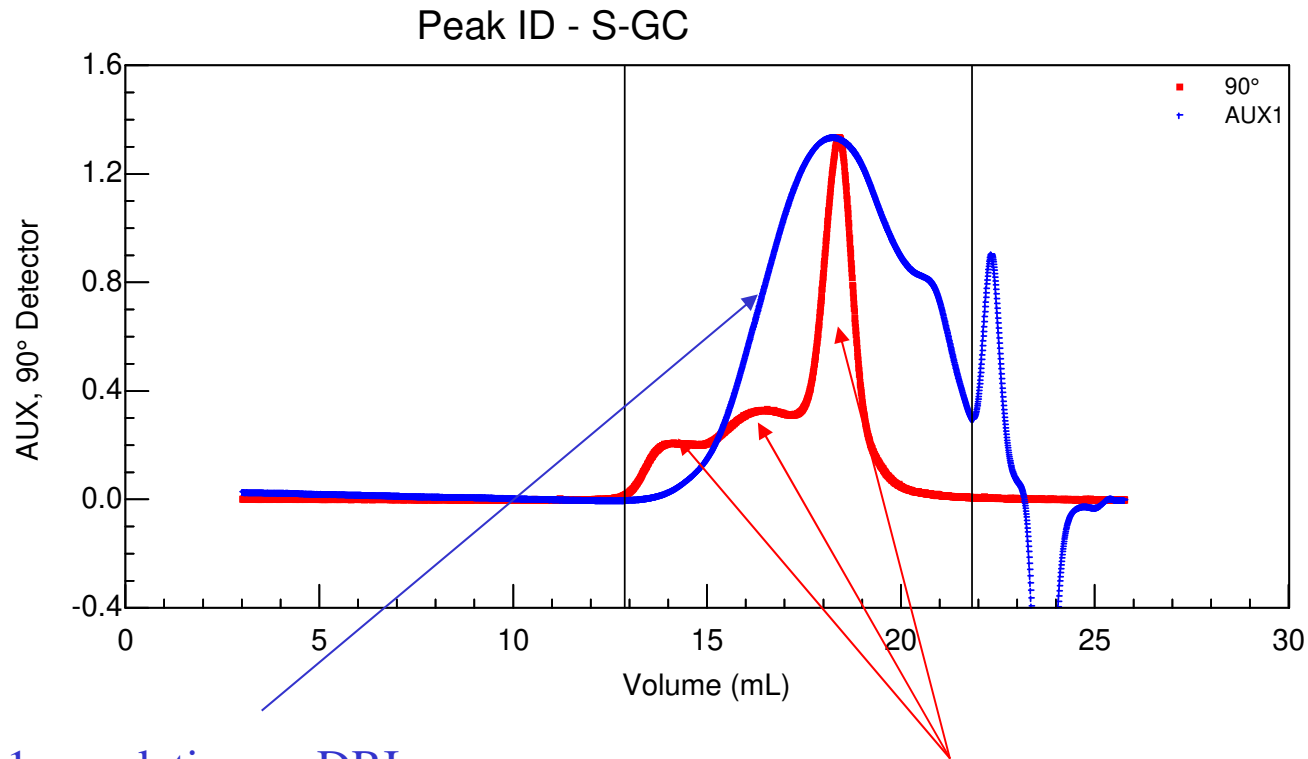


Le pullulane présente bien une conformation de type pelote statistique

Rq : Pour la thyroglobuline il est impossible d'accéder à cette information car il n'y a pas de polymolécularité pour une protéine (Masse molaire définie par le nombre d'acides aminés)

Exemple d 'application : Analyse SEC/MALLS d'un extrait végétal

contenant essentiellement des arabino-xylanes (polysaccharides) et dans lequel on sait qu 'il co-existe une protéine en faible quantité.

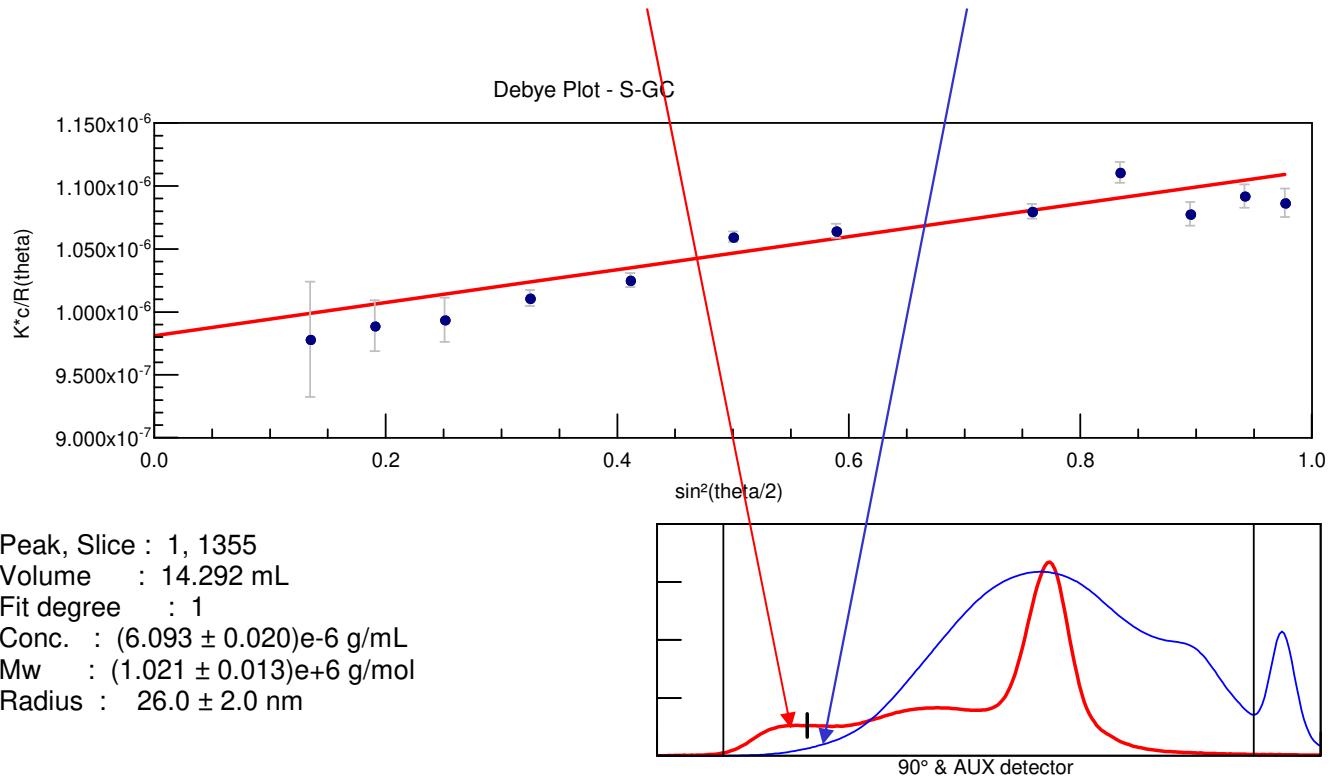


1 population en DRI
(2 avec le léger épaulement en sortie de pic)

3 populations en DDL
(la 3ème (19mL) très fine,
diffuse beaucoup)

1^{ère} population DDL (exemple fraction 1355)

Signal DDL quantifiable, signal DRI quasi nul :



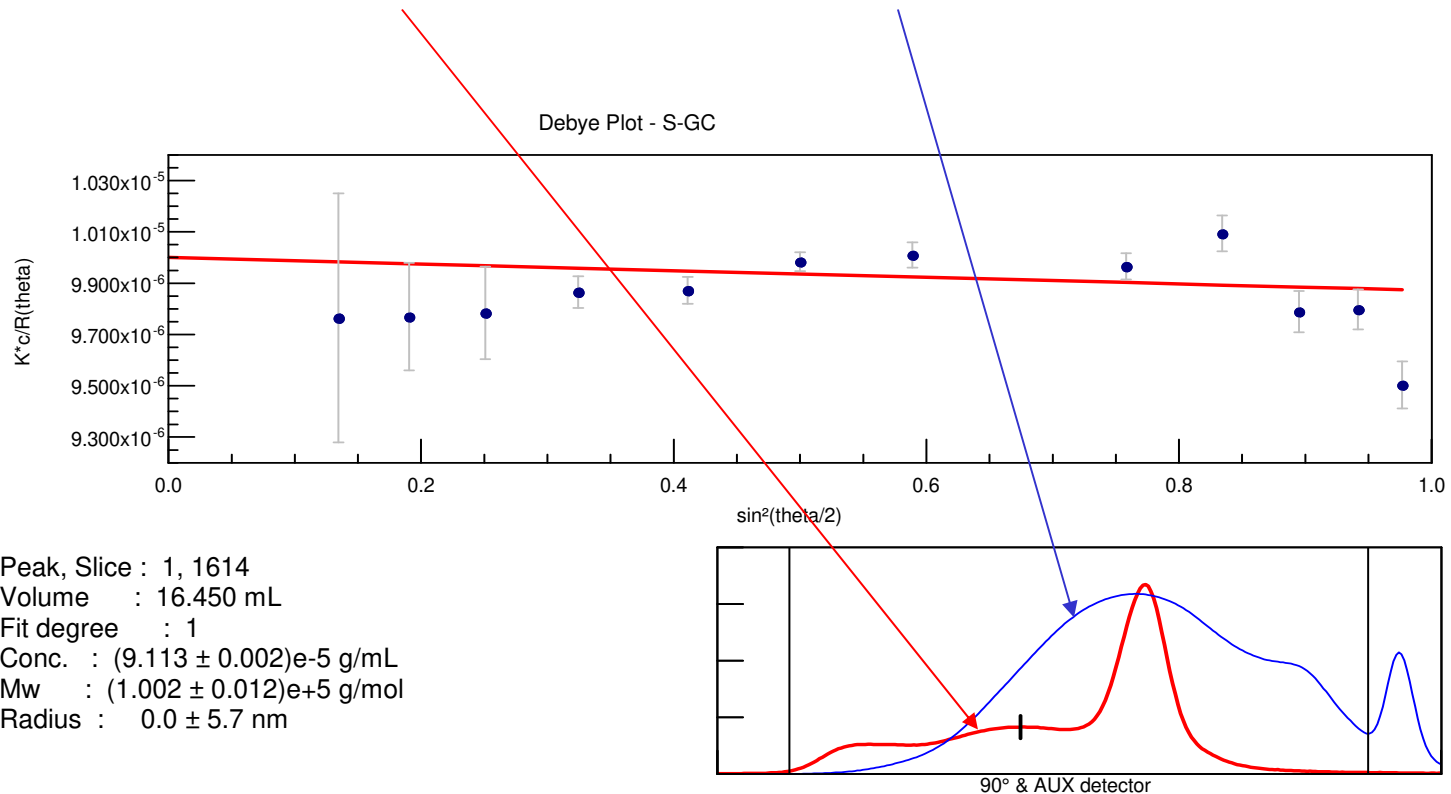
objet de très forte masse présent en quantité très faible (agregats d'arabino-xylan?)

sur cette fraction :

Masse molaire $M=1M$ g.mol⁻¹, $R_g \sim 26$ nm

2^{ème} population DDL (exemple fraction 1614)

Signal DDL quantifiable, signal DRI quantifiable mais très étalé (polymoléculaire)



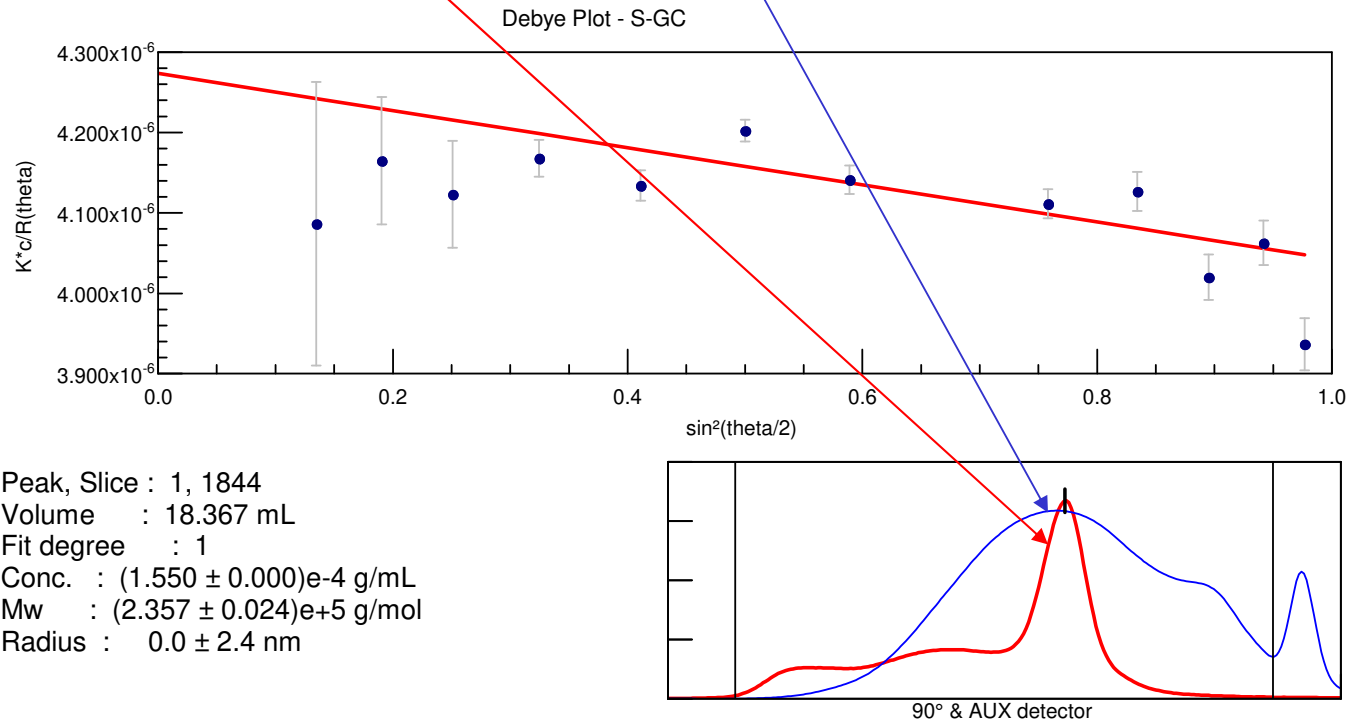
objet très polymoléculaire, présent en quantité très importante (arabino-xylan)

sur cette fraction :

Masse molaire $M=100\,000$ g.mol⁻¹, R_g ~inaccessible (trop petit diffusion isotrope)

3^{ème} population DDL (exemple fraction 1844)

Signal DDL très important, signal DRI « noyé » dans le signal de la population 2



Cette espèce surdiffusante est très probablement **la protéine** :
elle sort au milieu de polysaccharides de masse $< 100\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
bien qu'elle soit sans aucun doute de masse très $> 100\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cl : sa conformation est beaucoup plus compacte que celle du polysaccharide

Rq : la masse molaire de la protéine est fautive car la concentration de la protéine est polluée de la concentration du polysaccharide (dn/dc différent)

Problèmes rencontrés dans le couplage SEC/MALLS

Venant du MALLS :

* Masse molaire trop importante

Le régime de concentration doit être dilué ($C < C^*$)

Si C^* est très petit (masse forte), le signal DRI est alors trop faible

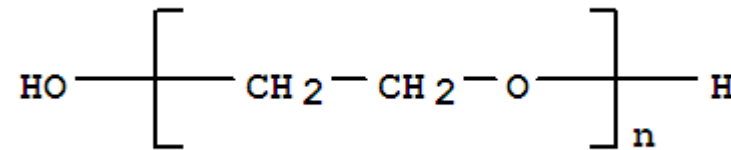
* Le rayon de giration est aussi trop important

en conséquence les grands angles deviennent inexploitable

(domaine de Guinier)

ou bien ils entraînent une forte incertitude sur les masses calculées
(rappelons que M est donnée par l'inverse de l'ordonnée à l'origine)

Exemple POE ($\sim 4\text{M g.mol}^{-1}$)



1-très forte masse :

difficulté du choix du nombre d'angles
(dépendance angulaire)

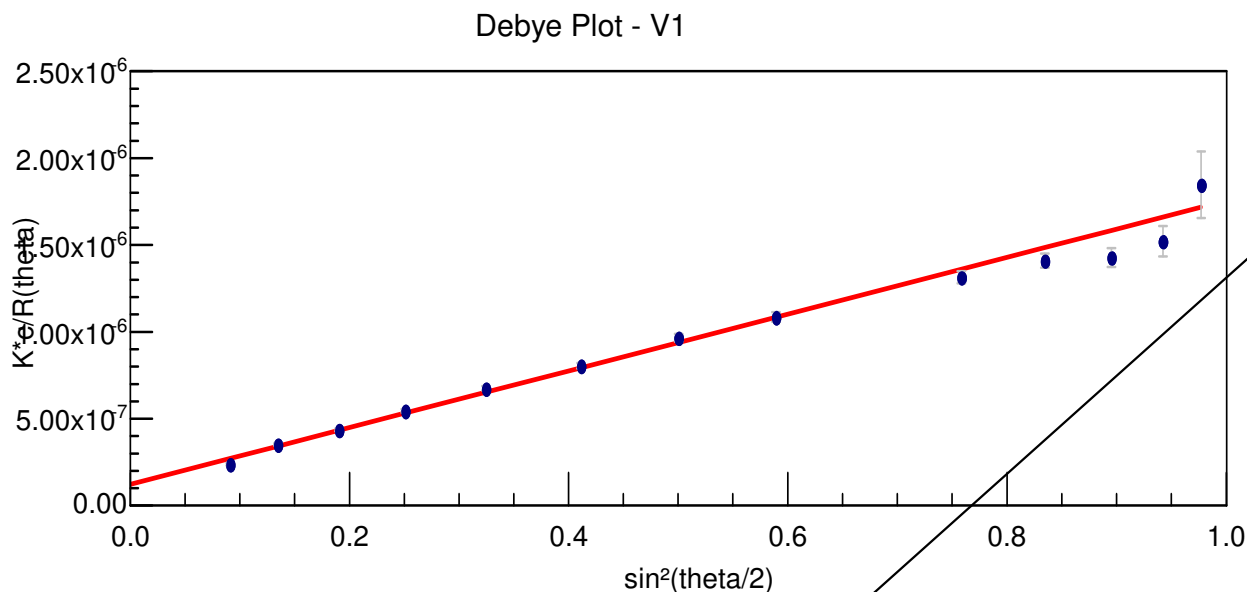
2-très faible concentration (100ppm) :

sensibilité limite en DRI et en DDL

induit une mauvaise précision en entrée et en sortie de pic
(dépend des conditions de « propreté » de la cellule)

Influence de la dépendance angulaire pour une fraction de forte masse molaire

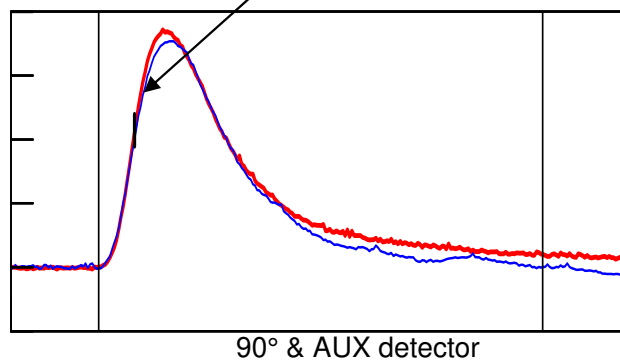
Analyse entre
35° et 162°

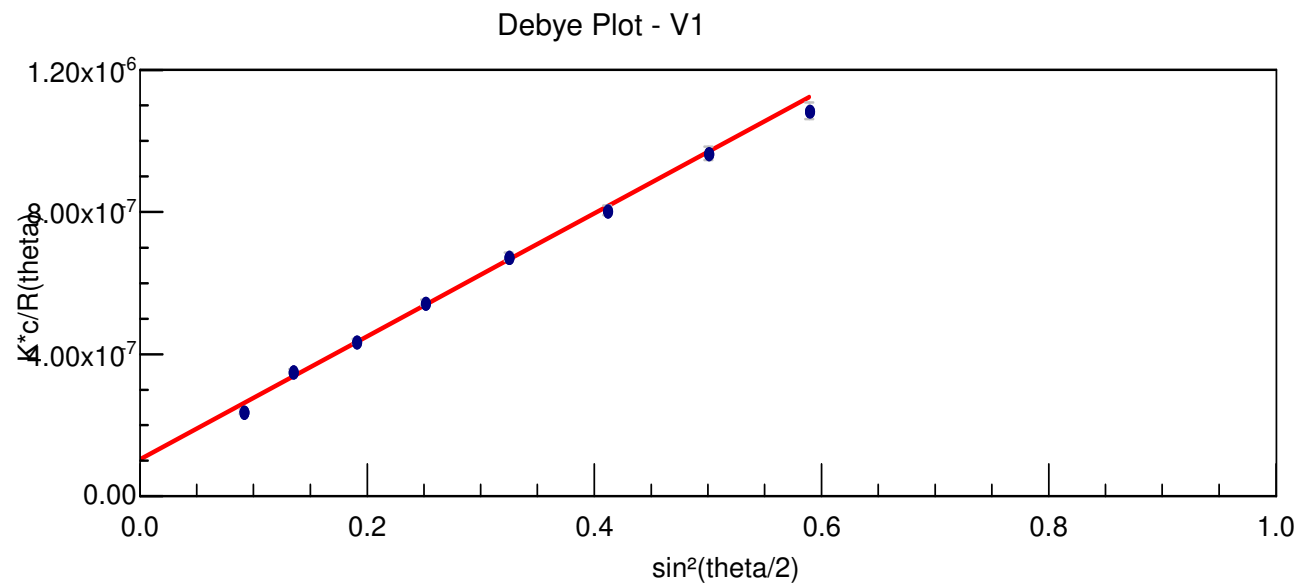


Fraction 830
M=8,3M g/mol

M_w=5,6M
M_n=4.8M

Peak, Slice : 1, 830
Volume : 11.917 mL
Fit degree : 1
Conc. : (2.454 ± 0.029)e-6 g/mL
M_w : (8.292 ± 0.856)e+6 g/mol
Radius : 262.0 ± 3.8 nm

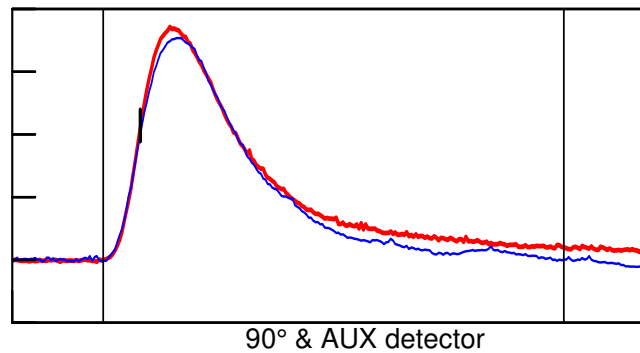




Analyse entre
35° et 100°

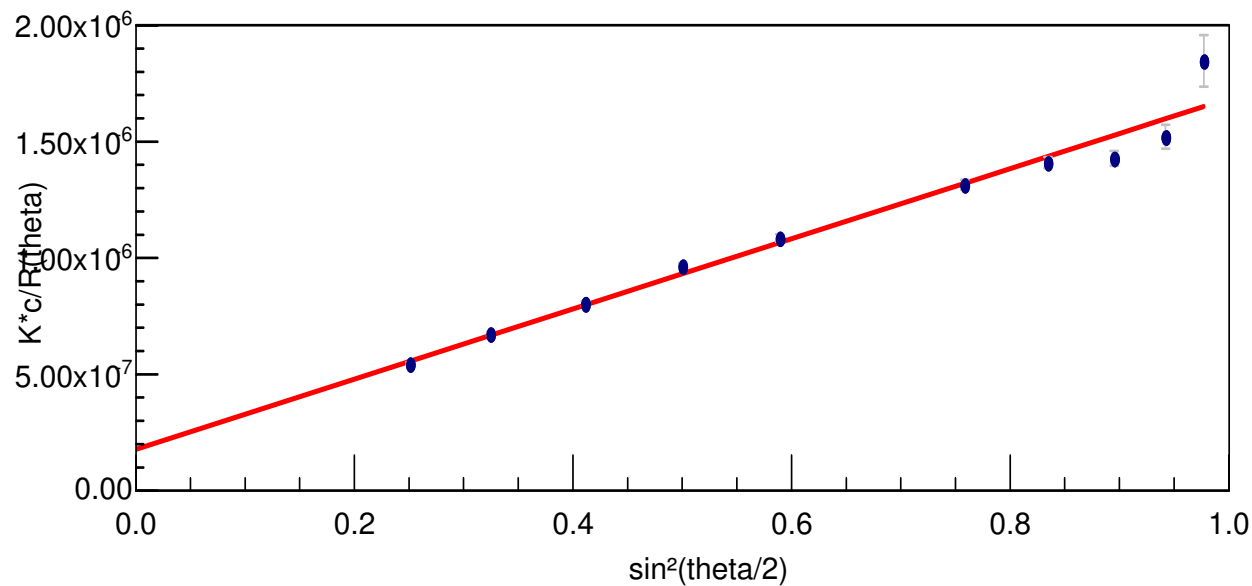
Fraction 830
M=9,7 g/mol

Peak, Slice : 1, 830
Volume : 11.917 mL
Fit degree : 1
Conc. : $(2.454 \pm 0.029)e-6$ g/mL
Mw : $(9.755 \pm 1.168)e+6$ g/mol
Radius : 292.7 ± 4.5 nm



Mw=7,4M
Mn=5,9M

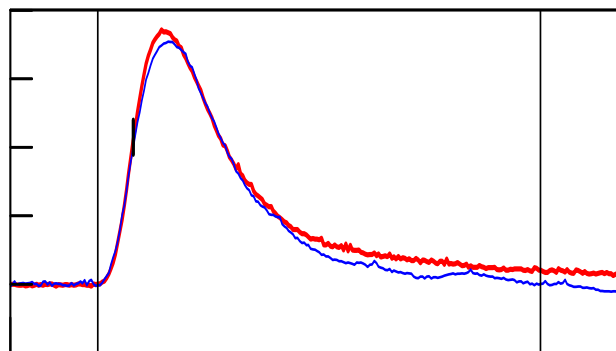
Debye Plot - V1



Analyse entre
60° et 162°

Fraction 830
M=5,6 g/mol

Peak, Slice : 1, 830
Volume : 11.917 mL
Fit degree : 1
Conc. : $(2.454 \pm 0.029)e-6$ g/mL
Mw : $(5.655 \pm 0.563)e+6$ g/mo
Radius : 207.8 ± 3.0 nm



90° & AUX detector

Mw=3.8M
Mn=3,3M

Les résultats en masses molaires moyennes peuvent varier de façon très sensible en fonction des angles utilisés

pour les polymères de grands volumes hydrodynamiques (grandes masses), il est recommandé d'utiliser plutôt les petits angles (en théorie $qR_g < 1$)

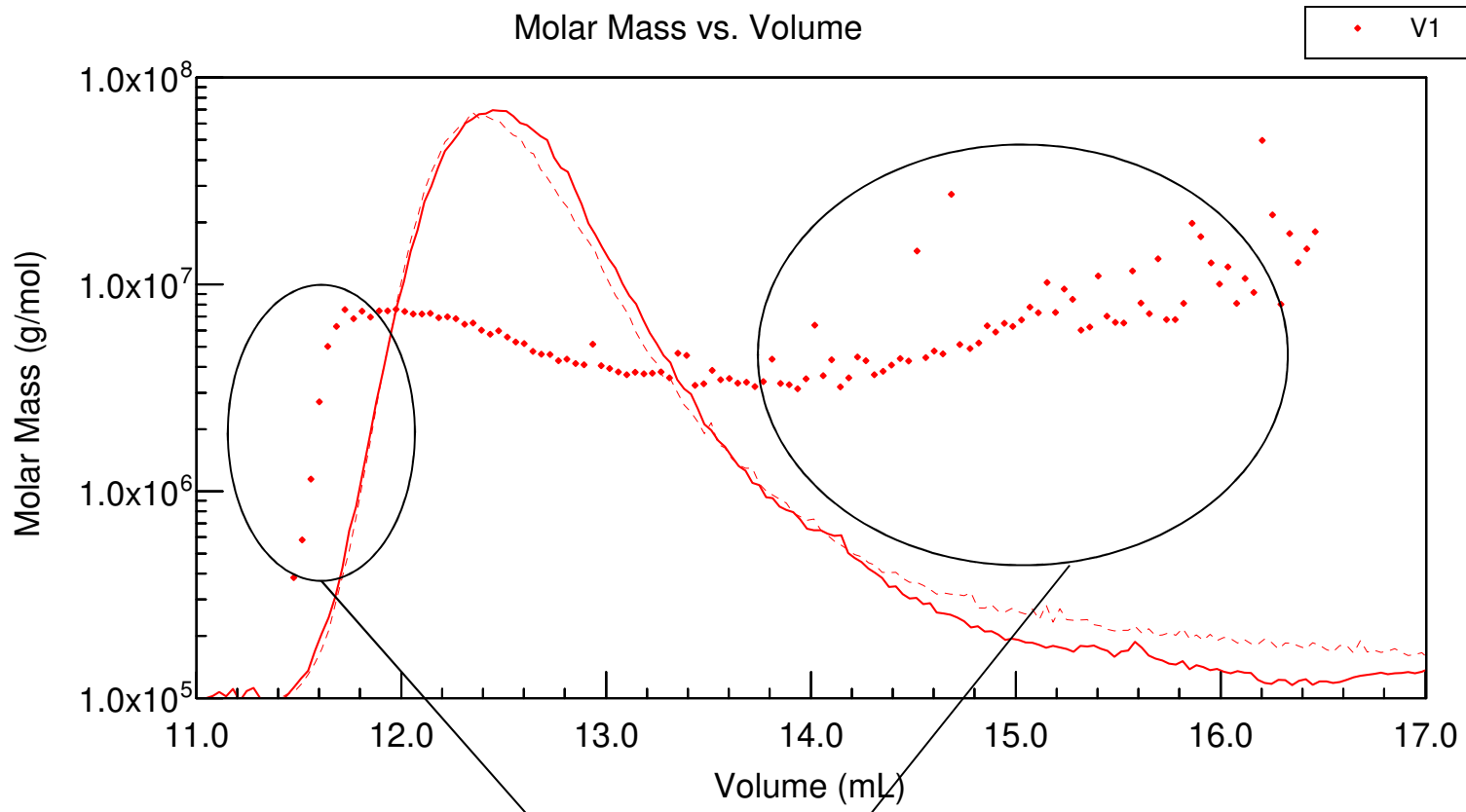
$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Vecteur d'onde}$$

Exemple : avec un R_g de 100nm environ (ordre de grandeur du POE)

on obtient un angle max de 70° environ

Problème : pour les petits angles, le bruit de fond augmente beaucoup et le rapport signal/bruit est faible pour des solutions à 100ppm : donc il faut augmenter la concentration

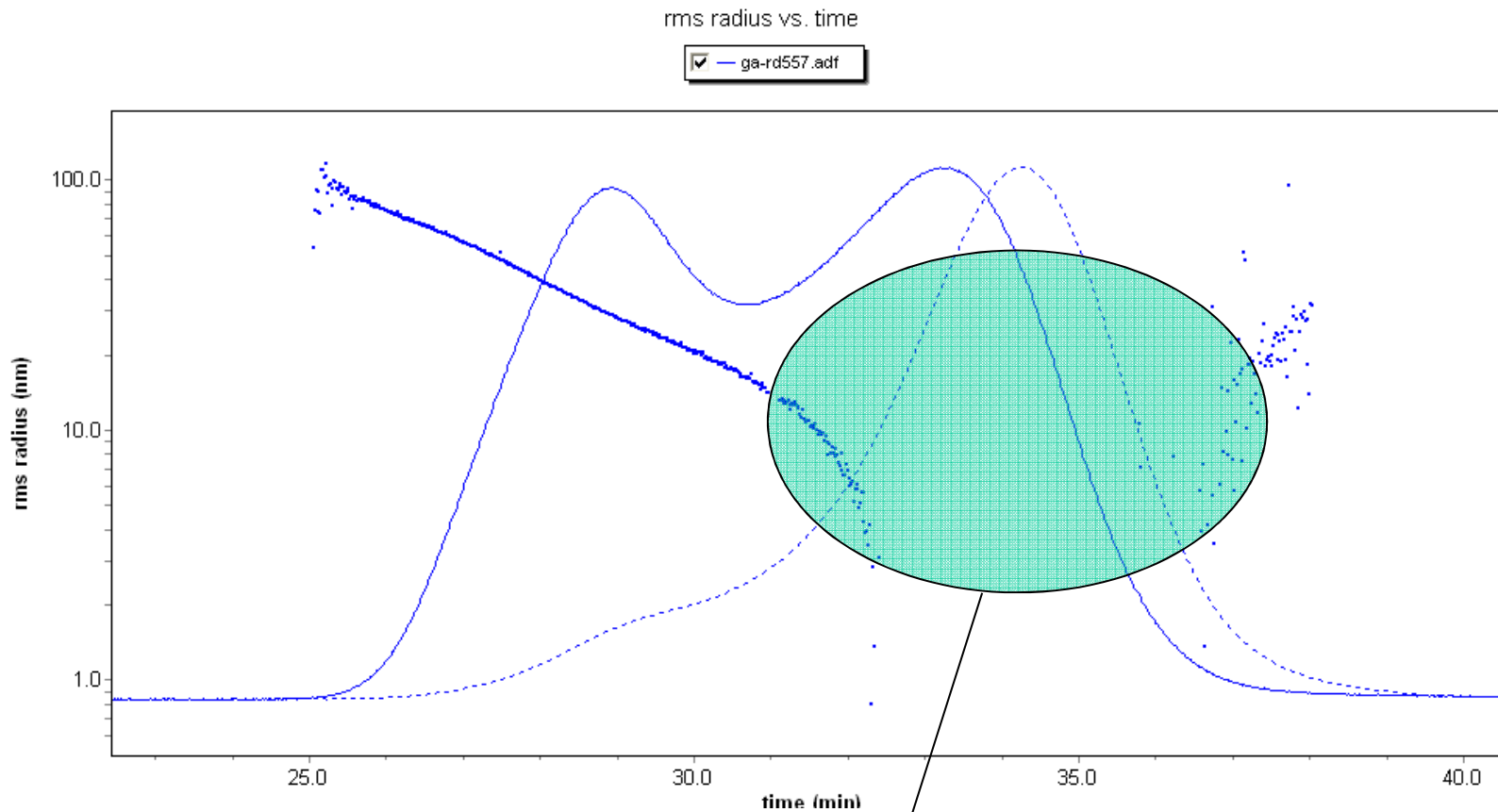
sensibilité en DRI et DDL faible
surtout en entrée et en sortie de pic



Pas assez de signal DRI et DDL

Couplage SEC/MALLS/DRI

Gomme arabique : Distribution des dimensions - Rayon de giration



Diffusion isotrope - Pas de dépendance angulaire à partir de 20nm ($< \lambda/20$)

Conséquence :
Accès impossible aux R_g moyen

Sauf sur la population 1 : $R_{g_w} \sim 27\text{nm}$

Quelle solution?

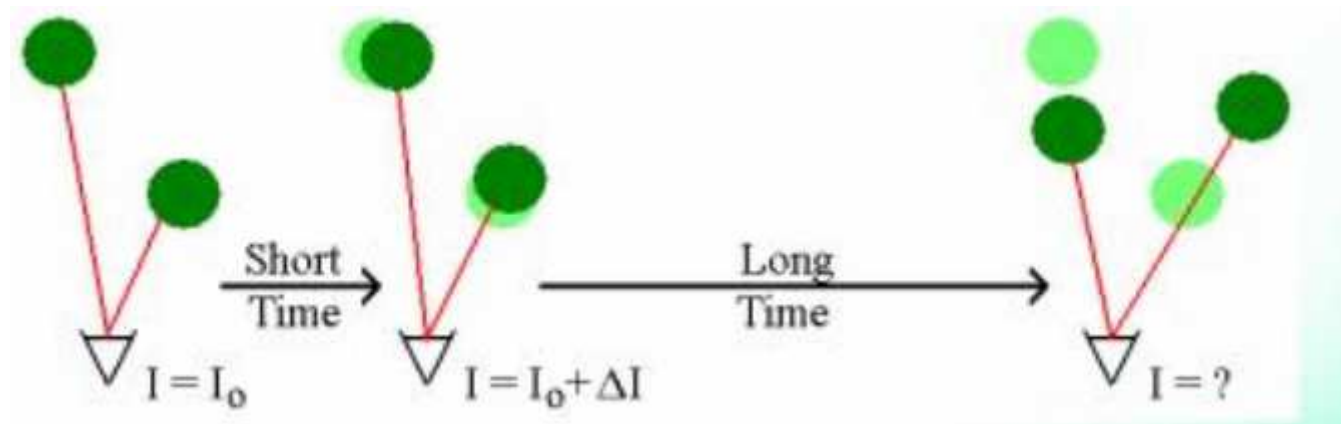
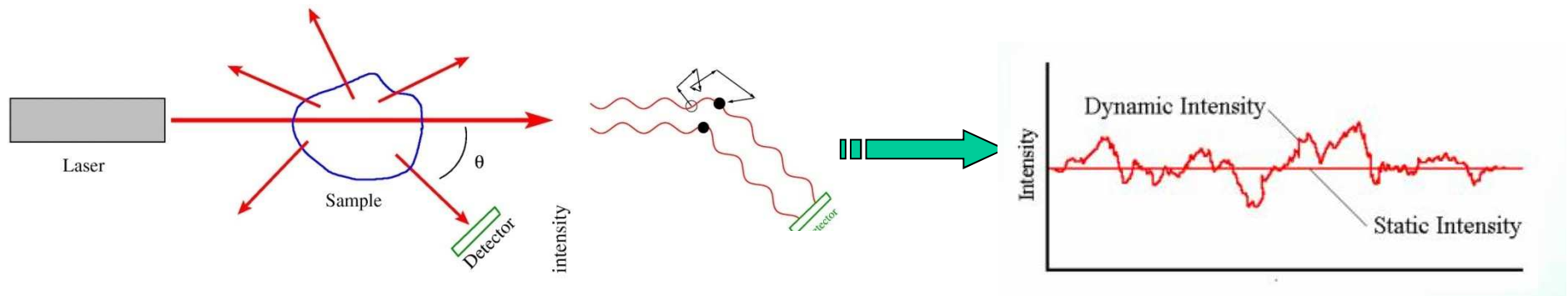
-QELS- 73

Accès aux tailles petites en cas de diffusion isotrope :

Diffusion Quasi Elastique de la lumière (QELS ou Quasi Elastic Light Scattering)

Principe :

on analyse les **fluctuations temporelles de l'intensité diffusée** à un angle θ donné, provoquées par **les mouvements browniens** de la particule diffusante



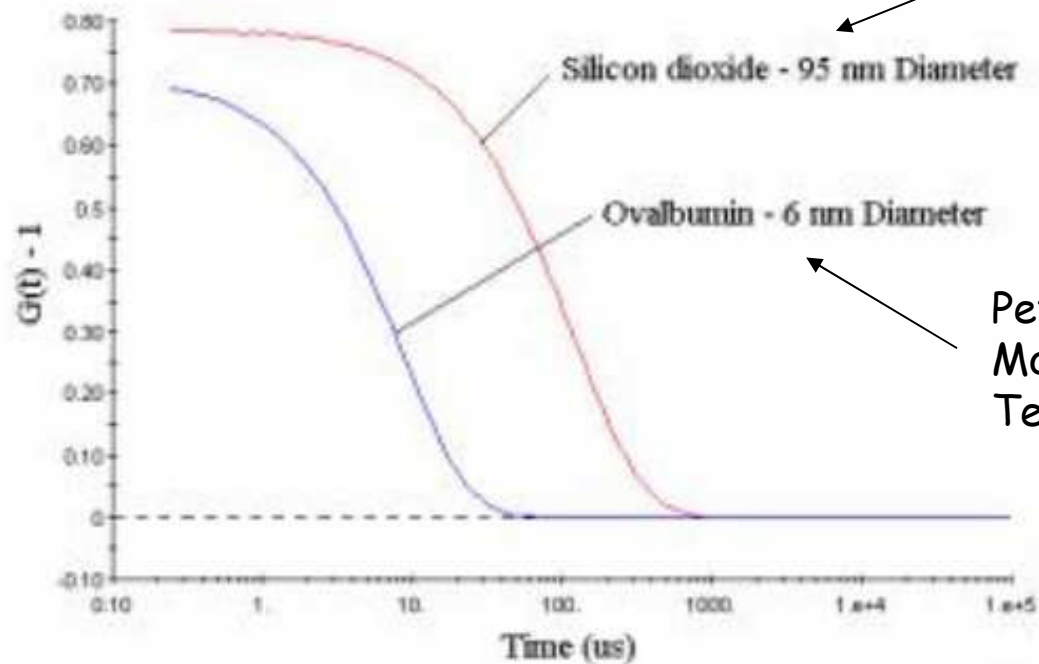
Au temps courts,
on accède aux fluctuations

Aux temps longs, on retrouve
une intensité diffusée statistique
équivalente à I_{diff} en statique

QELS - Batch

On en déduit une fonction d'auto corrélation du 2^{ème} ordre

$$G(\tau) = \frac{I(t_0)I(t_0 + \tau)}{I(t_\infty)^2}$$



Grosses particules (SiO₂)
Mouvements browniens lents
Temps longs

Petites particules (Ovalbumine)
Mouvements browniens rapides
Temps courts

La fonction d'auto corrélation est reliée au coefficient de diffusion Dt de la particule diffusante

QELS - Batch

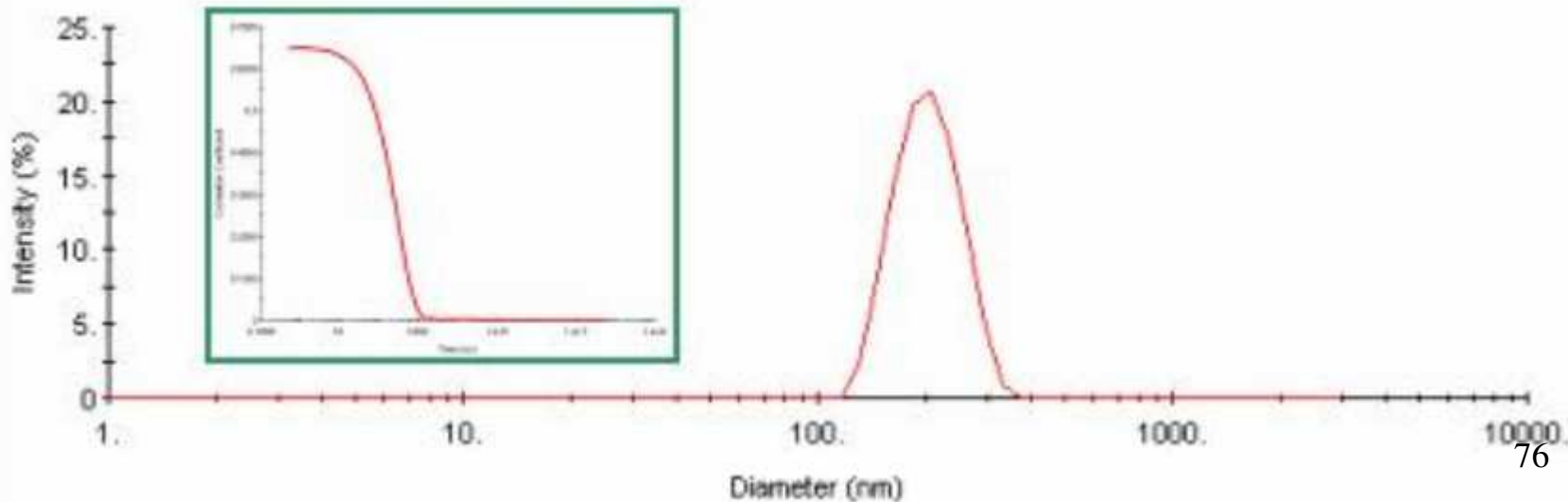
$$G(\tau) = \frac{I(t_0) I(t_0 + \tau)}{I(t_\infty)^2} = B + A e^{-2q^2 D \tau}$$

- A amplitude à t
- B amplitude ligne de base
- q : fonction d'onde $\longrightarrow q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$
- $D\tau$: **coefficient de diffusion**

On lisse la courbe expérimentale avec une équation modèle permettant l'accès au **coefficient de diffusion** ($D\tau$) lui même relié au **rayon hydrodynamique** (R_H) par la relation de Stokes-Einstein

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

- K : constante de Boltzmann
- T : température
- η : viscosité du milieu solvant
- D : coefficient de diffusion
- **Rh rayon hydrodynamique**



QELS en Batch

Avantage :

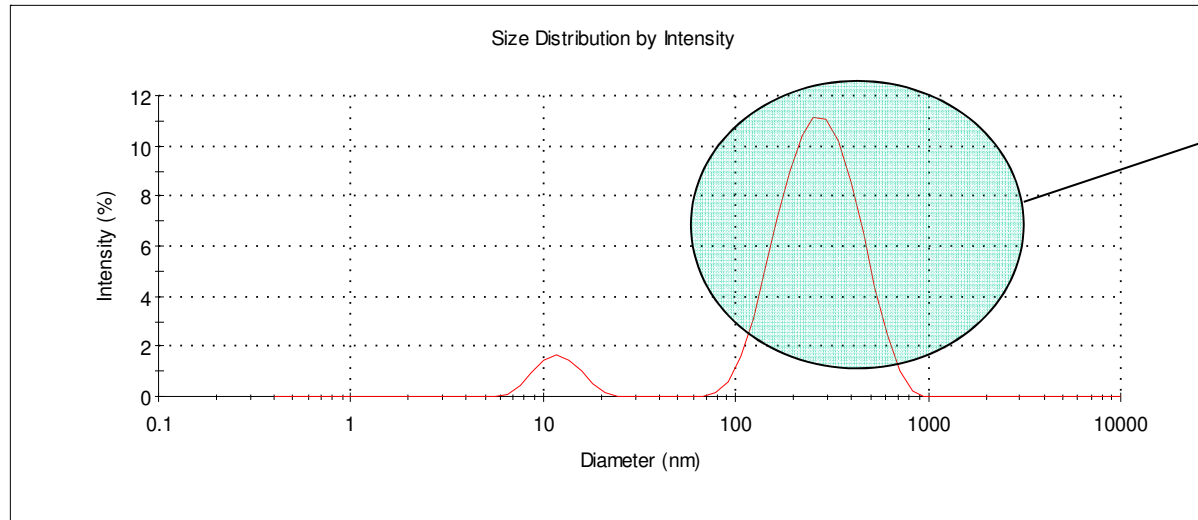
- ne dépend pas de la dépendance angulaire mais des fluctuations temporelles de I_{diff}
- accès à des tailles de l'ordre du nanomètre

Inconvénients liés à :

- la polymolécularité potentielle de l'échantillon
les fluctuations mesurées traduisent, en même temps,
les mouvements browniens de particules ayant des tailles différentes
- la présence de gros objets entraîne une diffusion importante pouvant masquer les plus petits objets!

Exemple :

Polysaccharide agrégatif



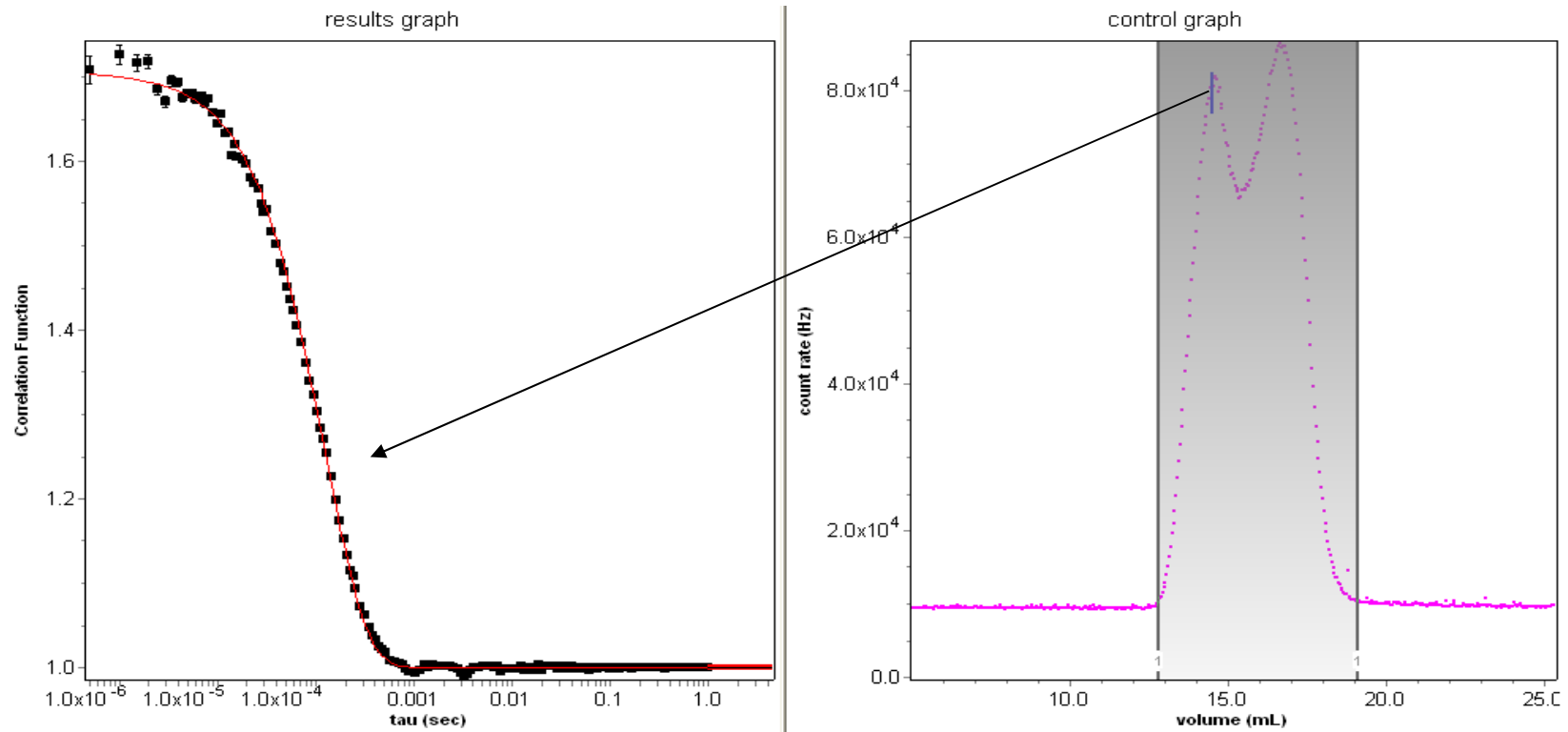
Quelle est la contribution réelle de cette diffusion traduite en Dt puis en R_h au sein de l'échantillon?

Il faut séparer stériquement avant la QELS:
QELS en ligne

QELS en ligne couplée SEC

Intérêt : Analyse de fraction isomoléculaire après fractionnement stérique (SEC)

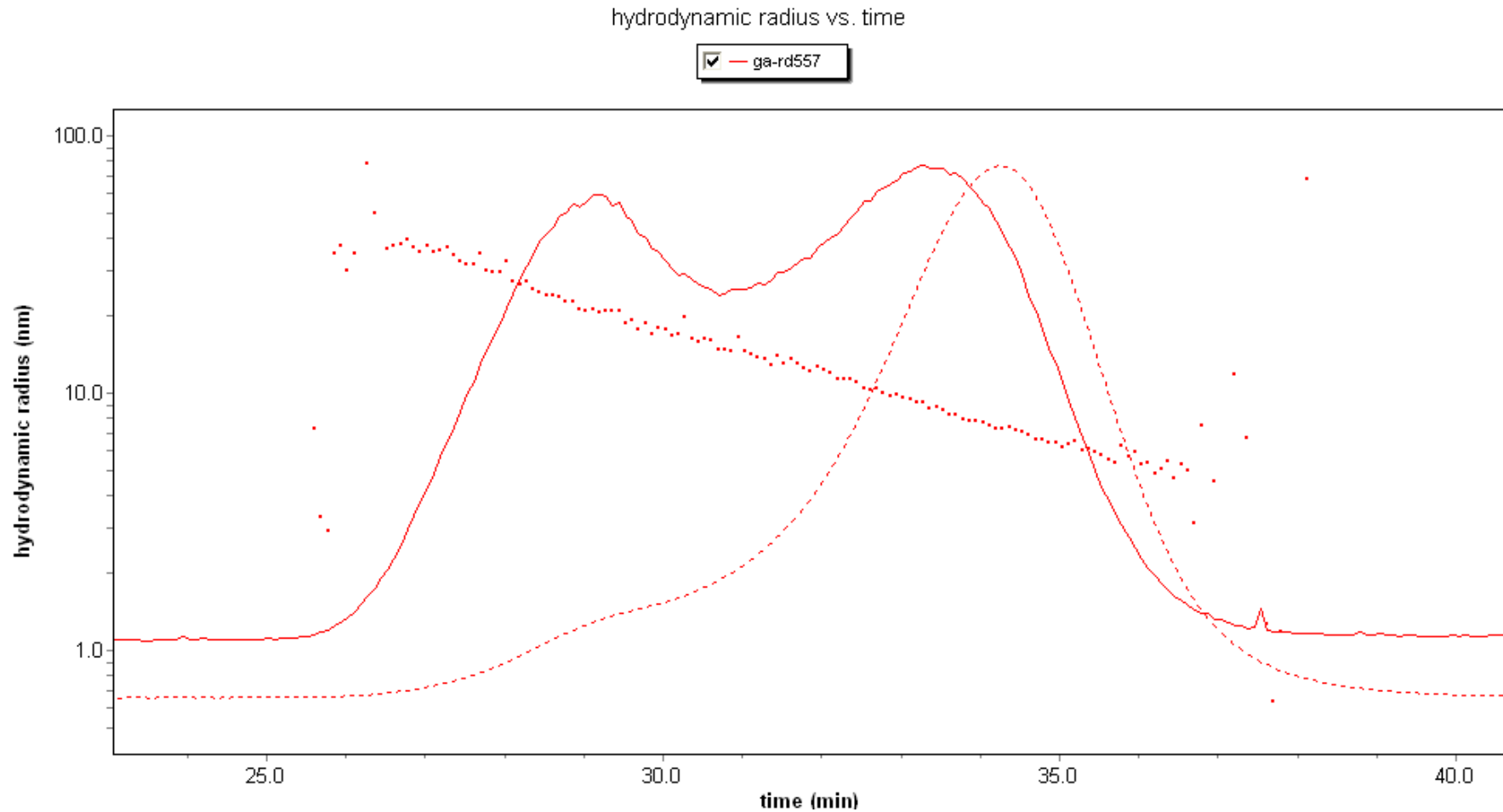
Exemple : revenons à la gomme arabique



	Value
Peak Number	1
QELS Slice Index	226
Abscissa Position	14.474 mL
Rh	21.26 ± 0.23 nm
Dt	(1.03 ± 0.01) e-7 cm ² /sec

Sur cette fraction éluée : Rh~21nm (avec une bonne précision)

Couplage SEC/QELS : distribution des Rh



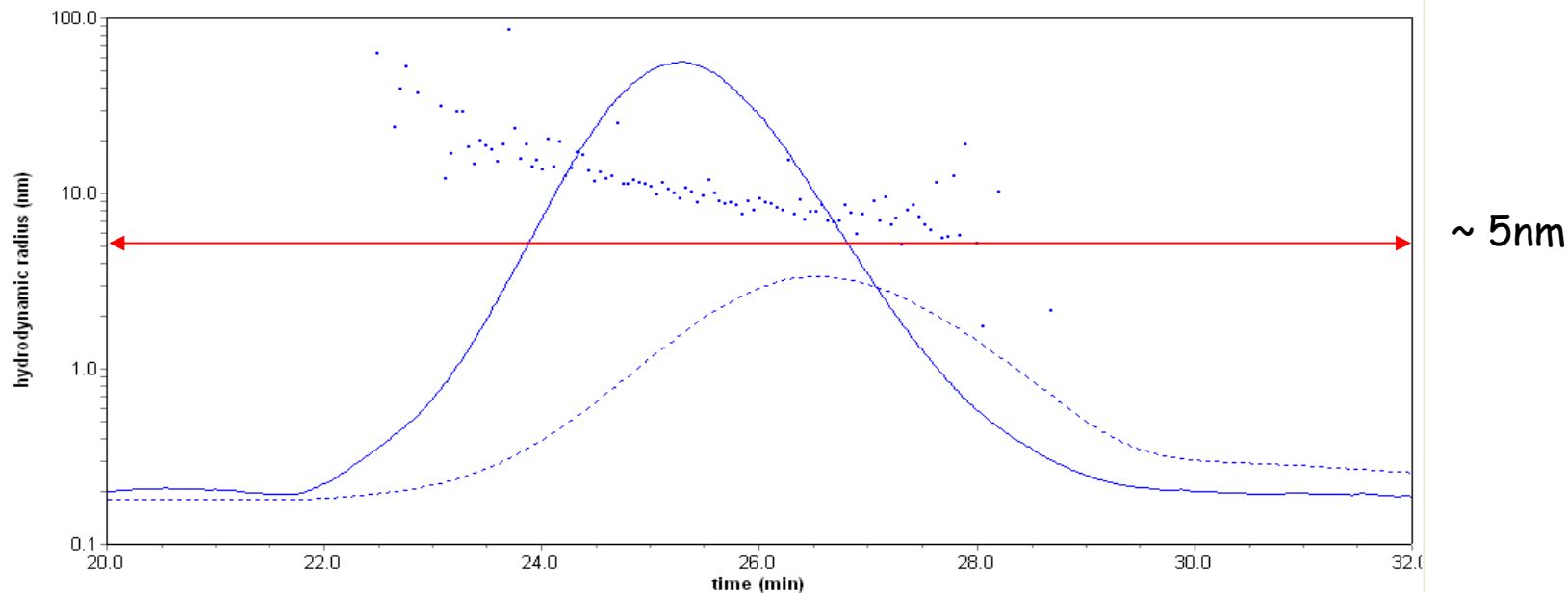
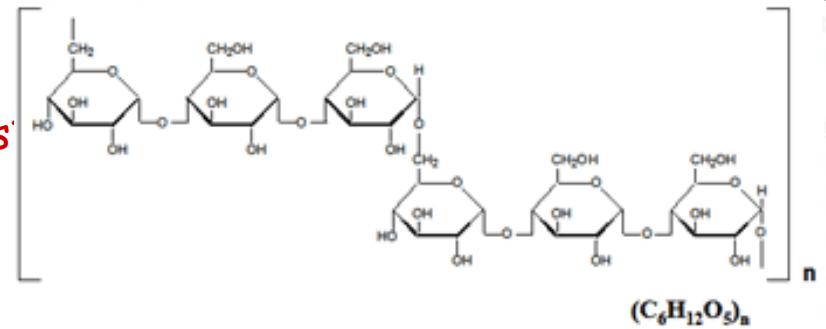
La QELS permet bien de descendre largement en dessous de 10nm

contrairement à la MALLS (diffusion statique multi angles) qui limite vers 20-30nm en raison de l'isotropie de diffusion

Couplage SEC/QELS : distribution des Rh

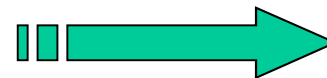
Qu'en est il pour des petits volumes hydrodynamiques

Exemple : pullulane (polysaccharide)
dégradé enzymatiquement



La QELS donne de bons résultats mais la limite se situe vers de 5nm (pas assez de réponse en LS)

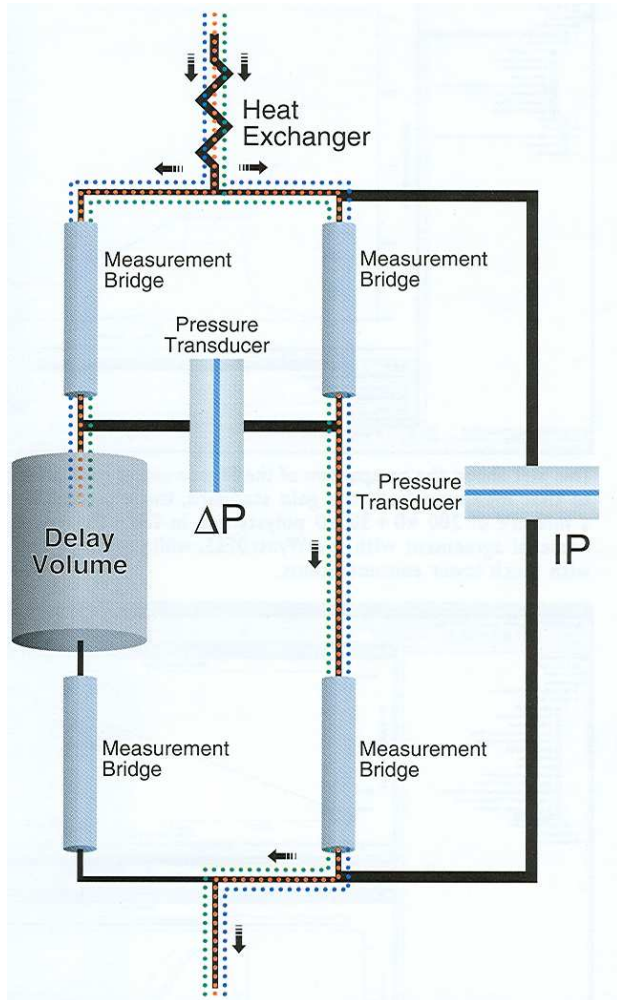
Il faut - soit ↗ la concentration en polymère (plus de diffusion)
- changer de technique



Viscosimètre en ligne ⁸⁰

Couplage SEC/Visco

Principe : 4 capillaires en pont de Wheastone - mesure d'une différence de pression



ΔP = différence de pression à travers le 'pont'

IP = correction de pression entrée/sortie du pont

$$\eta_{sp} = \frac{4\Delta P}{IP - 2\Delta P}$$

$\eta_{sp} = \eta - \eta_0 / \eta_0$ avec η_0 viscosité du solvant

Et $\eta_{red} = \eta_{sp} / C$ avec C concentration en polymère

On remonte à la **viscosité intrinsèque** $[\eta] \sim Vh$
Par la relation de Huggins

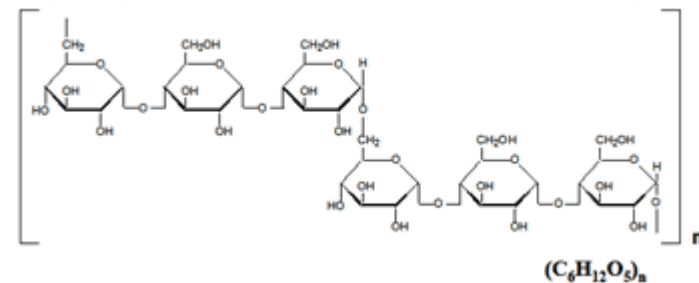
$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

Avec $C \sim 0$ sur chaque fraction éluee en SEC :

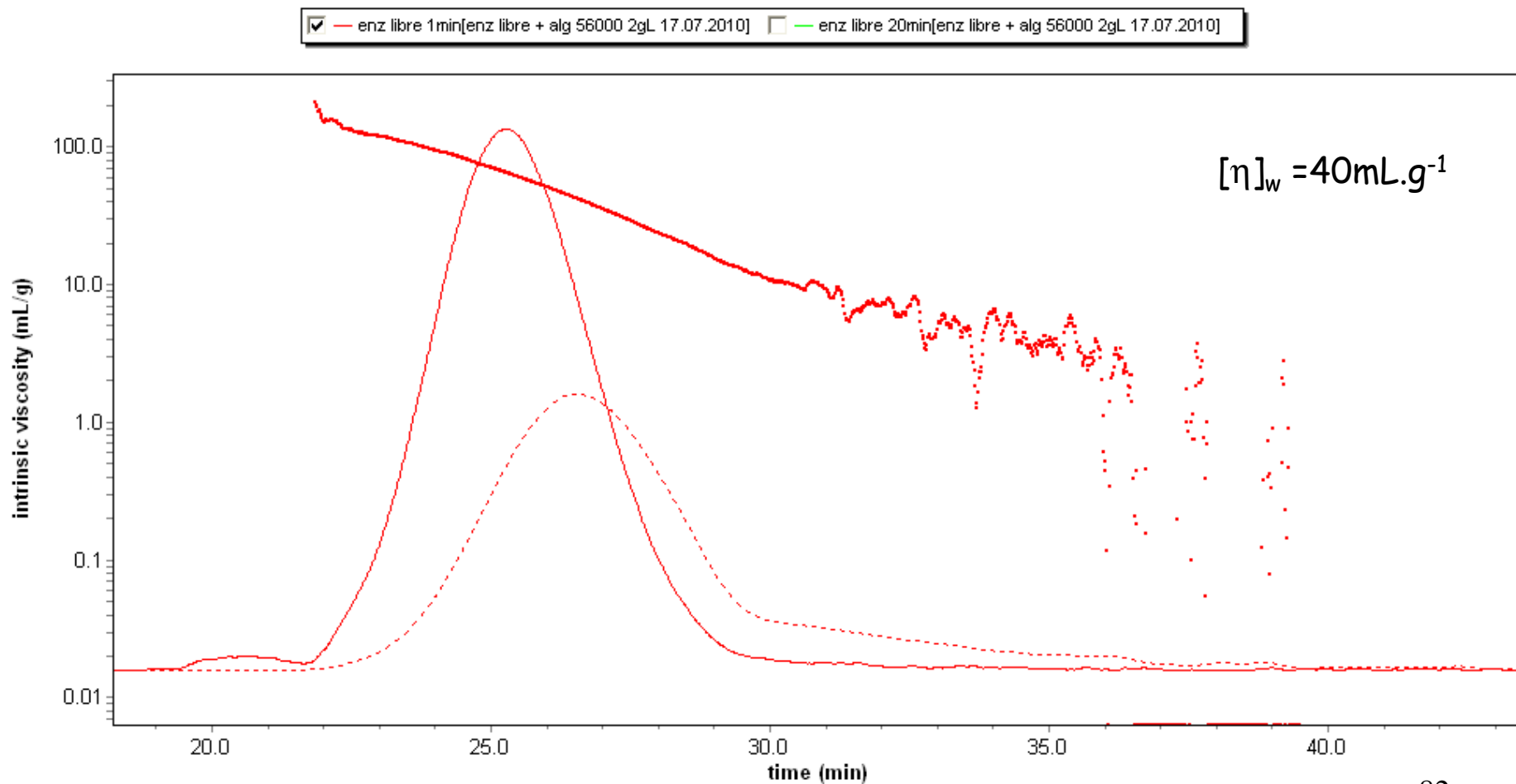
$$\eta_{sp} / C \sim [\eta]$$

Couplage SEC/Visco

Exemple sur un pullulane dégradé :



intrinsic viscosity vs. time



Que peut-on exploiter à partir de cette distribution de viscosité intrinsèque? 82

Couplage SEC/Visco

Accès à Rh

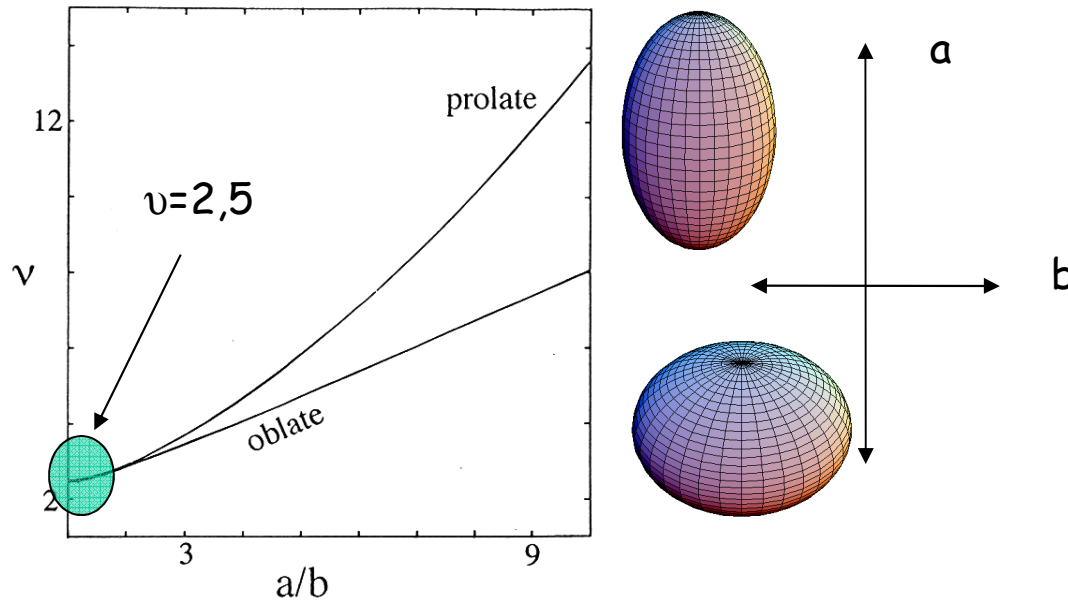
$[\eta]$ est relié au volume hydrodynamique par
L'équation d'Einstein-Simha

$$V_h = \frac{[\eta] M}{\nu N_A}$$

Relation simple quand la particule est sphérique : $\nu=2,5$
(V_h est le volume de la sphère équivalente)

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

Dans le cas d'une particule non sphérique,
ça se complique !!!

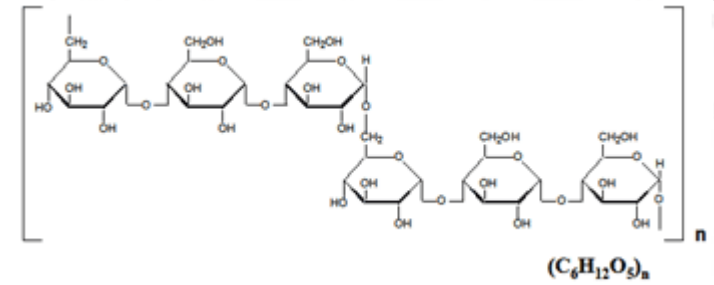


Intérêt :

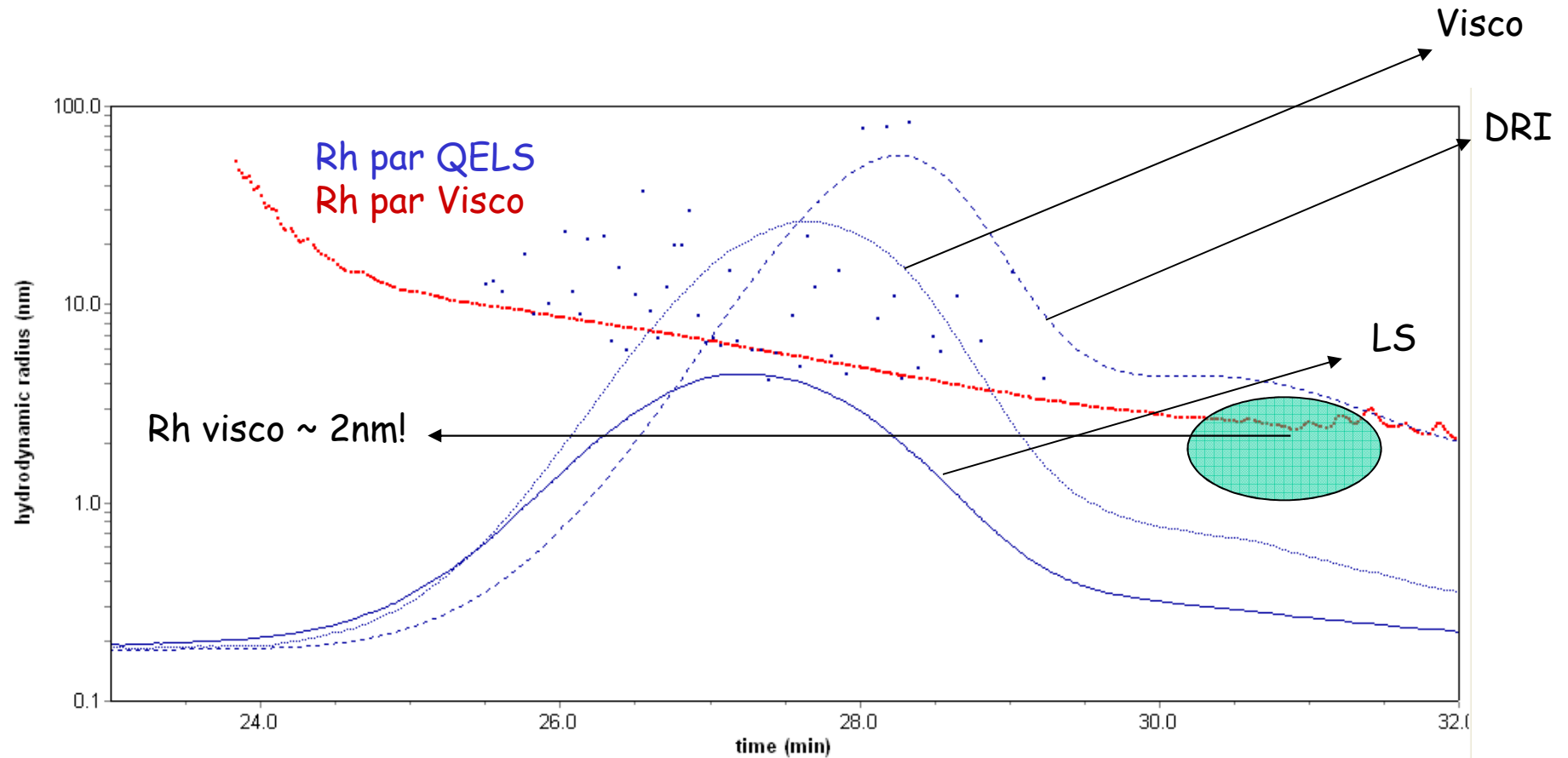
**Accès aux Rh avec
une meilleure sensibilité
que par la QELS??**

Couplage SEC/Visco

Intérêt : Grande sensibilité comparée à la QELS



Exemple pullulane très dégradé ($M_n < 2000g.mol^{-1}$)



Quand la taille de la particule diffusante est trop faible, l'intensité diffusée devient inexploitable

MAIS la sensibilité du détecteur de pression (visco) permet la mesure

Couplage SEC/MALLS/ Visco : Relation du Mark-Houwink - aspect conformationnel -

Relation de Mark-Houwink relie Masse molaire et viscosité intrinsèque :

$$[\eta] = KM^a \quad (\text{K n'a pas de signification physique particulière})$$

Très utilisée pour déterminer les masses molaires à partir de mesures de Viscosité intrinsèque en capillaire (peu coûteux et facile de mise en œuvre)

Relation fastidieuse à obtenir avant l'arrivée du couplage SEC/MALLS/QELS

Pour des polymères en solution (pelote statistique ± gonflée de solvant)
On distingue les valeurs de a suivantes :

$a = 0.5$: pelote en solvant Thêta (Θ random coil)

$a \sim 0.5-0.8$ pelote statistique en bon solvant (random coil)

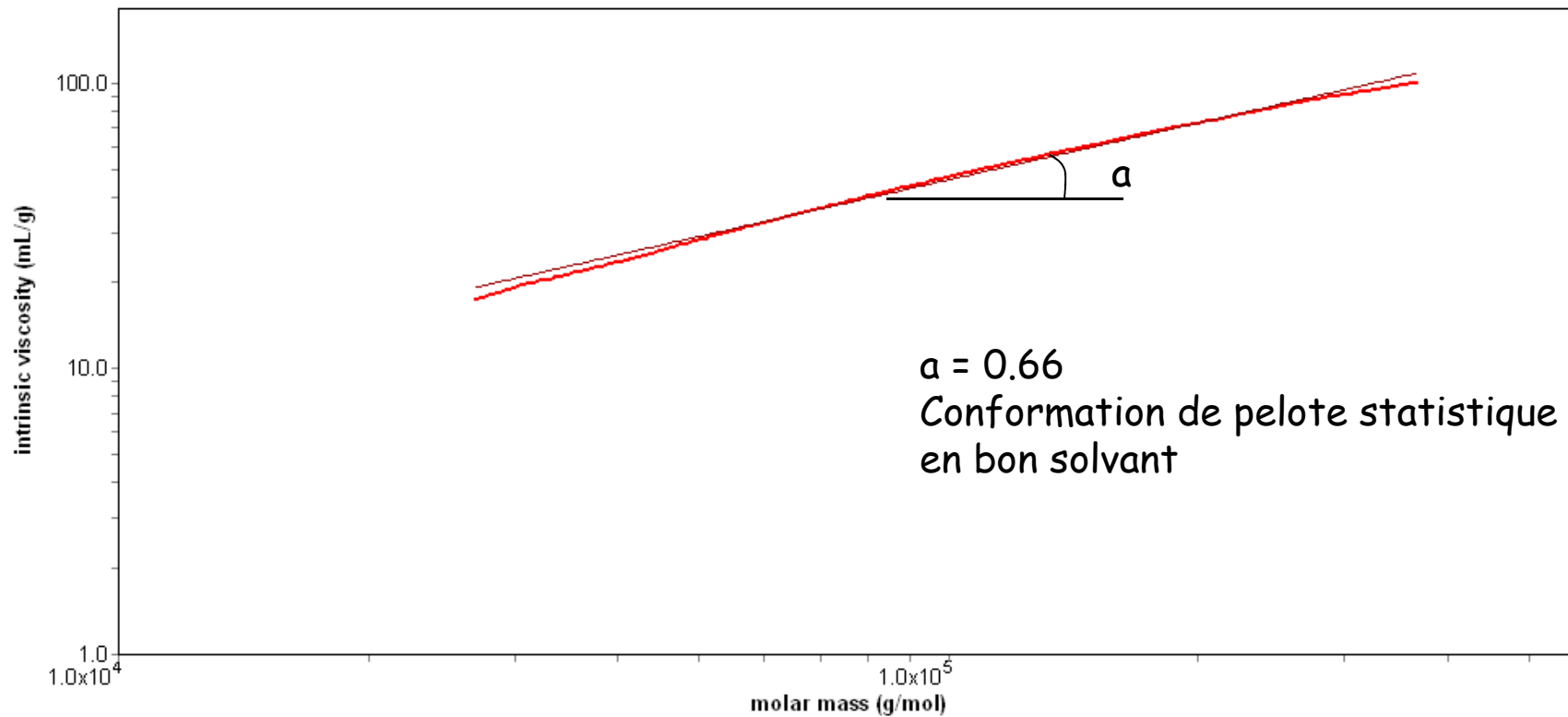
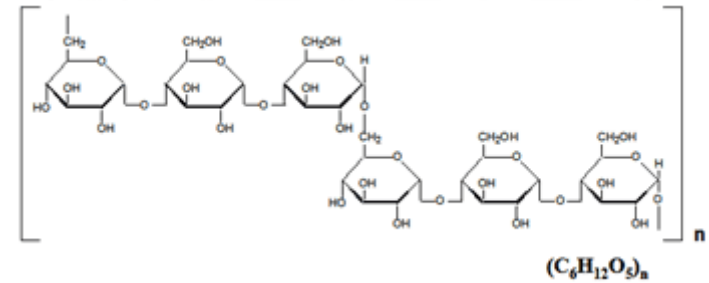
$a > 1$ conformation en bâtonnet rigide (rod like)

Pour des colloïdes en conformation de sphère dures

Ou des polymères ultra-branchés : $a \sim 0-0.5$

Couplage SEC/MALLS/ Visco : Relation du Mark-Houwink - aspect conformationnel -

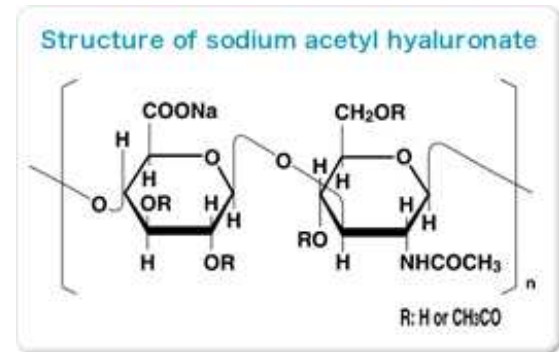
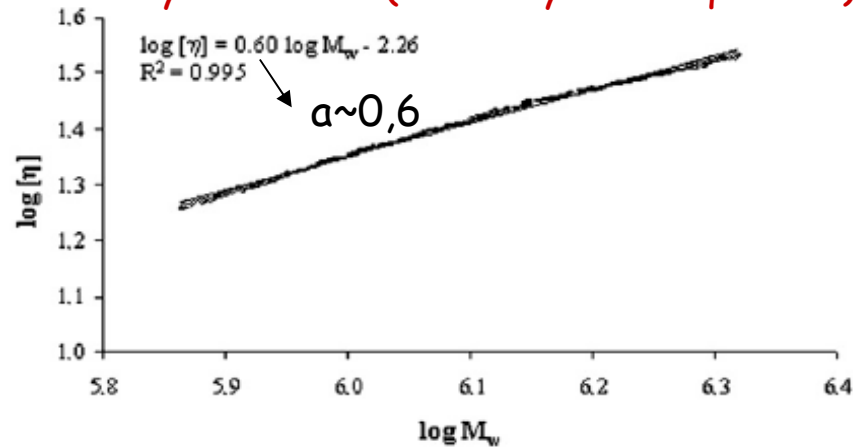
Exemple sur un pullulane non dégradé



Couplage SEC/MALLS/ Visco : Relation du Mark-Houwink - aspect conformationnel -

Exemple sur un Hyaluronane (acide hyaluronique HA)

B



C

M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w/M_n	$[\eta]$ (dl/g)	R_h (nm)	a	$\log k$
1430 ± 40	1020 ± 20	1.4 ± 0.1	25.0 ± 1.0	81 ± 1	0.60 ± 0.01	-2.27 ± 0.05

Complete HA hydrodynamic characterization/A. La Gatta et al./Anal. Biochem. 404 (2010) 21–29

Table 1

Values of weight average molar mass (M_w), numeric average molar mass (M_n), polydispersity index (M_w/M_n), intrinsic viscosity ($[\eta]$), hydrodynamic radius (R_h), and Mark-Houwink constants a and $\log k$ for HA fragments produced at increasing incubation times with BTH at 0.5 U/ml, as obtained by SEC-TDA analyses.

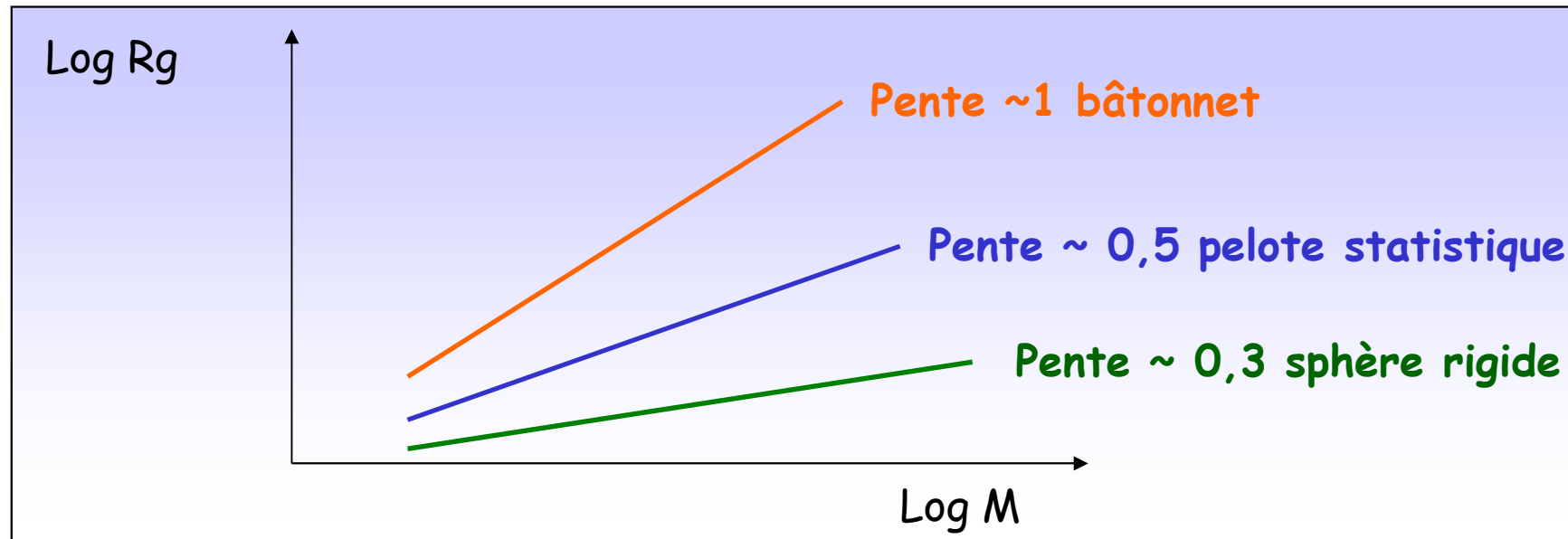
t (min)	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w/M_n	$[\eta]$ (dl/g)	R_h (nm)	a	$\log k$
0	1430 ± 40	1020 ± 20	1.4 ± 0.1	25.0 ± 1.0	81 ± 1	0.60 ± 0.01	-2.27 ± 0.05
10	1333 ± 20	889 ± 30	1.5 ± 0.1	22.0 ± 1.0	74 ± 1	0.62 ± 0.01	-2.30 ± 0.05
30	1165 ± 40	728 ± 40	1.6 ± 0.1	19.7 ± 1.0	66 ± 1	0.64 ± 0.01	-2.34 ± 0.05
45	1026 ± 20	641 ± 20	1.6 ± 0.1	18.6 ± 1.0	63 ± 1	0.66 ± 0.01	-2.47 ± 0.05
60	986 ± 40	580 ± 70	1.7 ± 0.1	18.0 ± 2.0	60 ± 3	0.67 ± 0.02	-2.63 ± 0.09
90	800 ± 20	469 ± 40	1.7 ± 0.1	16.0 ± 2.0	56 ± 1	0.67 ± 0.01	-2.70 ± 0.06
120	673 ± 20	396 ± 40	1.7 ± 0.1	15.0 ± 1.0	51 ± 2	0.69 ± 0.01	-2.86 ± 0.05
150	593 ± 30	345 ± 20	1.7 ± 0.1	14.1 ± 2.0	48 ± 2	0.70 ± 0.01	-2.89 ± 0.10
180	517 ± 10	304 ± 10	1.7 ± 0.1	13.0 ± 0.1	46 ± 1	0.71 ± 0.01	-2.93 ± 0.05
240	450 ± 20	270 ± 30	1.7 ± 0.1	11.9 ± 0.5	42 ± 1	0.72 ± 0.01	-3.07 ± 0.10
300	390 ± 20	240 ± 20	1.7 ± 0.1	10.8 ± 0.5	39 ± 1	0.75 ± 0.01	-3.18 ± 0.05
360	350 ± 20	200 ± 10	1.7 ± 0.1	9.9 ± 0.3	36 ± 1	0.75 ± 0.01	-3.18 ± 0.05
900	250 ± 10	140 ± 10	1.7 ± 0.1	7.0 ± 0.3	28 ± 1	0.79 ± 0.01	-3.50 ± 0.05
1440	160 ± 7	104 ± 3	1.6 ± 0.1	4.9 ± 0.3	22 ± 1	0.83 ± 0.03	-3.72 ± 0.23

$a \nearrow$ quand $M_w \searrow$

Traduit la rigidité du polysaccharide quand la masse molaire diminue

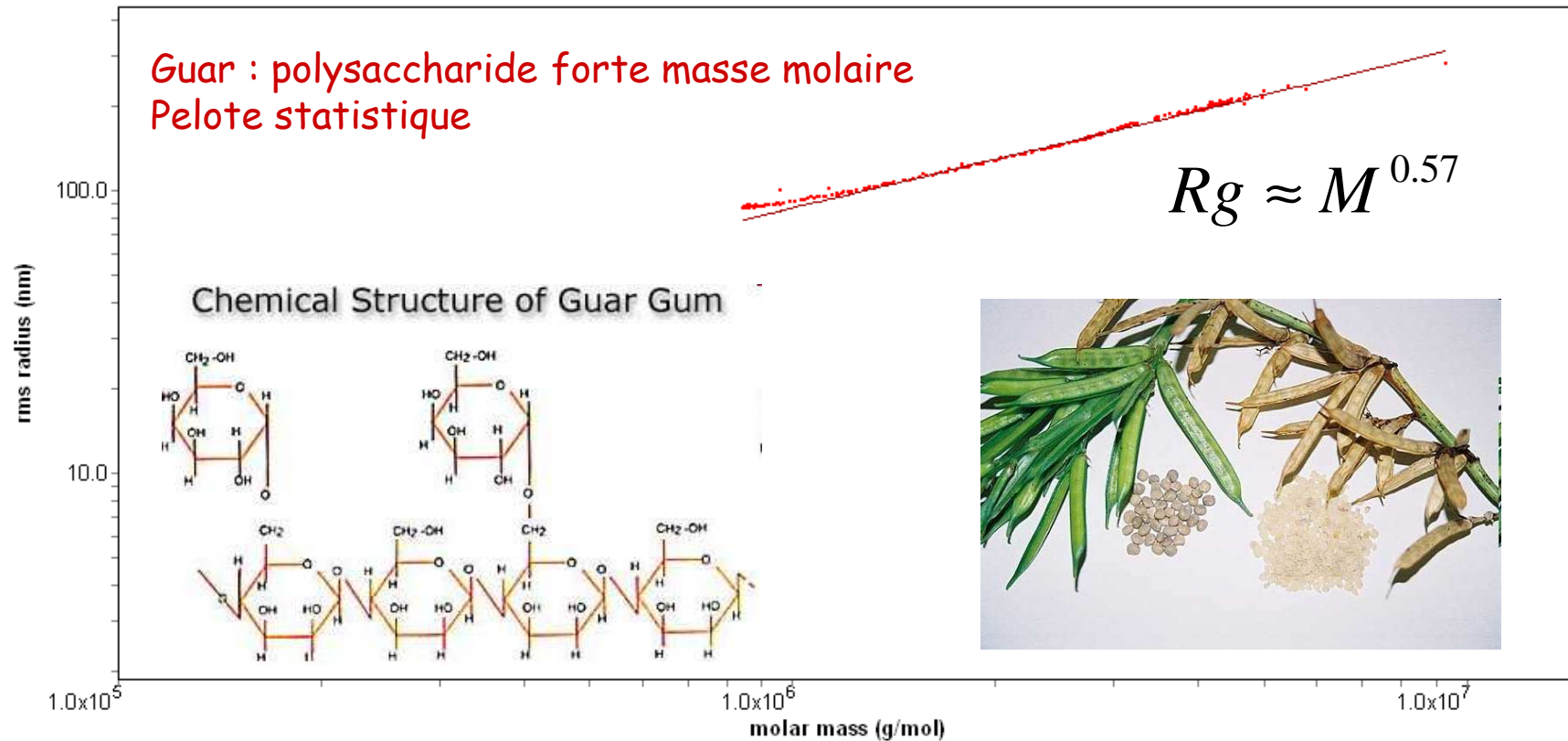
Couplage SEC/MALLS : aspect conformationnel

Pour accéder à la conformation : relation R_g vs. M (proche la relation de MH)



Couplage SEC/MALLS : aspect conformationnel

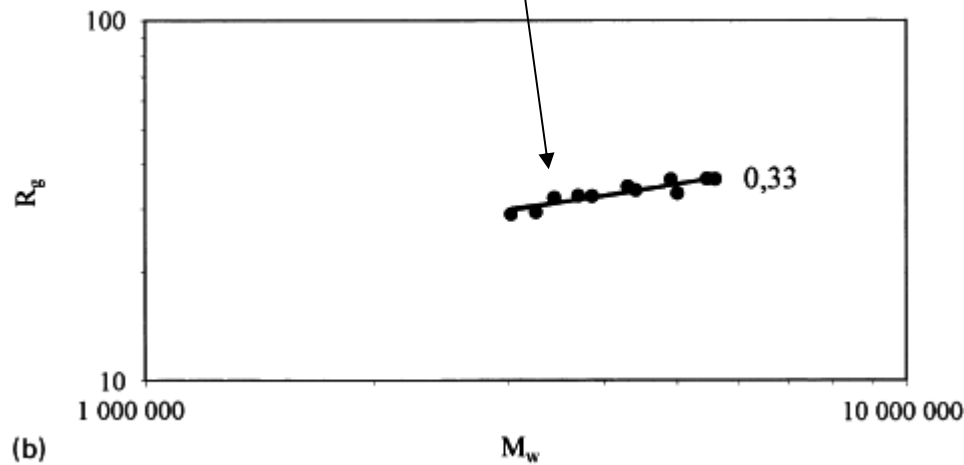
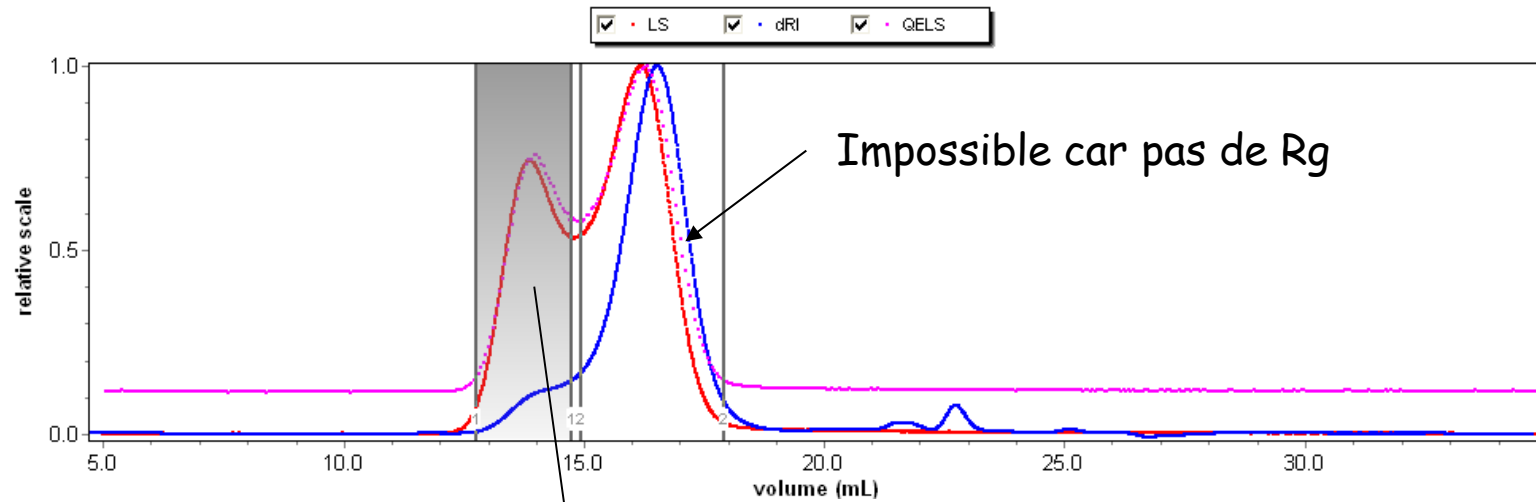
Pour accéder à la conformation : relation R_g vs. M (proche de la relation de MH)



Couplage SEC/MALLS : aspect conformationnel

Pour accéder à la conformation : relation R_g vs. M (proche la relation de MH)

Exemple : Gomme arabique (population 1)



$$R_g \approx M^{0.33}$$

Conformation plus compacte

Traduit le fort
Degré de ramification des
AGP

**Conclusion ; le couplage SEC multi-détection
Permet d'atteindre un grand nombre d'information**

MALLS

Mn, Mw et leurs distribution

Rg et la distribution (si diffusion anisotrope, objet suffisamment grand devant l_θ)

QELS

Rh et la distribution par QELS si suffisamment d'intensité diffusée

Visco

$[\eta]$ et la distribution

Rh si conformation globalement sphérique avec + de précision que QELS

Conformation

Rg vs M

Rh vs M

$[\eta]$ vs M

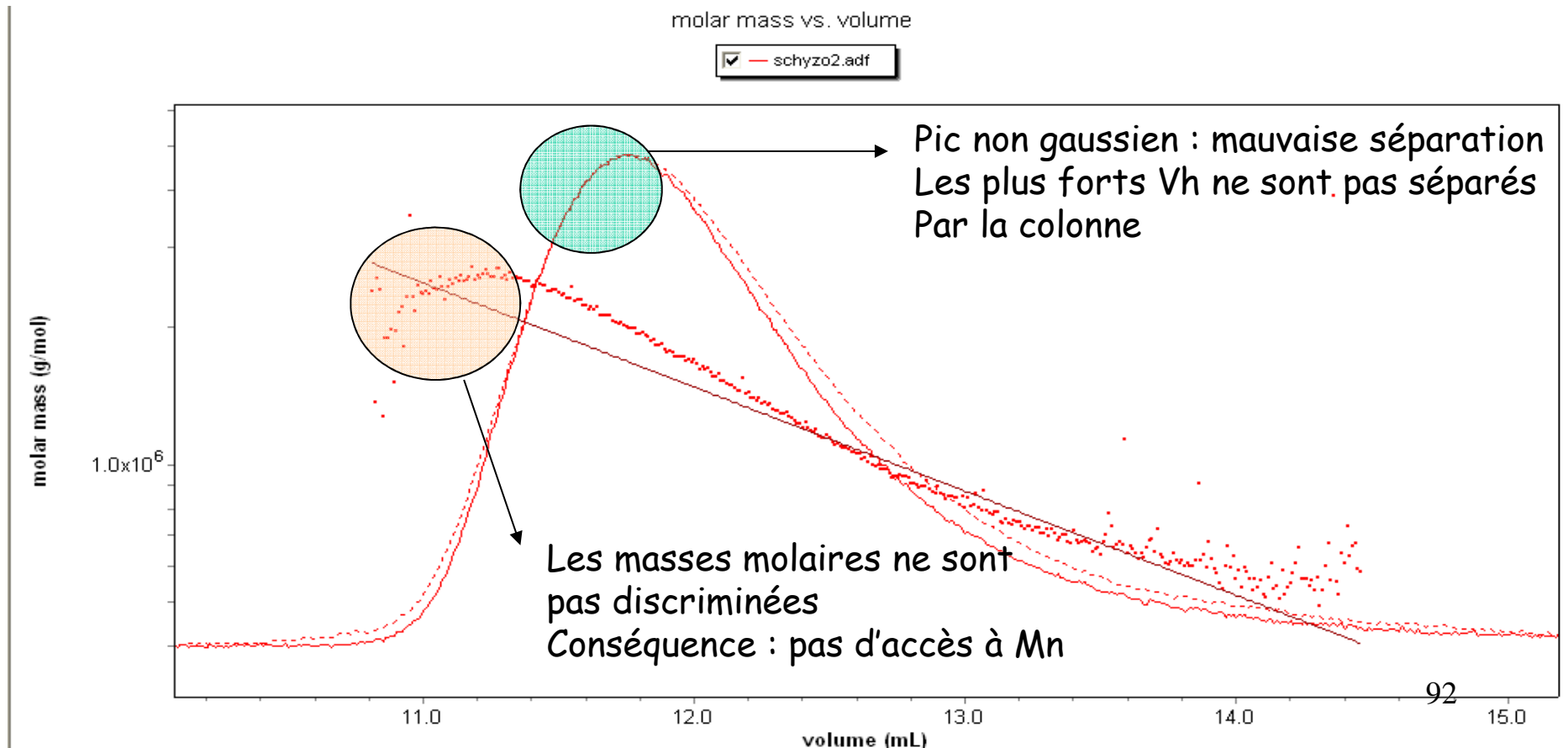
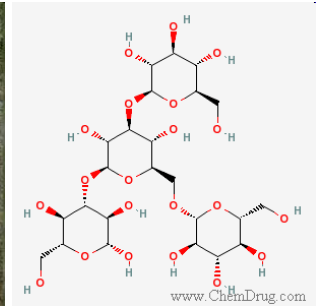
**MAIS DANS CERTAINS CAS LA SEC NE PERMET PLUS
UNE BONNE SEPARATION STERIQUE**

Polymère trop gros : Hors gamme d'exclusion

Objets trop fragiles (liposomes) : rupture sous l'action des forts cisaillement dans la SEC HP
Polymères en interactions avec la phase stationnaire de la colonne

Limites de la SEC : Grande taille hors limite d'exclusion

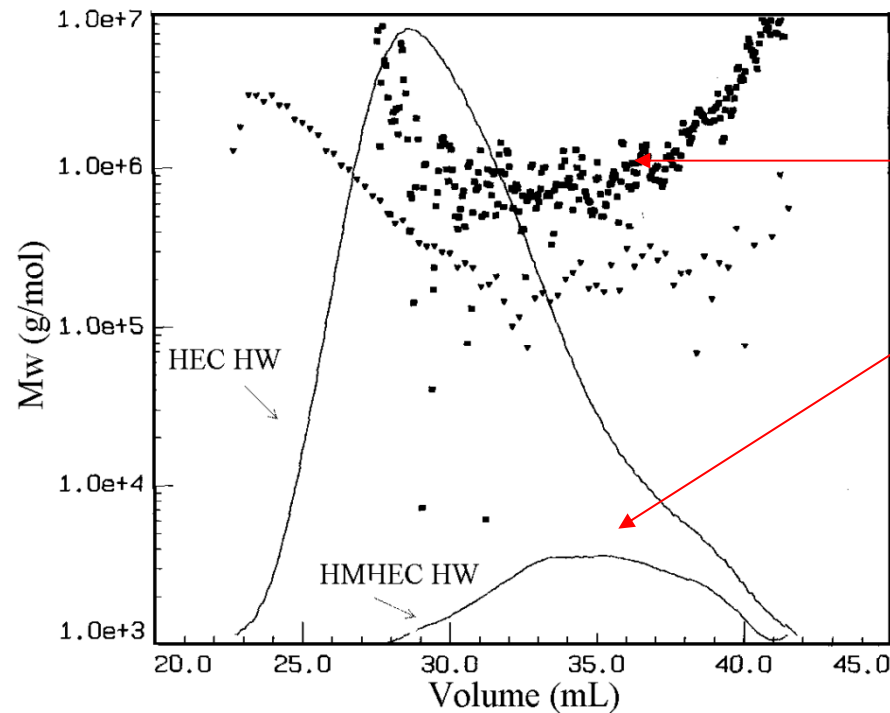
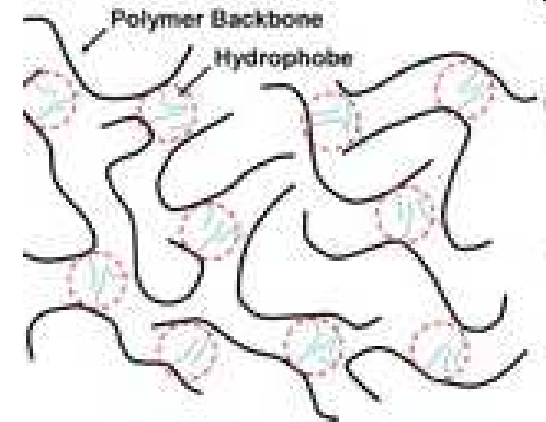
Exemple :
Schizophylane, polysaccharide très rigide
(triple hélice) de très forte masse molaire



Limite liée à une rétention non stérique dans les colonnes :
 Problème d'affinité polymère/phase stationnaire

Exemple : polysaccharides associatifs (amphiphile)

HydroxyEthyl Cellulose Hydrophobiquement Modifié
 (HMHEC avec 0.6% de chaînes alkyle en C16)

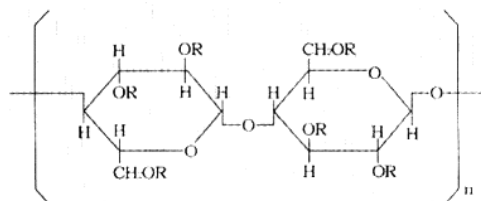


Polymère amphiphile
 (HMHEC)

Les polymères s'adsorbent plus ou moins temporairement sur la phase stationnaire de la colonne

- on endommage la colonne
- on ne fractionne plus uniquement sur critère stérique

*on n'analyse pas la totalité de l'échantillon
 (perte sur la colonne)

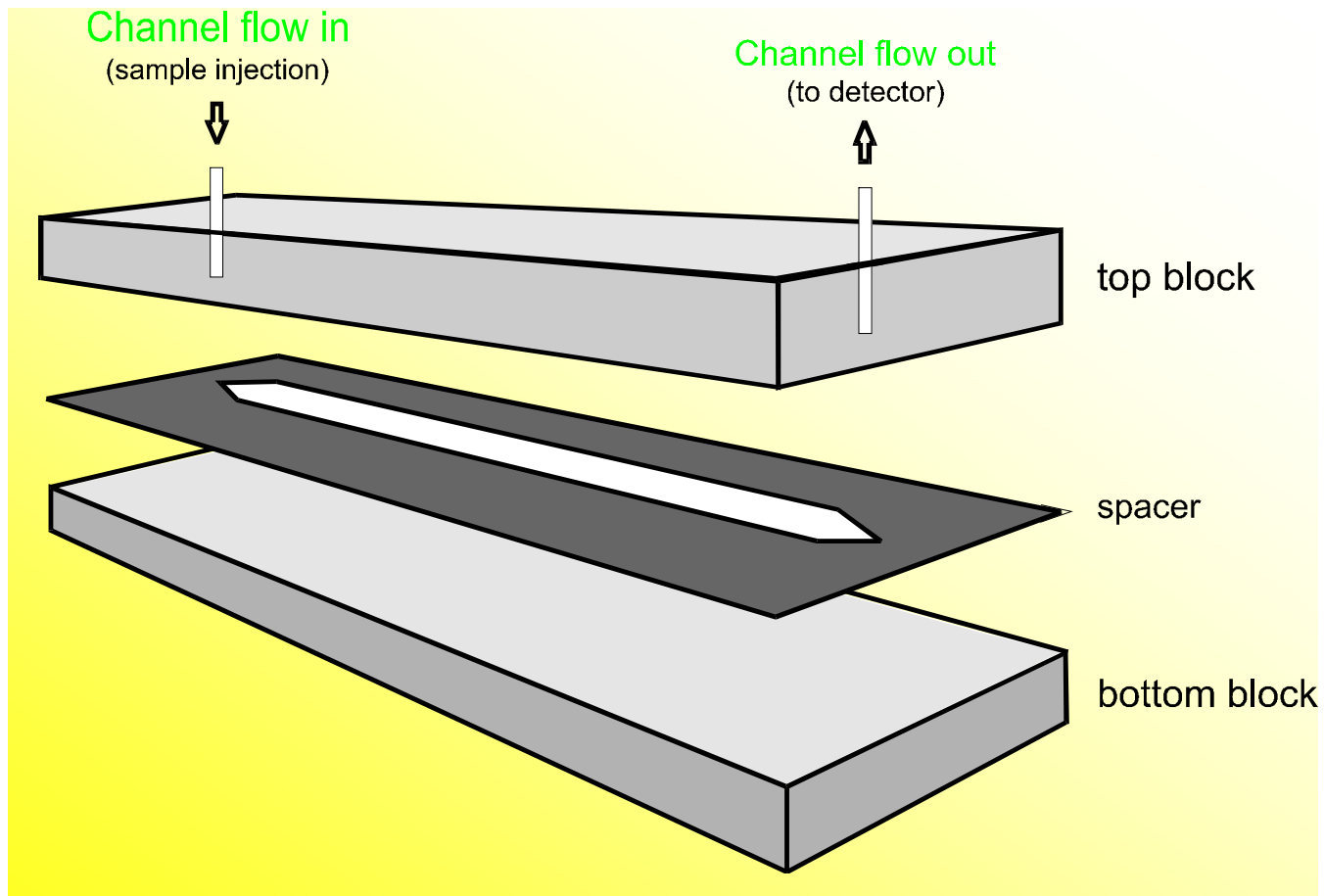


HMHEC - R=C₁₆, 0.6%

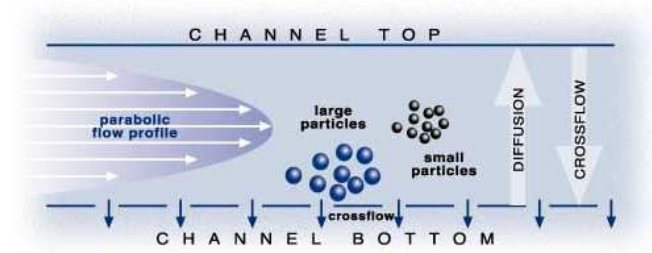
n=polymer degree, R=-H, or -(CH₂-CH(CH₃))O-xH

La solution passe par l'utilisation d'une autre technique de fractionnement stérique

La séparation par flux force ou Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



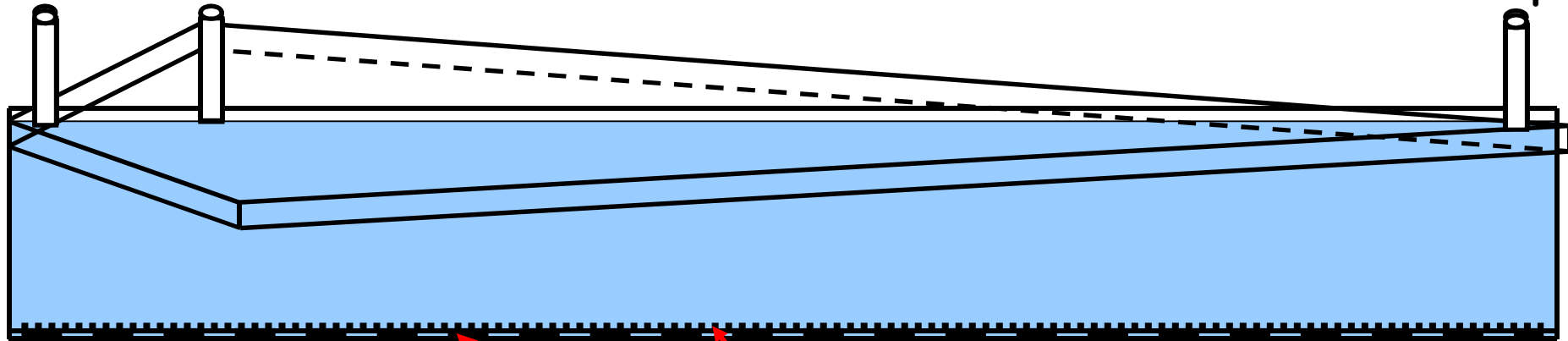
Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



Entrée
Solvant Port
Tampon D'injection

Vue de haut
Vue de coté

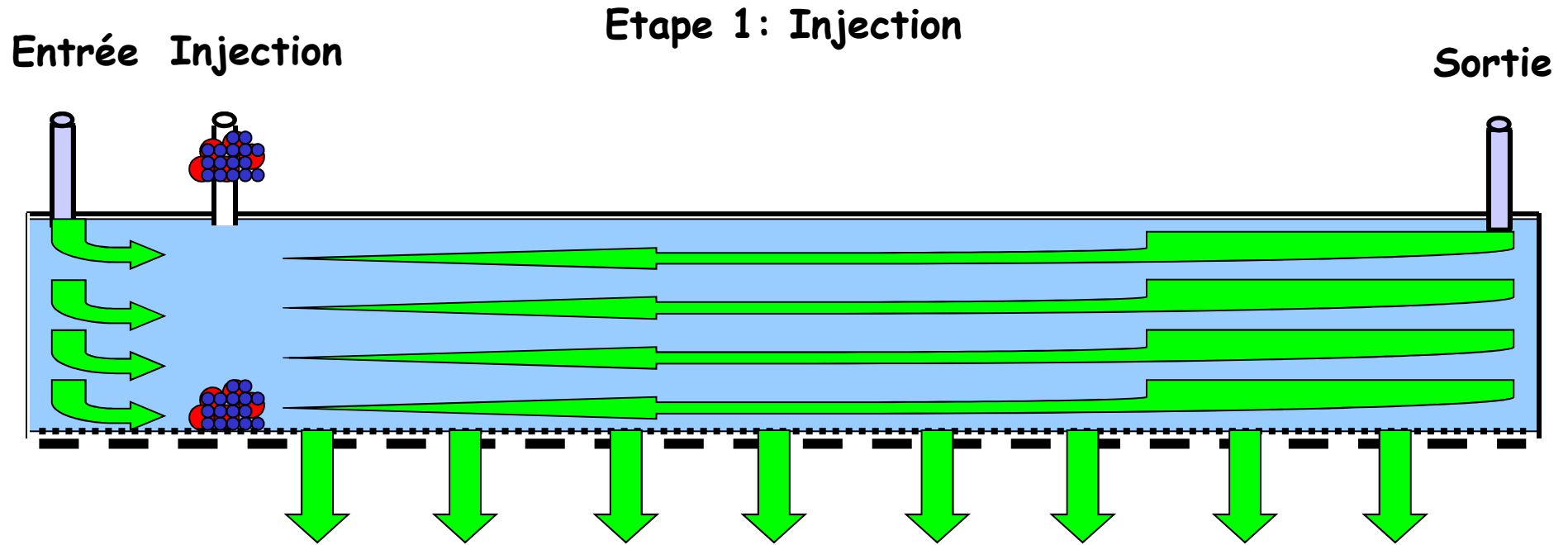
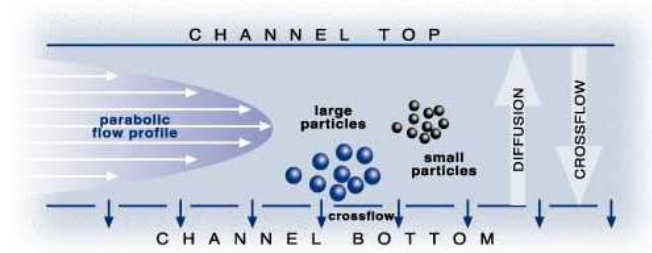
Sortie
Solvant
Tampon



Fritté

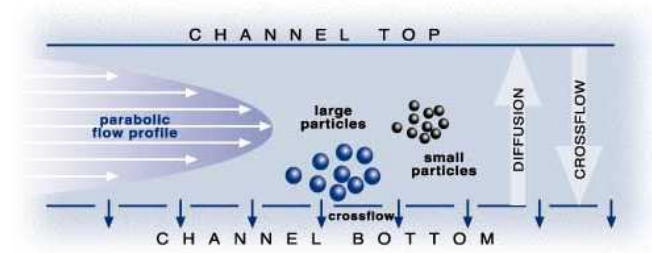
Membrane
(Type ultrafiltration)

Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



Champ de force - fuite de solvant

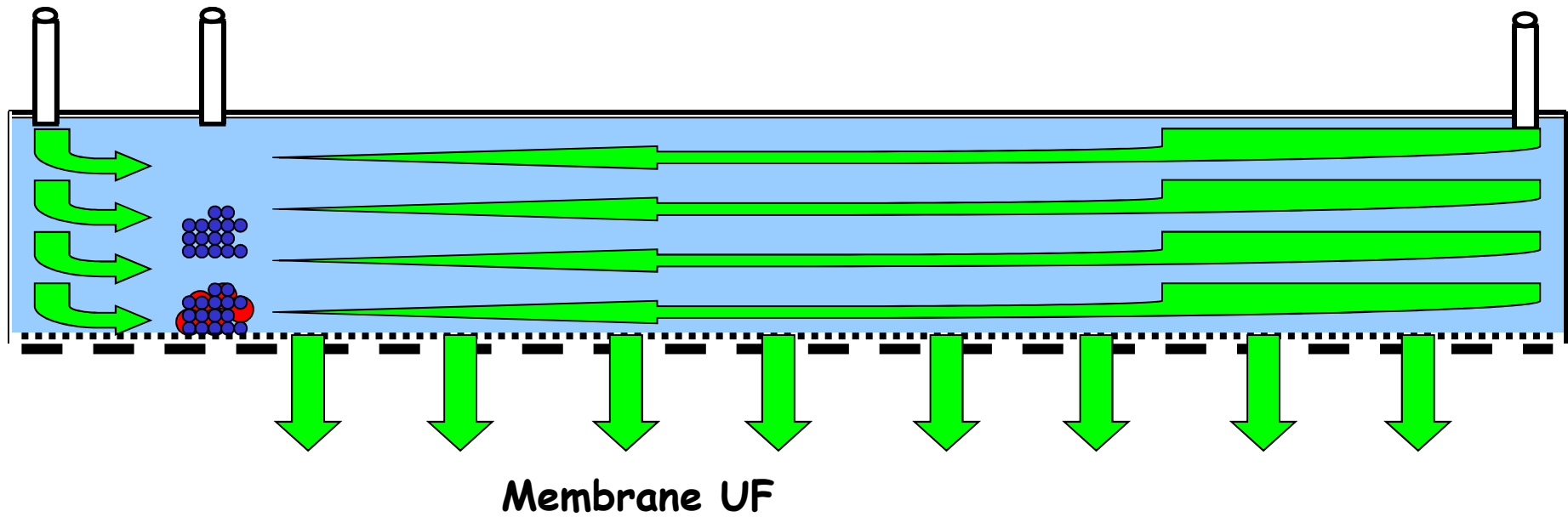
Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



Entrée Injection

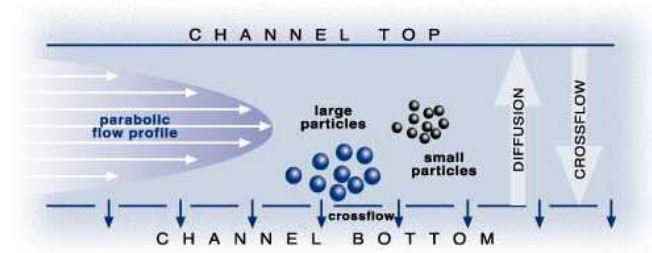
Etape 2: Relaxation

Sortie



Les particules soumises au champ de force
Opposent un coefficient de diffusion Dt

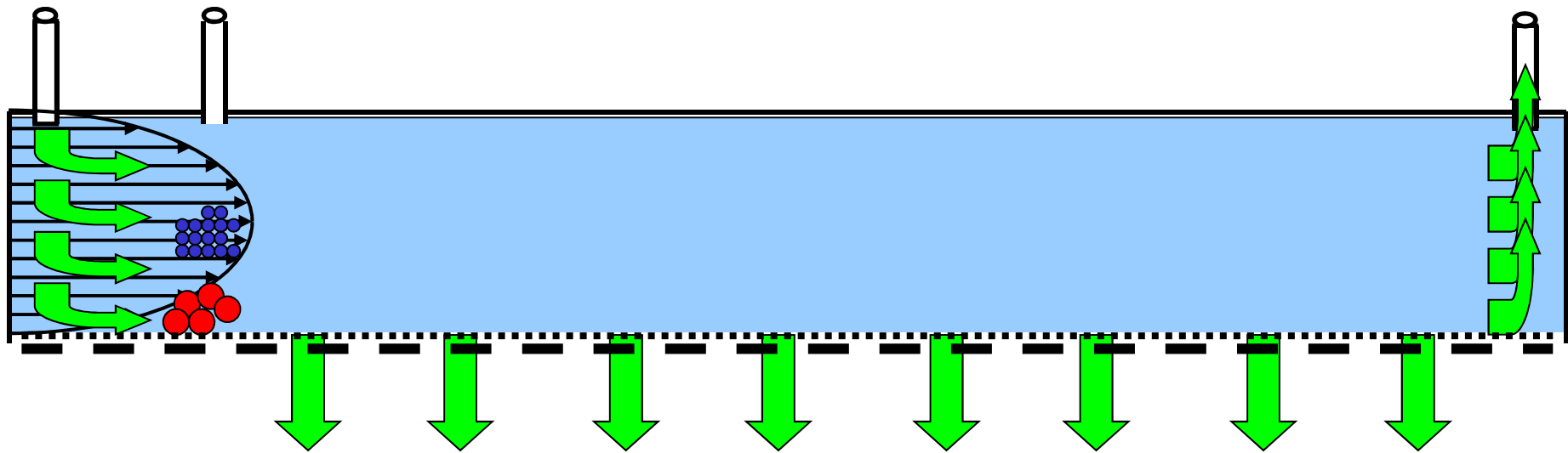
Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



Etape 3: Elution

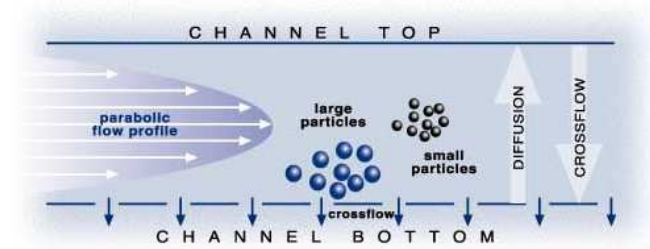
Entrée Injection

Sortie



Membrane UF

Le profil parabolique d'élution entraîne plus vite les particules au centre du canal : celles de petites tailles

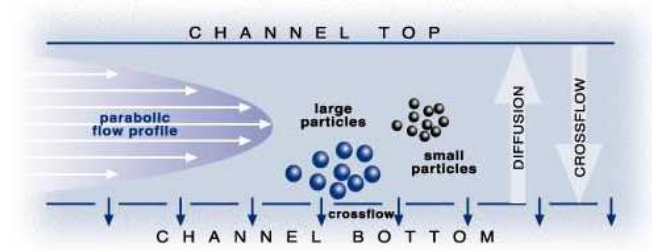


Si on reprend les problèmes rencontrés en SEC

- limites d'exclusion
Résolu puisque les conditions d'éluion sont fixées par l'opérateur
les limites de taille supérieures sont voisines de 500nm
- affinité polymère/phase stationnaire
Résolu puisque les surface d'échanges sont limitées à la surface de la membrane (bien < à la surface d'échange des grains poreux)
- fragilité au cisaillement
Résolu puisque la seule source de cisaillement est limitée au débit dans un canal de 250 μ m (bien < aux cisaillements exercés entre des grains poreux)

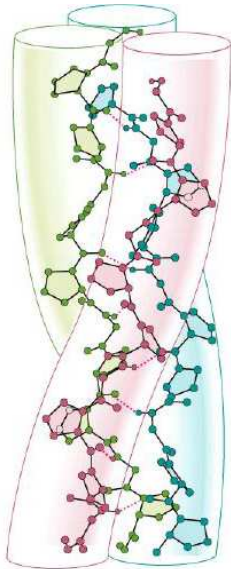
Application au couplage F4/MALLS :

Cas des forts Vh



Exemple : protéine de type gélatine

(Thèse de Khalid RHBII, Université de Toulouse, École d'agronomie de Purpan -2010)



Tropocollagène

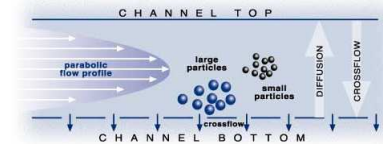
ΔT



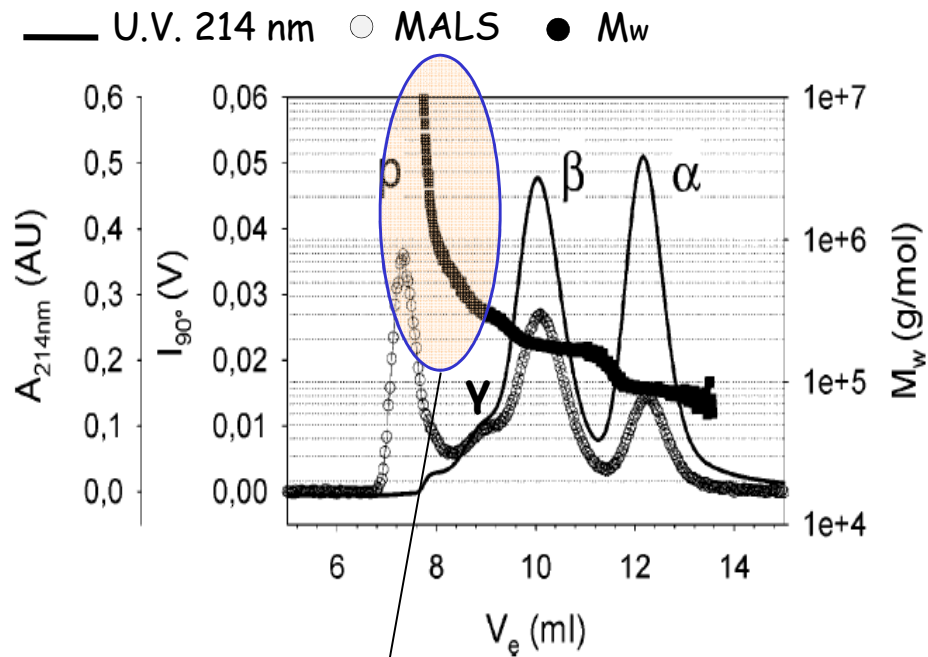
Gélatine

Le collagène est une protéine fibreuse formant des triples hélices

La dénaturation des triples hélices de collagène produit des chaînes en conformation pelote statistique

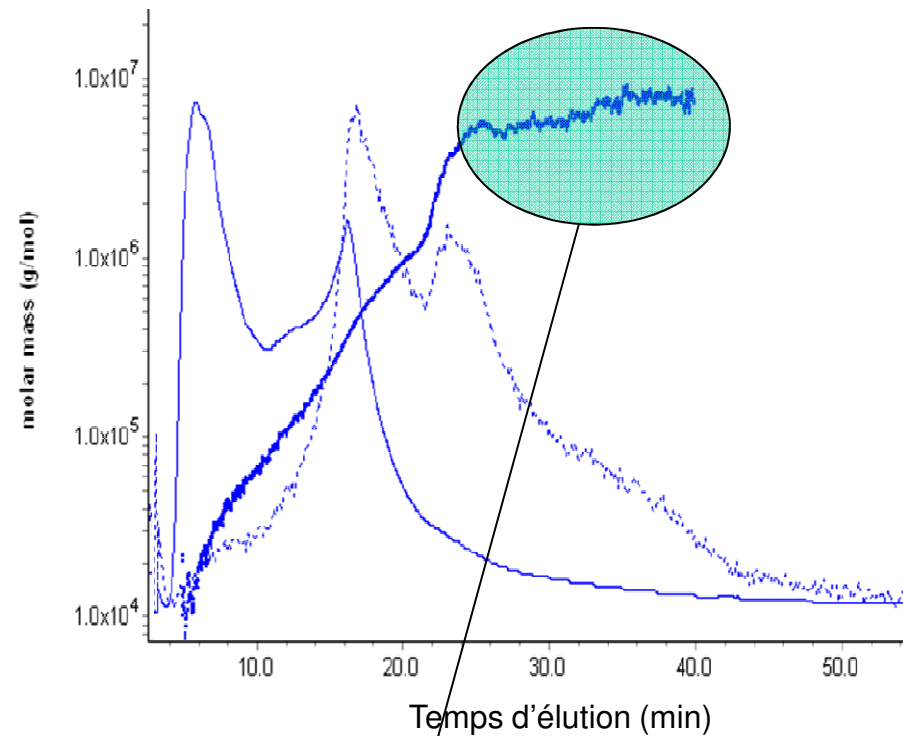


SEC-MALLS Gélatine



Particules de très hauts poids moléculaires éluées dans le volume mort

AF4/MALLS : Gélatine

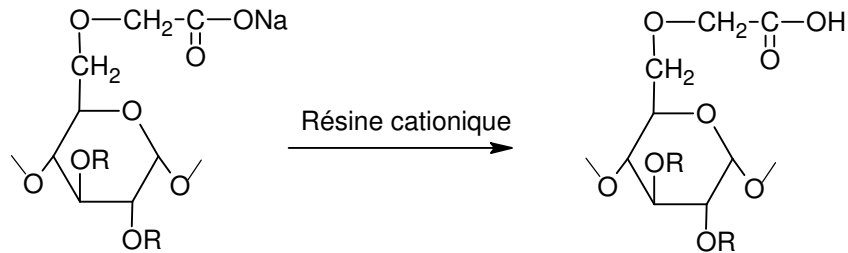


Particules de très hauts poids moléculaires séparées

Application au couplage F4/MALLS :

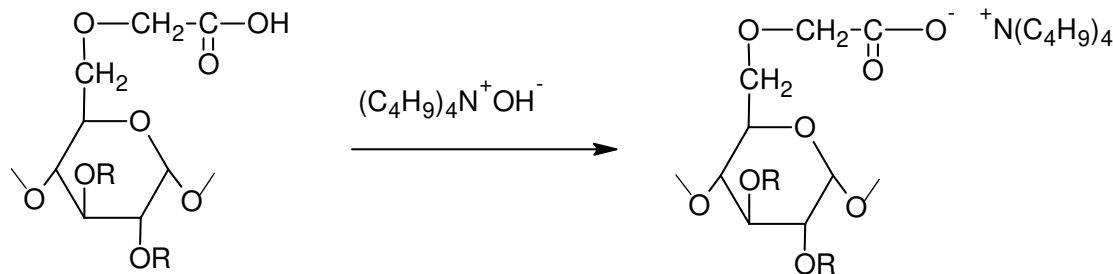
Cas des interactions polymère/phase stationnaire

Synthèse du HMCMP (hydrophobically modified CMP) par voie ESTER

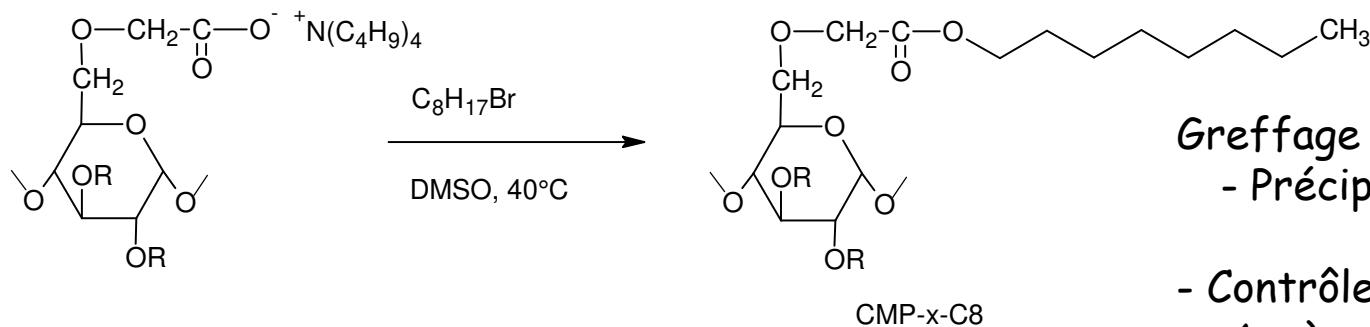


Passage du CMP sur résine pour obtenir la forme acide

R=H ou CH₂COONa



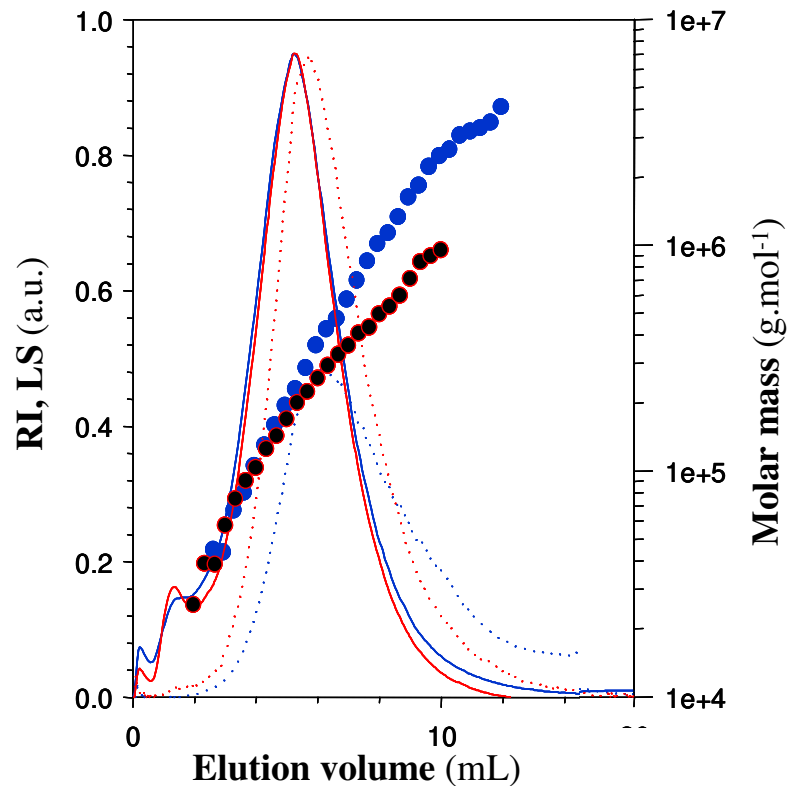
Transformation du CMP acide en sel de tertio butyl ammonium
But : rendre le polymère soluble dans le DMSO (solvant mixte)



Greffage du bromoalcane (ici C₈)
- Précipitation dans NaCl 1M
- Dialyse
- Contrôle du taux de C_n par GPC
Après saponification des C_n

Application au couplage F4/MALLS :
 Cas des interactions polymère/phase stationnaire

CMP / CMP-7-C₈



$$V_e \text{ CMP-7-C}_8 \approx V_e \text{ CMP}$$

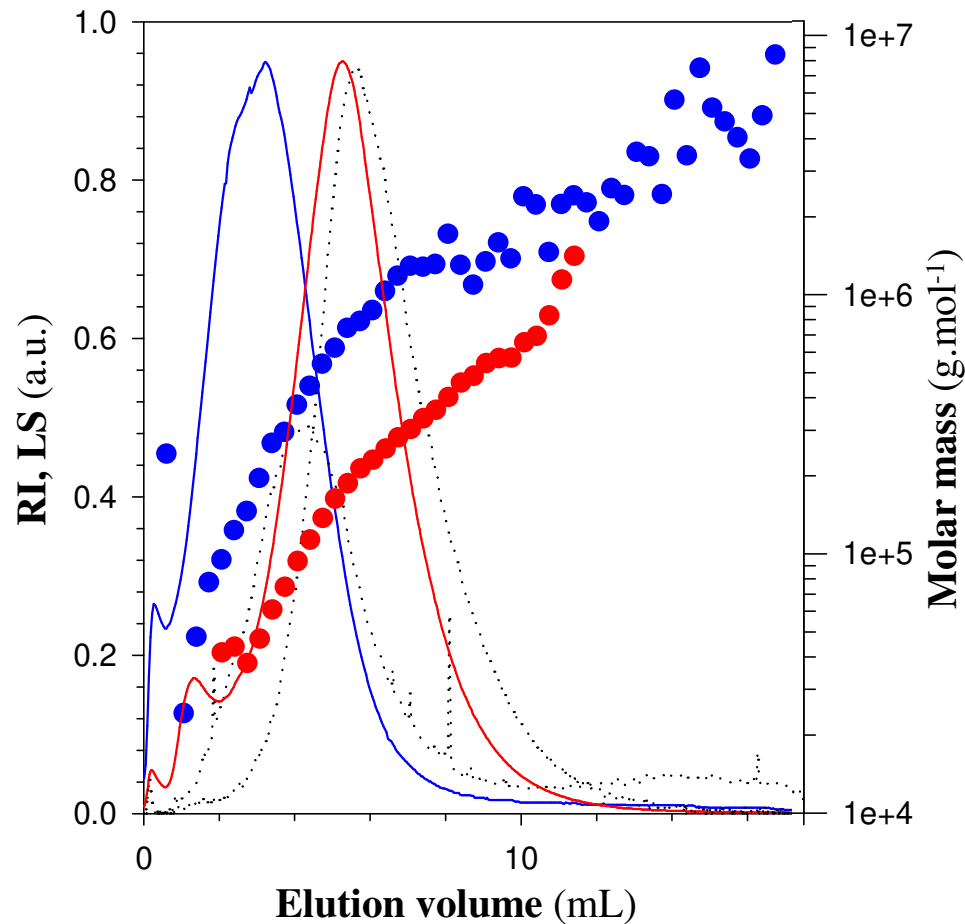
$$R_H \text{ CMP-7-C}_8 \approx R_H \text{ CMP}$$

$$LS \text{ CMP-7-C}_8 \approx LS \text{ CMP}$$

	CMP	CMP-7-C ₈
\overline{M}_n (g.mol ⁻¹)	145 000	160 000
\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	280 000	470 000
\overline{DP}_n	600	640
I	1.8	3

Chaînes isolées - conformation
 proche du précurseur + quelques
 agrégats augmentant Mw et Ip

CMP / CMP-45-C₈



CMP-45-C₈

V_e CMP-45-C₈ < V_e HM-CMP

R_H CMP-45-C₈ < R_H HM-CMP

	HM-CMP	CMP-45-C ₈
\overline{M}_n (g.mol ⁻¹)	145 000	155 000
\overline{DP}_n	600	550
I	1.8	2.1

Chaînes isolées compactes

Associations hydrophobes intramoléculaires

Disparition des agrégats