



HAL
open science

La chromatographie en phase supercritique couplée avec une détection UV et spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse d'échantillons complexes : application aux bio-huiles

Julien Crepier

► To cite this version:

Julien Crepier. La chromatographie en phase supercritique couplée avec une détection UV et spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse d'échantillons complexes : application aux bio-huiles. Chimie analytique. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1050 . tel-01807763

HAL Id: tel-01807763

<https://theses.hal.science/tel-01807763>

Submitted on 5 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1050

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Ecole Doctorale de Chimie de Lyon

Spécialité de doctorat : Chimie analytique

Soutenue publiquement le 03/04/2018, par :
Julien CREPIER

La chromatographie en phase supercritique couplée avec une détection UV et spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse d'échantillons complexes : application aux bio-huiles

Devant le jury composé de :

Cardinael, Pascal	Professeur	Université de Rouen	Rapporteur
Guillarme, Davy	Senior lecturer	Université de Genève	Rapporteur
Le Masle, Agnès	Ingénieure	IFPEN	Examinatrice
Marias, Frederic	Professeur	Université de Pau	Examineur
Salvador, Arnaud	Professeur	Université Lyon 1	Examineur
Heinisch, Sabine	Ingénieure de recherche	Université Lyon 1	Directrice de thèse
Charon, Nadège	Ingénieure	IFPEN	Invitée
Albrieux, Florian	Ingénieur	IFPEN	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Sommaire Générale

Liste des abréviations	7
Introduction Générale	8
Références	11
Chapitre 1 : Etat de l'art	13
Sommaire du chapitre	14
Liste des figures et tableaux	15
Introduction	17
Les huiles de pyrolyse rapide issues de biomasse lignocellulosique	18
La chromatographie Supercritique (SFC)	34
Couplage SFC/MS	44
Retraitement des données HRMS et MS/MS	51
Conclusions générales	57
Références	58
Annexe 1: Principe des différents organes d'un spectromètre de masse	65
Annexe 2 : Composés détectés par GC et GCxGC[43]	73
Objectifs de la thèse et Méthodologie	81
Objectifs de la thèse	82
Chapitre 2 : Partie expérimentale, « matériels et méthodes »	85
Sommaire du chapitre	86
Liste des figures et tableaux	87
Introduction	89
Appareillage	90
Produits et échantillons	104
Logiciel et retraitement des données	106
Conclusion	112
Références	113
Annexe 1: Molécules modèles	114
Chapitre 3 : Développement de la méthode SFC-UV	121
Sommaire du chapitre	122
Liste des figures et tableaux	123
Introduction	124
Conclusion	144
Références	146

Chapitre 4 : Couplage SFC-UV/MS	149
Sommaire du chapitre	150
Liste des figures et tableaux	151
Introduction	153
Partie A : Couplage avec un analyseur simple quadripôle	154
Partie B : Couplage avec un spectromètre de masse IT-ToF/MS	167
Conclusion	191
Références	193
Chapitre 5 : Positionnement de la SFC/IT-ToF pour la caractérisation des bio-huiles	195
Sommaire du chapitre	196
Liste des figures et tableaux	197
Introduction	198
Comparaison GCxGC/ToF vs SFC/IT-ToF	199
Comparaison FT-ICR/MS vs SFC/IT-ToF	205
Comparaison GCxGC/ToF vs SFC/IT-ToF vs FT-ICR/MS	215
Conclusions	217
Références	218
Annexe 1	219
Conclusions générales et perspectives	225
Conclusions Générales et Perspectives	226

Liste des abréviations

ABPR : Active Back Pressure Regulator
APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI : Atmospheric Pressure PhotoIonization
CO₂ : Carbon Dioxide
ESI : ElectroSpray Ionization
ELSD : Evaporative Light Scattering Detection (DEDL)
FID : Flam Ionization Detector
FT-ICR/MS : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
GC : Gas Chromatography
GC×GC : Comprehensive two dimensional Gas Chromatography
HILIC : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
ISM : Isocratic Solvent Manager
LC : Liquid Chromatography
LC×LC : Comprehensive two dimensional Liquid Chromatography
MS : Mass Spectrometry
NARP : Non Aqueous Reverse Phase
NCD : Nitrogen Chemiluminescence Detector
NPLC : Normal Phase Liquid Chromatography
ODS : Octa Decyl Silane
PDA : Photo Diode Array
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPLC : Reverse Phase Liquid Chromatography
SCD : Sulfur Chemiluminescence Detector
SFC : Supercritical Fluid Chromatography
THF : TetraHydroFurane
ToF : Time of Flight
UHPLC : Ultra High Pressure Liquid Chromatography
UV : UltraViolet

Introduction Générale

De nos jours, il est de plus en plus courant de faire face à des échantillons de plus en plus complexes. Pour obtenir un maximum d'informations sur ce type de matrice, il est nécessaire de mettre au point des outils et des méthodologies adaptées à ce caractère complexe. Ces échantillons complexes sont présents dans beaucoup de domaines d'application et représentent une problématique courante. Au travers de cette thèse, un exemple de matrice complexe précis a été choisi et une méthodologie qui pourrait s'appliquer à d'autres applications par la suite a été développée.

Dans cette optique, le domaine de l'énergie semble propice pour trouver un exemple d'application. En effet, les réserves actuelles de pétrole de la planète sont estimées à 900 - 1200 giga barils (soit 125 - 165 gigatonnes), ce qui correspond à environ 40-45 ans de consommation au rythme actuel. Cependant, ces réserves devraient être consommées plus rapidement du fait de la hausse de la demande au niveau mondial. Cette demande en pétrole sera reliée au secteur des transports qui sera responsable de deux tiers jusqu'à presque trois quarts de l'augmentation d'après les estimations [1]. Afin de satisfaire cette forte demande de mobilité, un « bouquet » énergétique devra être mis en place dans les décennies à venir, de manière à diversifier les sources d'énergie en intégrant davantage d'énergies non carbonées telles que les énergies renouvelables.

Les biocarburants répondent à cette demande et apparaissent comme l'une des solutions. Ils sont fabriqués à partir de matières premières végétales et permettent donc de diminuer la dépendance actuelle au pétrole. Depuis 2010, les pouvoirs publics français taxent les distributeurs de carburants qui n'incorporent pas au moins 5.75% de biocarburants (sur une base énergétique) dans leurs produits mis en vente[2]. Les biocarburants dits de première génération ou G1 sont soit des EMHV (Esters Méthyliques d'Huiles Végétales) obtenus à partir de plantes oléagineuses et incorporés au gazole, soit de l'éthanol ou de l'ETBE (EthylTerButylEther) obtenus à partir de plantes sucrières telles que la betterave ou la canne à sucre et incorporés dans les essences. L'inconvénient majeur de l'utilisation de ces ressources pour la production de biocarburants est la concurrence directe que cela entraîne avec le secteur alimentaire qui lui aussi croît rapidement avec l'augmentation de la population mondiale. Le secteur alimentaire étant privilégié, les surfaces agricoles employées pour la production de carburants G1 se trouvent et se trouveront de plus en plus en concurrence avec ce secteur. En Europe et aux USA, il faudrait utiliser 20 - 25% des terres arables pour substituer 10 % des consommations d'essence et de gazole par des biocarburants de 1^{ère} génération. Dans le modèle européen, on a concurrence des terres arables entre l'alimentaire et la production de biocarburants à partir de 7 % d'incorporation de biocarburants G1[2].

Une seconde génération de biocarburants (G2) est donc en cours de développement : il s'agit des biocarburants issus de la biomasse lignocellulosique. Moyennant des études d'impacts environnementaux liés aux changements d'usage de sols, cette ressource renouvelable présente l'avantage de ne pas être en concurrence directe avec les débouchés alimentaires, et sa disponibilité est grande : elle représentait pratiquement le double de la consommation mondiale d'énergie primaire en 2004[2,3]. La transformation de cette biomasse lignocellulosique utilise par exemple des procédés de conversion thermochimique dont l'objectif principal est de produire des biokérosènes et biogazoles de très haute qualité obtenus par la voie indirecte BtL (Biomass to Liquid), ou encore des procédés

biochimiques principalement pour la production d'éthanol. Les produits obtenus par les différents procédés peuvent s'avérer chimiquement complexes et une caractérisation est nécessaire pour pouvoir améliorer ces procédés et le traitement des effluents.

Ainsi, les produits issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique doivent certainement être considérés comme des alternatives pertinentes face aux problématiques énergétiques actuelles. Cependant, la complexité des mélanges obtenus, tant du point de vue des fonctions chimiques présentes que de leur répartition par poids moléculaires, complexifie davantage leur caractérisation. C'est pourquoi la mise en place d'outils analytiques très performants est à envisager et notamment la mise en place de méthodes séparatives en amont de systèmes de détection pertinents. Cependant, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse va se trouver rapidement limitée du fait de certaines caractéristiques de ces matrices oxygénées (caractère thermosensible de certains composés, larges gammes de polarité et de poids moléculaire). Pour pallier à ces limites, l'utilisation de fluide en phase supercritique comme phase mobile pour la chromatographie pourrait être une alternative pour l'analyse et la caractérisation des bio-huiles (issu de la conversion de la biomasse). Elle pourrait en effet permettre l'analyse de ces molécules sans risquer de les dégrader. De plus, cette technique connaît un renouveau depuis l'apparition des appareils de dernière génération dans les années 2000 améliorant la répétabilité et la robustesse. Cette technique d'analyse connaît un vrai intérêt pour des domaines comme la pharmaceutique, le profilage d'impuretés mais à notre connaissance rien ne concernant les produits ex-biomasse générés par voie thermochimique.

Afin de fixer clairement les objectifs de cette thèse, un état de l'art, basé sur l'exemple d'application des bio-huiles, est proposé. Les huiles de pyrolyse ont déjà fait l'objet de caractérisations et les principales propriétés clés de ces matrices constituent notre point de départ (Chapitre 1). Les techniques analytiques déjà employées sont listées avec leurs apports mais également leurs limitations. Par la suite, il est nécessaire de comprendre pourquoi la chromatographie en phase supercritique (SFC) peut constituer une alternative pour obtenir plus d'informations sur ces échantillons. Enfin cette technique séparative doit être associée à un détecteur informatif. La dernière partie de l'état de l'art traite donc au couplage entre chromatographie SFC et spectrométrie de masse (MS) ainsi que la méthodologie à employer pour exploiter au mieux les données qui en résultent.

Les équipements et méthodes mis en œuvre pendant ces travaux sont décrits dans le Chapitre 2.

La première étape de cette thèse a consisté à développer la méthode SFC la plus adaptée à la caractérisation d'une huile de pyrolyse rapide en employant un détecteur UV (UltraViolet) (Chapitre 3). Une approche prenant en compte la complexité des huiles a été mise en place à l'aide de critères judicieusement choisis dans le but d'optimiser la nature de la phase stationnaire, la phase mobile, la température, la pression régulée (BPR), les caractéristiques du gradient d'élution. Autant de paramètres qui ont un impact sur la rétention des différents composés.

Dans un second temps, le couplage spécifique de la SFC avec la spectrométrie de masse a été développé (Chapitre 4). Les caractéristiques particulières de ce couplage non commercial sont précisées ainsi que l'optimisation des paramètres clés afin de maximiser le signal obtenu. Deux spectromètres de masses de performances différentes (simple quadripôle et temps de vol équipé d'un piège à ion) ont été utilisés dans le cadre de ces travaux, permettant de progresser dans notre connaissance du couplage SFC/MS selon une complexité croissante des échantillons étudiés. La

valorisation et le retraitement des données acquises via ce couplage sont également décrit. La méthodologie mise en place a été appliquée à la fois à des molécules modèles pour vérifier sa validité mais également à une huile de pyrolyse rapide pour démontrer son potentiel.

Enfin, l'exploitation des données HRMS et MS/MS reste un axe peu mature dans notre domaine d'application car peu d'outils de retraitement sont disponibles et adaptés à nos produits (comme des bases de données pertinentes). Pour mesurer l'intérêt de ce couplage SFC-UV/MS, le choix a été fait de comparer les résultats obtenus avec ceux d'autres techniques utilisées plus classiquement pour la caractérisation d'huiles de pyrolyse rapide comme la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle GCxGC/MS et la spectrométrie de masse à résonance ionique cyclotronique à transformée de Fourier FT-ICR/MS (spectrométrie de masse très haute résolution).

Cette étude a alors permis de conclure quant à l'intérêt de ce couplage SFC-UV/MS pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide à travers les points forts mis en avant au cours de cette thèse et également de développer une méthodologie SFC-UV/MS adaptable à différents échantillons complexes.

Références

- [1] CPDP, Pétrole 2013, 2014.
- [2] D. Ballerini, Les biocarburants: État des lieux, perspectives et enjeux du développement, 2006.
- [3] A. Oasmaa, D. Meier, Norms and standards for fast pyrolysis liquids, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 73 (2) (2005) 323–334.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Sommaire du chapitre

Liste des figures et tableaux	15
Introduction	17
Les huiles de pyrolyse rapide issues de biomasse lignocellulosique.....	18
1 La biomasse lignocellulosique	18
2 La conversion de la biomasse par pyrolyse rapide	20
3 L'analyse des huiles de pyrolyse rapide.....	21
3.1 Spectroscopie RMN	22
3.2 Spectrométrie de masse haute résolution	24
3.3 Chromatographie en phase gazeuse	28
3.4 Chromatographie en phase liquide	30
4 Conclusions	33
La chromatographie Supercritique (SFC)	34
1 Les phases mobiles utilisées en SFC	35
2 Les phases stationnaires utilisées en SFC	36
3 L'optimisation de méthode en SFC.....	39
4 Les systèmes de détections envisageables.....	40
4.1 La détection UV	41
4.2 La détection par spectrométrie de masse.....	42
5 Conclusion	43
Couplage SFC/MS	44
1 Spécificité du couplage SFC/MS	44
2 Application de la SFC/MS (ESI et APCI).....	47
2.1 Couplages SFC/MS utilisant l'ESI :	47
2.2 Couplage SFC/MS utilisant l'APCI :	49
3 Conclusions	50
Retraitement des données HRMS et MS/MS	51
1 Exploitation des données HRMS	51
2 Méthodologie de retraitement pour les données MS/MS	52
3 Conclusions	55
Conclusions générales.....	57
Références.....	58
Annexe 1: Principe des différents organes d'un spectromètre de masse	65
Annexe 2 : Composés détectés par GC et GCxGC [43].....	73

Liste des figures et tableaux

Figure I-1 : Structure générale de la cellulose[5]	18
Figure I-2 : Fragments de structures des deux hémicelluloses majeures du bois tendre[6].	19
Figure I-3 : Structures des trois alcools monomériques de la lignine[7].....	19
Figure I-4 : Liaisons rencontrées entre la lignine et les hémicelluloses [6]	20
Figure I-5 : Spectre RMN ¹³ C de la lignine broyée (haut) et de la lignine pyrolytique (bas) [11].	23
Figure I-6 : Superposition de cartographies RMN 2D d'une bio-huile avant (bleu) et après (rouge) hydrotraitement. La région aliphatique est représentée en (a) et la région aromatique en (b).....	24
Figure I-7 : Diagramme van Krevelen d'une huile de pyrolyse rapide en FT-ICR/MS avec différents modes d'ionisation : ESI, APPI et LDI en (+) et (-).....	25
Figure I-8 : Distribution relative en oxygène d'une huile de pyrolyse rapide en FT-ICR/MS (ESI négatif et APPI positif) [21]	26
Figure I-9 : Kendrick plot des différentes familles oxygénées d'une huile de pyrolyse rapide en FT-ICR/MS (ESI négatif) [21]	27
Figure I-10 : Diagrammes de van Krevelen de la phase aqueuse (à droite) et de la phase organique (à gauche) d'une huile de pyrolyse avec les principales régions de chacune des familles chimiques principales [22]	26
Figure I-11 : Analyse GCxGC/MS d'une huile de pyrolyse rapide BPX-50 (60 m x 0.25 mm ID 0.25µm) en première dimension et Rtx-Pona (1 m x 0.25 mm ID 0.5µm) en seconde dimension [35].	29
Figure I-12 : Résultats d'une analyse nanoLC/EI-MS d'une fraction aqueuse d'une huile de pyrolyse. Colonne : C ₁₈ ; phase mobile : eau/ACN [48].	31
Figure I-13 : Chromatogramme RPLCxRPLC-UV d'une phase aqueuse d'une huile de pyrolyse rapide [49]....	32
Figure I-14 : Schéma d'un appareil SFC « type LC » [53]	34
Figure I-15 : Diagramme de phases pour CO ₂ pur (en bleu) et avec ajout de MeOH (en vert) [56]	35
Figure I-16 : Proportion d'articles de recherche citant l'utilisation d'un co-solvant (réalisé en 2014) [60].	36
Figure I-17 : Classification de phases stationnaires par la méthode LSER. (e : interaction n et π ; s : dipôle-dipôle ; a : acide ; b : basique ; v : effets de cavité) [71].....	38
Figure I-18 : Effet du volume d'injection (A) avec 1 (noir), 2 (bleu), 5 (vert) et 10 (rouge) µL injecté de cocaïne, ibuprofène et cortisone à 100 g/mL chacun dans MTBE et du solvant de dilution (B) lors de l'injection de 10 µL de cocaïne à 100 g/mL dans 4 solvants différents [73]	39
Figure I-19 : Effets de l'emplacement du détecteur pour un couplage SFC-DEDL. Colonne Synergie Polar RP, débit : 3ml/min, BPR : 150 bars, T° : 30°C, CO ₂ /co-solvant : 95/5, Mélange de plastifiants [83]	41
Figure I-20 : Chromatogramme UV (220 nm) d'un mélange de 4 composés antimycosiques (miconazole, éconazole, sulconazole et cétoconazoles). Colonne Chiralpak AD (25 x 0.46 cm, 5 µm), T° : 35°C, P : 18 MPa, débit : 2.5 ml/min, Co-solvant : EtOH [88].....	42
Figure I-21 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.	43
Figure I-22 : Schéma d'un appareillage SFC/MS [88].....	45
Figure I-23 : Schéma des configurations possibles pour le couplage SFC / Masse [96].....	45

Figure I-24 : TIC chromatogramme pour un mélange de 6 composés pharmaceutiques avec les deux configurations de couplage [96].	46
Figure I-25 : Configuration sans split pour l'interface entre SFC et MS [100].	46
Figure I-26 : Corrélation entre temps de rétention en UHPLC/MS et UHPSFC/MS [105]	48
Figure I-27 : Mesure des effets de matrice en fonction de la technique analytique employée (W : 0%<effets<20%, I : 20%<effets<100%, S :effets<100%) [108].	49
Figure I-28 : Evolution du nombre de formules brutes possibles en fonction de l'erreur en masse.	51
Figure I-29 : Comparaison entre fragmentation par CID et par EI, LD/LI	53
Figure I-30 : Zone de masses moléculaires et de polarités optimales pour l'utilisation de chacune des trois sources à pression atmosphérique [116].	65
Figure I-31 : Schéma de principe d'une source d'ionisation ESI [117]	66
Figure I-32 : Schéma de principe d'une source d'ionisation APCI [118]	67
Figure I-33 : Principe d'une cellule ICR.	69
Figure I-34 : Schéma d'un analyseur Orbitrap.	70
Tableau I-1 : Propriétés physico-chimiques des huiles de pyrolyse rapide associées à la méthode de mesure correspondante	22
Tableau I-2 : Attribution des familles chimiques en fonction du nombre d'atomes d'oxygène et du DBE	28
Tableau I-3 : Possibilités en LC et alternative en SFC [56]	37
Tableau I-4 : Liste des logiciels de comparaison en HRMS	53
Tableau I-5 : Liste des principales bases de données disponibles et leurs caractéristiques.	54
Tableau I-6 : Performances des principaux analyseurs en MS [120]	68

Introduction

Pour lutter contre le changement climatique et renforcer l'indépendance énergétique de notre pays, de nombreuses solutions sont à envisager pour construire un bouquet énergétique pour le futur, basé en partie sur des ressources alternatives au pétrole. La transformation de la biomasse lignocellulosique en carburants de seconde génération (2G) et en molécules plateformes biosourcées fait actuellement l'objet d'un grand nombre d'études. Parmi les voies envisagées de liquéfaction directe de la biomasse, la pyrolyse rapide conduit à l'obtention de liquéfiats riches en oxygène. Ces matrices de composition chimique très complexe représentent un cas d'étude idéal pour la mise au point de nouvelles techniques analytiques, en rupture avec les approches classiques mises en œuvre pour l'analyse de composés oxygénés (par chromatographie en phase gazeuse par exemple).

Ce chapitre a pour but de mettre en lumière dans un premier temps les informations issues de la littérature portant sur la qualité des huiles de pyrolyse rapide et les techniques analytiques classiquement utilisées pour leur caractérisation.

L'objectif de cette thèse étant de développer une méthodologie employant la chromatographie en phase supercritique (SFC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) pour caractériser des échantillons complexes comme les huiles de pyrolyse rapide, nous présenterons dans un second temps le principe et les principales caractéristiques de cette technique. Quelques exemples de la littérature seront discutés pour illustrer les problématiques rencontrées dans la mise en œuvre du couplage SFC/MS.

Enfin, le dernier volet de ce chapitre traitera des stratégies de traitement des données issues des acquisitions en spectrométrie de masse haute résolution avec ou sans fragmentation.

Nous concluons ce chapitre en faisant le bilan des verrous liés à l'analyse des huiles de pyrolyse rapide de biomasse et en exposant les points clefs qui devront faire l'objet de travaux de recherche pour permettre au couplage SFC/MS de répondre à ces différents défis analytiques.

Les huiles de pyrolyse rapide issues de biomasse lignocellulosique

1 La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est une ressource riche en matière carbonée, renouvelable, et pouvant servir de matière première pour la production de biocarburants et de molécules plateformes biosourcées. Cette biomasse peut avoir plusieurs origines [1] : il peut s'agir de résidus agricoles, c'est-à-dire de parties des plantes non comestibles par l'homme telles que les pailles de céréales, mais également de résidus forestiers (branches ou rameaux provenant du façonnage des arbres abattus, feuilles ou troncs abîmés) ou encore de sous-produits de la transformation du bois ou de bois de déconstruction (déchets). Des cultures dédiées de plantes ligneuses ou herbacées sont aussi utilisées comme source de biomasse lignocellulosique : cela peut être des cultures annuelles (comme pour le triticale), ou pérennes récoltées annuellement (par exemple le miscanthus) ou pluri-annuellement (peupliers, eucalyptus ou saules). La biomasse lignocellulosique est composée majoritairement de trois polymères naturels (cellulose, hémicelluloses et lignine) auxquels peuvent s'ajouter des extractibles (acides résiniques, esters d'acides gras, stérols, terpènes, composés hydrocarbonés) et des composés inorganiques (cendres) [1].

La composition de la biomasse en ces différents constituants dépend de la nature du végétal considéré, ainsi que de la structure de celui-ci : par exemple, les aiguilles de pin contiennent plus d'extractibles et d'hémicelluloses, mais moins de cellulose que son écorce. Cette tendance est identique chez l'épicéa, cependant il contient d'une manière générale, moins d'extractibles que le pin[1].

La cellulose est un polymère linéaire du D-glucose, avec un nombre de monomères pouvant varier de 100 à plus de 14 000[2]. Elle est composée d'unités cellobiose, correspondant à deux motifs de glucose reliés en position β -(1-4). Sa structure est représentée sur la Figure I-1.

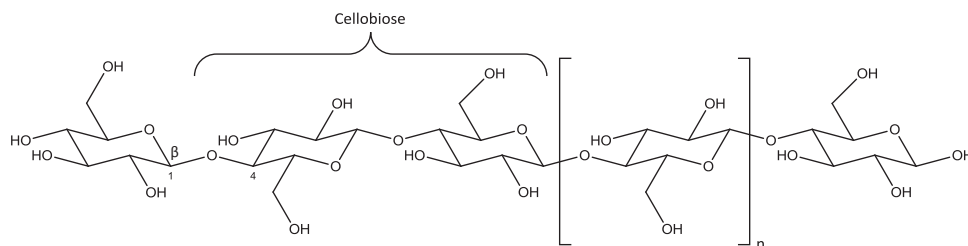


Figure I-1 : Structure générale de la cellulose[5]

Les hémicelluloses sont des polymères amorphes de sucres, constituées de différents types de monomères : il peut s'agir de sucres à 5 atomes de carbone (xylose, arabinose) ou de sucres à 6 atomes de carbone (glucose, mannose, galactose, fructose). Le nombre de monomères de ces polysaccharides est généralement compris entre 100 et 300, ce qui en fait des structures plus légères que la cellulose. Elles sont de plusieurs types, selon les sucres qui la composent : xylanes, xyloglucanes, galactoglucomannanes, arabinogluronoxylane, etc... De ce fait, les teneurs en sucres composant les

hémicelluloses sont différentes d'un végétal à l'autre selon les types d'hémicelluloses en présence au sein du végétal[3]. Des fragments de structures d'hémicelluloses sont présentés sur la Figure I-2.

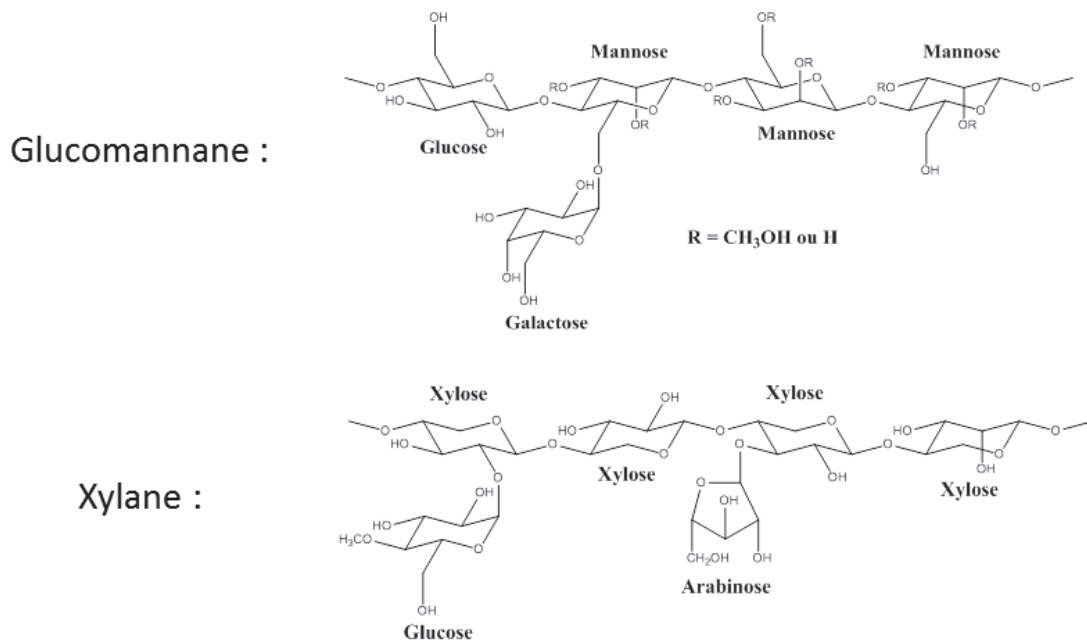


Figure I-2 : Fragments de structures des deux hémicelluloses majeures du bois tendre[3].

La lignine est un polymère amorphe de masse moléculaire bien plus élevée que la cellulose et formée par condensation de trois monomères : alcools sinapyl, coniferyl et coumaryl (Figure I-3).

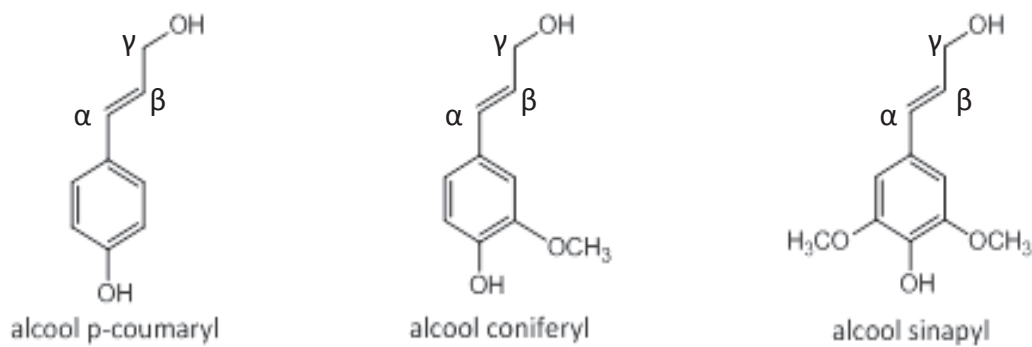


Figure I-3 : Structures des trois alcools monomériques de la lignine[4]

Sa composition en chacun des trois phénols va varier selon le végétal considéré. Ces monomères sont reliés par diverses formes de liaisons: liaisons alkyl-alkyl, alkyl-aryl, aryl-aryl ou éther [4]. La lignine est aussi liée aux hémicelluloses par des liaisons covalentes[3] qui peuvent être de nature variée comme le montre la Figure I-4.

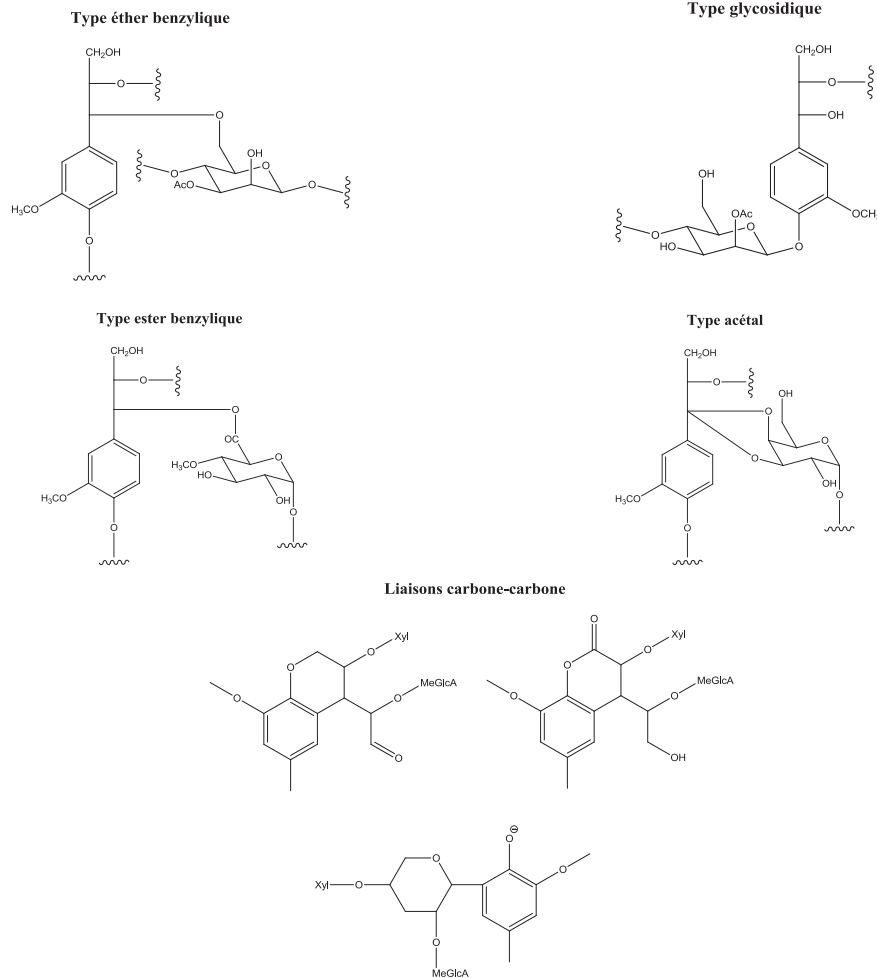


Figure I-4 : Liaisons rencontrées entre la lignine et les hémicelluloses [3]

La composition de la biomasse lignocellulosique est donc complexe, mais elle représente une ressource intéressante, qui constitue une matière première de qualité pour certains procédés de conversion.

2 La conversion de la biomasse par pyrolyse rapide

Les procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique sont nombreux. Il peut s'agir de conversion thermique, biologique ou mécanique [1] et les produits obtenus sont utilisés pour la production d'énergie ou de matières premières à plus haute valeur ajoutée, généralement en substitution à des produits issus de ressources fossiles. La pyrolyse rapide est une voie de liquéfaction directe de la biomasse pour produire des bases pour carburants et/ou pour la chimie, pouvant ainsi devenir dans le futur une des alternatives possibles au pétrole. La pyrolyse rapide est une décomposition thermique de la biomasse lignocellulosique qui se déroule en l'absence d'oxygène et qui conduit à un mélange complexe contenant une phase liquide, une phase solide et une phase gazeuse. Lors d'une pyrolyse rapide, les températures peuvent atteindre jusqu'à 650 °C et les temps de séjour sont de l'ordre de la seconde. Ce procédé conduit à une déstructuration de la biomasse lignocellulosique solide, avec un rendement massique en huile de 55 à 75 % m/m, et de relativement faibles proportions de solides (10 – 25 % m/m) et de gaz (10 – 20 % m/m).

L'huile de pyrolyse rapide obtenue, ou bio-huile, est un mélange complexe marron foncé, contenant de nombreuses familles de composés oxygénés ainsi qu'une quantité importante d'eau (20 – 25 % m/m). Cette haute teneur en oxygène, comparable à celle de la biomasse de départ, a pour conséquence un pouvoir calorifique faible de l'huile de pyrolyse. En effet, la haute valeur énergétique des produits pétroliers est reliée à leur structure hydrocarbonée. Plus le ratio H/C est élevé et plus le ratio O/C est faible, plus le produit a une valeur énergétique élevée. Ainsi une huile de pyrolyse, qui se caractérise par un ratio H/C plus faible que celui des produits pétroliers et surtout un ratio O/C très élevé, possède une valeur énergétique qui représente environ 40 % de la valeur énergétique d'un gazole. De plus, les caractéristiques des huiles de pyrolyse font qu'elles ne sont pas utilisables en l'état en tant que biocarburants [1]. Beaucoup moins stable thermiquement qu'un produit d'origine fossile, la bio-huile n'est pas miscible avec des matrices hydrocarbures, du fait de sa grande teneur en oxygène qui lui confère un caractère polaire marqué et de sa teneur en eau élevée (20 - 35 % m/m). En revanche, elle est miscible dans des solvants oxygénés tels que l'acétone, le méthanol, l'éthanol ou le tétrahydrofurane [2]. Corrosive, l'huile de pyrolyse contient aussi des impuretés telles que du chlore ou des métaux alcalins qui peuvent être des poisons de catalyseurs. La présence d'azote et de soufre est significative mais en moindre quantité que dans la majorité des pétroles bruts [3].

La masse volumique d'une bio-huile (toujours proche de 1.2 kg/L à 15°C) est également largement supérieure à celle des coupes pétrolières qui varie autour de 0.75 à 0.85 kg/L. La viscosité est très variable (entre 25 cP et 1000 cP à température ambiante) et reste du même ordre de grandeur que celle des bruts pétroliers classiques, moyens à lourds [2]. La distribution des masses moléculaires de ces constituants est répartie sur une gamme allant de quelques dizaines de Daltons jusqu'à 5000, voire même 10 000 Daltons.

Toutes ces propriétés physico-chimiques ainsi que le caractère fortement oxygéné de ces huiles de pyrolyse auront des conséquences importantes sur l'utilisation de ces produits.

3 L'analyse des huiles de pyrolyse rapide

Depuis les années 1980, des études sont menées afin de caractériser ces matrices et ainsi d'améliorer les différents procédés de production et de valorisation. Certaines méthodes ont été normalisées, parfois suite à des essais circulaires [4] organisés par exemple par l'International Energy Agency mais celles-ci restent encore très peu nombreuses et limitées à des propriétés « globales » telles que la teneur en solides (ASTM D7579)[5]. Le tableau ci-dessous regroupe les différentes propriétés physico-chimiques et la méthode analytique usuellement employée pour les mesurer.

Tableau I-1 : Propriétés physico-chimiques des huiles de pyrolyse rapide associées à la méthode de mesure correspondante

Property Bio-Oil	Analytical Method	Range of Values
Water (wt%)	Karl-Fisher (ASTM D 1744)	15–35
Carbon (wt%)	Elemental analysis (ASTM D 5291)	50–64
Hydrogen (wt%)	Elemental analysis (ASTM D 5291)	5–7
Oxygen (wt%)	Elemental analysis	35–40
Nitrogen (wt%)	Elemental analysis (ASTM D 5291)	0.05–0.4
Sulfur (wt%)	XRF (ASTM D 4294)	0–0.05
Heating value (MJ/kg)	Calorimetry (ASTM D 4809)	16.5–19
Viscosity (cP)	Viscometer (ASTM D 445)	35–1000 (at 40°C)
Flash point (°C)	Flash point tester (ASTM D 93)	40–110
Pour point (°C)	CPP analyzer (ASTM D 97)	–27 to –36
Acidity (pH)	—	2–3
Ash (wt%)	DIN EN 7	0.01–0.2
Density (kg/dm ³)	Densimeter (ASTM D 4052)	1.10–1.30 (at 15°C)
Copper corrosion test	ASTM D 130	1A–1B
MW distribution (Da)	GPC	30–2000
Total solids (wt%)	Ethanol insoluble	0.5–5

Une connaissance plus détaillée de la composition chimique des huiles de pyrolyse rapide est rendue envisageable principalement grâce aux techniques analytiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS), la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC). Nous avons fait le choix de faire un focus sur ces techniques dans le cadre de l'état de l'art présenté dans ce chapitre. Cette partie permettra de mettre en lumière les aboutissements de chacune mais également les limites auxquelles se heurtent toujours ces techniques analytiques.

3.1 Spectroscopie RMN

Les spectroscopies RMN ¹H, ¹³C et ³¹P ont été employées dans la littérature pour décrire les groupements fonctionnels présents dans les huiles de pyrolyse rapide. La spectroscopie RMN ¹H peut être employée comme une technique quantitative des hydrogènes contenus dans les fonctions oxygénées et dans les hydrocarbures [6]. La RMN ¹³C a également permis d'obtenir des informations précieuses, notamment sur la composition chimique de la fraction insoluble dans l'eau d'une huile (fraction nommée « lignine pyrolytique ») [7]. A titre d'exemple, une comparaison des spectres RMN ¹³C d'une lignine pyrolytique avec celui d'une lignine broyée (simplement issue de la matière première avant pyrolyse rapide) a été réalisée, mettant en évidence l'impact de la pyrolyse rapide sur la structure de la lignine (Figure I-5). Les signaux attribués aux carbones α , β et γ (cf. Figure I-3) ont largement diminué en intensité indiquant une rupture des polymères suite à l'étape de pyrolyse rapide. D'autres signaux démontrent également que les structures primaires de la lignine ne sont que très peu affectées par le procédé de pyrolyse dans les conditions de l'étude. Enfin le fond peu résolu présent dans la zone 100-150 ppm peut être révélateur de la création de double liaison C=C durant le procédé de dépolymérisation.

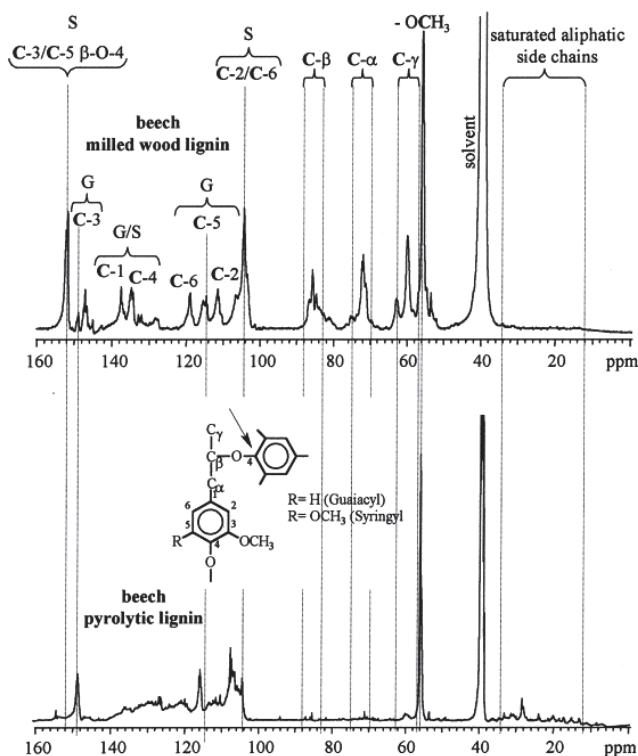


Figure I-5 : Spectre RMN ^{13}C de la lignine broyée (haut) et de la lignine pyrolytique (bas) [7].

La RMN ^{31}P donne quant à elle accès à la quantification de trois groupes de fonctions oxygénés : OH aliphatiques, OH phénoliques et OH des acides carboxyliques. Les hydrogènes labiles de certaines fonctions oxygénées sont d'abord fonctionnalisés par réaction avec un agent phosphorant (TMDP : 2-chloro-4, 4,5, 5-tetraméthyl-1, 3,2-dioxaphospholane usuellement) puis analysés par RMN ^{31}P . Tout comme pour les autres techniques RMN, cette approche donne ici accès à une quantification de fonctions chimiques oxygénées. Bien que très intéressante, cette technique présente certains points faibles. En effet, l'étape de dérivation chimique peut être fortement influencée par la structure chimique des composés oxygénés, les effets stériques et/ou les effets induits par la présence de substituants pouvant par exemple impacter le rendement en phosphorylation des molécules. Il est également possible qu'un signal soit détecté sous forme de plusieurs pics pour une même molécule (cas du glucose qui est détecté sous forme de cinq signaux ou davantage [8]), ce qui complexifie notablement l'attribution et la quantification des fonctions chimiques.

A ces analyses, s'ajoutent des expériences réalisées en RMN 2D $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$. Cette technique combine la détection des déplacements chimiques de deux éléments différents. Ainsi sur la première dimension des informations provenant des atomes d'hydrogène par exemple seront indiquées alors qu'en seconde dimension, des informations issues de l'analyse des carbones seront représentées. Dans le cas d'une séquence HSQC (heteronuclear single quantum coherence), les signaux de carbones protonés sont associés aux hydrogènes directement liés via des couplages $^1\text{J}_{\text{C,H}}$. Comme sur la Figure I-6, une cartographie des différentes fonctions chimiques présentes dans l'échantillon est alors obtenue. Sudasinghe et al. comparent ainsi l'impact d'un hydrotraitement sur une huile en superposant les deux cartographies. Les effets du traitement apparaissent alors visuellement et l'impact sur certains composés est mis en lumière. La RMN est donc une technique permettant une description structurale des composés isolés. Cependant l'utilisation de matrices trop complexes limite les informations

disponibles et complique l'interprétation des spectres. L'utilisation de prétraitement en amont pourrait être une solution à envisager.

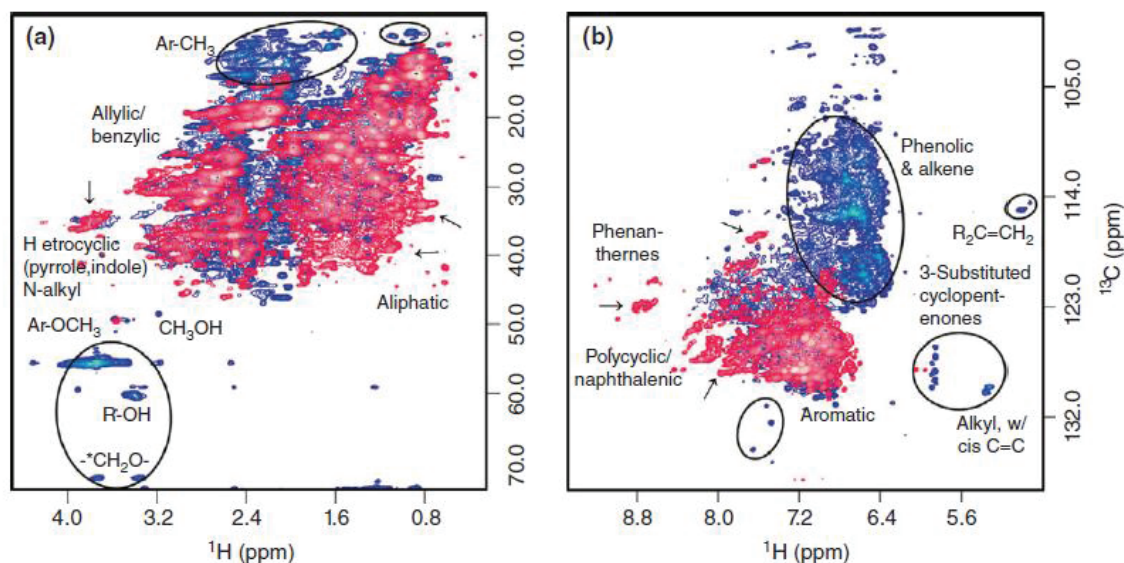


Figure I-6 : Superposition de cartographies RMN 2D d'une bio-huile avant (bleu) et après (rouge) hydrotraitement. La région aliphatique est représentée en (a) et la région aromatique en (b)

3.2 Spectrométrie de masse très haute résolution

La spectrométrie de masse très haute résolution (FT-ICR/MS et Orbitrap) est une technique offrant un fort pouvoir résolutif et une précision en masse permettant l'identification des composés détectés sous forme d'une formule brute de manière univoque. Dépendant de l'appareil et de l'aimant qui le compose, les résolutions des spectromètres FT-ICR/MS se situent entre 100 000 et 1 000 000. Cette haute résolution va permettre de travailler avec une précision en masse de l'ordre du ppm. Un descriptif plus détaillé de la technique par spectrométrie de masse est présenté en Annexe 1.

Les travaux de Hertzog *et al.* [12] proposent une analyse de bio-huile par FT-ICR/MS en évaluant l'impact de la source d'ionisation [ESI, APPI et LDI (laser desorption ionization)]. A l'issue de ces différentes analyses, une liste de formules brutes associées aux produits identifiés dans chacun des modes est obtenue. Ces données sont présentées sous forme de « diagramme de van Krevelen » représentant le ratio H/C en fonction du ratio O/C pour les molécules détectées dans chacun des modes d'ionisation. De cette étude, il ressort que les différents modes d'ionisation vont être complémentaires. Sur la Figure I-7, les différentes cartographies van Krevelen obtenues sont représentées pour chacun des modes d'ionisation testés. Pour le mode d'ionisation positif, sur les 2500 molécules détectées par les trois sources d'ionisation, seulement 65 sont communes aux trois. De même, dans le mode d'ionisation négatif, sur les 2000 molécules détectées seulement 190 sont communes aux trois sources.

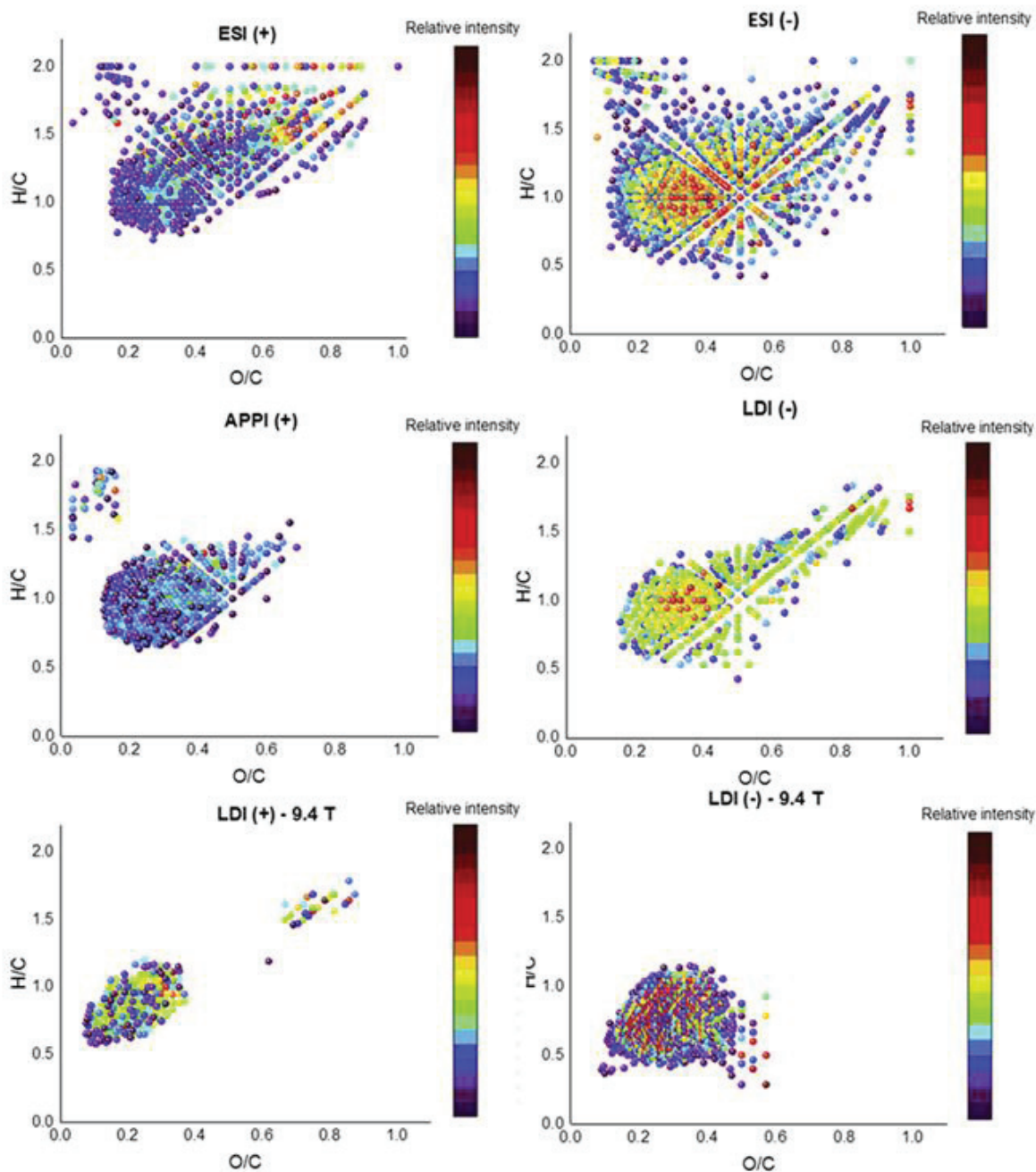


Figure I-7 : Diagramme van Krevelen d'une huile de pyrolyse rapide en FT-ICR/MS avec différents modes d'ionisation : ESI, APPI et LDI en (+) et (-)

Cela met en avant la nécessité de couvrir une large gamme de masse et de polarité afin de caractériser au maximum ces matrices complexes. L'ESI servant à caractériser les molécules de plus hauts poids moléculaires et plus oxygénées (H/C et O/C grands) et l'APPI plutôt adapté aux molécules de plus petites tailles et avec peu d'oxygène (H/C et O/C plus petits). Malgré cela l'ESI regroupe quasiment tous les travaux employant la FT-ICR/MS pour la caractérisation d'huiles de pyrolyse [13–19]. Cette source d'ionisation permet la détection d'un grand nombre de composés puisque certains travaux rapportent plus de 1200 composés avec un seul mode d'ionisation [12]. L'utilisation des diagrammes de van Krevelen ($H/C=f(O/C)$), va également regrouper par familles chimiques les

composés des huiles de pyrolyse comme sur la Figure I-78. Cette représentation met en exergue dans cet exemple la présence des sucres dans la phase aqueuse ainsi que des molécules phénoliques les plus polaires.

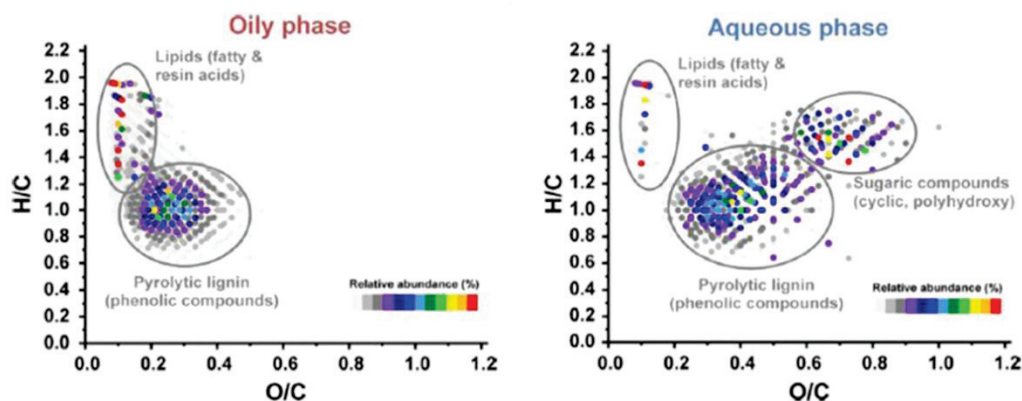


Figure I-8 : Diagrammes de van Krevelen de la phase aqueuse (à droite) et de la phase organique (à gauche) d'une huile de pyrolyse avec les principales régions de chacune des familles chimiques principales [20]

Cependant, aucune donnée structurale n'est directement accessible via cette technique (même si certains appareils permettent de faire de la MS/MS) et les résultats obtenus servent essentiellement de cartographie ou d'empreinte d'un échantillon en fonction de la représentation que l'on utilise. Les plus répandues à travers la littérature sont les distributions en intensité relative en fonction du nombre d'atomes d'oxygène (Figure I-9) et les représentations de Kendrick reliant le nombre d'insaturations (Double Bond Equivalent) et le nombre d'atomes de carbone des différents composés détectés (Figure I-10).

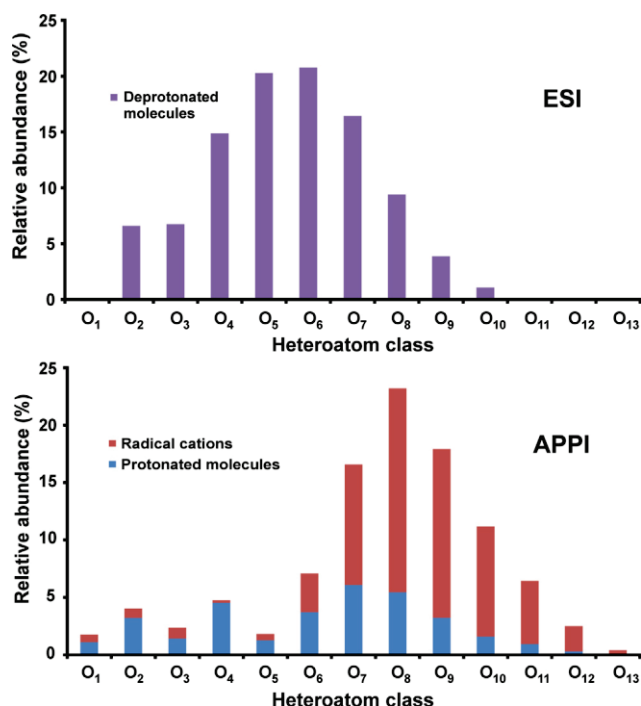


Figure I-9 : Distribution relative en oxygène d'une huile de pyrolyse rapide en FT-ICR/MS (ESI négatif et APPI positif) [10]

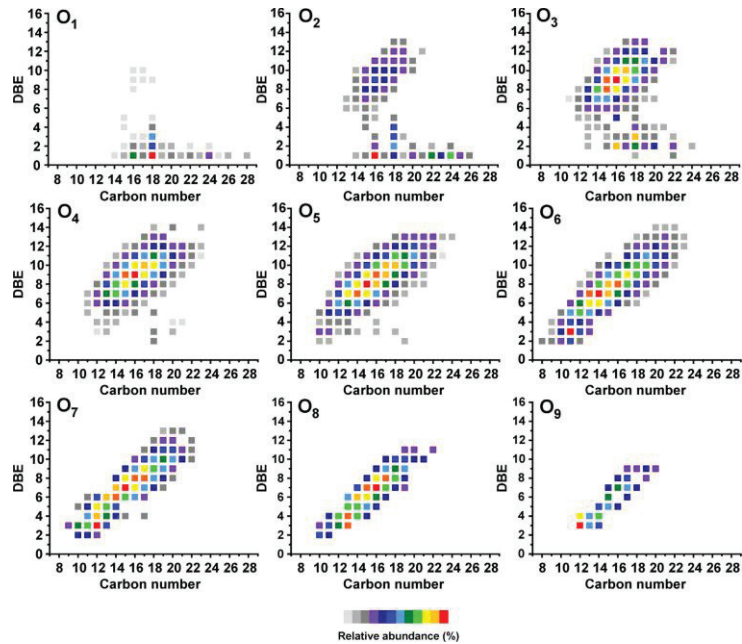


Figure I-10 : Kendrick plot des différentes familles oxygénées d'une huile de pyrolyse rapide en FT-ICR/MS (ESI négatif) [10]

Les familles d'oxygénés possèdent entre 2 et 9 atomes d'oxygène avec une majorité aux alentours de 6 atomes (dépendant de la source de biomasse convertie). Pour le nombre d'atomes de carbone, les distributions vont généralement de 5 à 35 atomes et des espèces azotées entre 1 et 3 atomes d'azote maximum sont aussi détectés systématiquement.

Comme illustré par les exemples, la FT-ICR/MS donne donc une empreinte de l'échantillon. Les différents utilisateurs vont donc s'en servir pour comparer les points communs et les différences entre plusieurs échantillons. Ainsi, il est possible d'illustrer les différences avant et après certains traitements de l'échantillon : hydrotraitement [21], hydrogénation [22], alkynolise [13]. Les auteurs observent dans ces cas l'impact du traitement sur telle ou telle zone des Kendrick plot. La même démarche a aussi souvent été mise en place afin de déterminer les différences issues de l'origine de la biomasse employée pour créer les bio-huiles. Jarvis et al. [23,24], Kekalainen et al.[25] et Abdelnur et al. [26], utilisent cette démarche pour des sources différentes de biomasse. Cole et al. [27] vont eux comparer des biomasses récoltées à des instants différents dans l'année. Enfin, les composés au sein de ces matrices ne sont pas facilement ionisables de par leur fort taux d'oxygène. Afin de faciliter ce processus au sein des sources d'ionisation, il est possible d'employer des dopants tels que l'ammoniac en négatif et l'acide formique en positif afin d'augmenter les échanges de protons et donc le signal obtenu [11].

Dans l'étude menée conjointement par l'université de Eastern Finland et le centre de recherches VTT, l'attribution de certains couples DBE/nombre d'atomes d'oxygène observés en analyse FT-ICR/MS avec une ionisation ESI(-) a été proposée comme résumé dans le Tableau I-2. Ces attributions peuvent être très spécifiques aux huiles étudiées et aux conditions d'analyse FT-ICR/MS employées et ne sont peut-être pas directement applicables à nos résultats mais elles sont néanmoins intéressantes à considérer pour illustrer la répartition des différents types de composés potentiellement présents dans une huile de pyrolyse rapide.

Tableau I-2 : Attribution des familles chimiques en fonction du nombre d'atomes d'oxygène et du DBE

<i>Nombre d'atomes d'oxygène par formule brute identifiée</i>	<i>Degré d'insaturation DBE</i>	<i>Attribution possible</i>
O ₂	DBE compris entre 1 et 4 DBE compris entre 8 et 10	Acides gras Composés acides aromatiques
O ₃	DBE compris entre 4 et 13	Acides gras hydroxy / composés phénoliques
O ₄	DBE supérieur ou égal à 2 DBE compris entre 6 et 13	Acides gras époxy et/ou diacides gras Extractibles phénoliques ou dilignols
O ₆ -O ₁₀	DBE inférieur à 4	Composés non aromatiques de faibles masses moléculaires (carbohydrates anhydres et dérivés)

Même si cette technique à elle seule ne permet pas l'identification précise des molécules composant les bio-huiles, les informations obtenues peuvent par la suite être couplées afin de parvenir à la caractérisation complète. Tessarolo et al. [6,15] ont ainsi pu mettre en relation les informations obtenues à la fois par RMN 2D, GCxGC-ToF/MS et FT-ICR/MS afin de d'attribuer une structure aux composés détectés en FT-ICR/MS.

3.3 Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle (GC) et bidimensionnelle (GCxGC) sont des techniques largement utilisées dans le domaine pétrolier pour l'analyse et la spéciation des composés volatiles ou semi-volatiles. La Figure I-11 montre un exemple de chromatogramme obtenu et du regroupement en familles chimiques oxygénées dans une huile de pyrolyse rapide de biomasse. Dans ce cas-là les familles chimiques identifiées sont mono ou bi-fonctionnelles. Les auteurs identifient des zones pour les acides, les sucres, les aromatiques, les phénols, les benzenediols et regroupent les aldéhydes, les cétones et les furanes ensemble. Peu d'informations sont données sur les composés polyfonctionnels. De nombreux travaux ont porté sur l'utilisation de ces techniques analytiques couplées avec la spectrométrie de masse pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide [28–34]. Au travers de ces différentes études, l'identification des molécules est réalisée pour la majorité des cas en employant la base de données NIST. A l'aide de cette base de données, il est possible de comparer les spectres de masse acquis le plus souvent à l'aide d'une source d'ionisation électronique (EI). Ce type d'ionisation permet l'obtention de spectre non dépendant de l'appareillage employé et facilite ainsi l'identification. Grâce à cette méthodologie, plusieurs centaines de composés ont pu être référencées d'un point de vue qualitatif par Stas et al. dans le cadre de leur revue sur l'analyse par GC/MS et/ou GCxGC/MS

d'huiles de pyrolyse rapide de biomasse[28], la liste complète de ces 200 molécules se trouve en annexe 2 de ce chapitre. Parmi elles on retrouve, des composés non aromatiques (alcools, acides carboxyliques, cétones, aldéhydes, sucres) et des composés aromatiques (furanes, phénols, acides aromatiques, aldéhydes, méthoxyphénols et dérivés). Si cette approche met en lumière la présence de nombreuses molécules oxygénées, ces dernières partagent toutes la caractéristique de posséder une masse moléculaire inférieure à environ 250 g/mol.

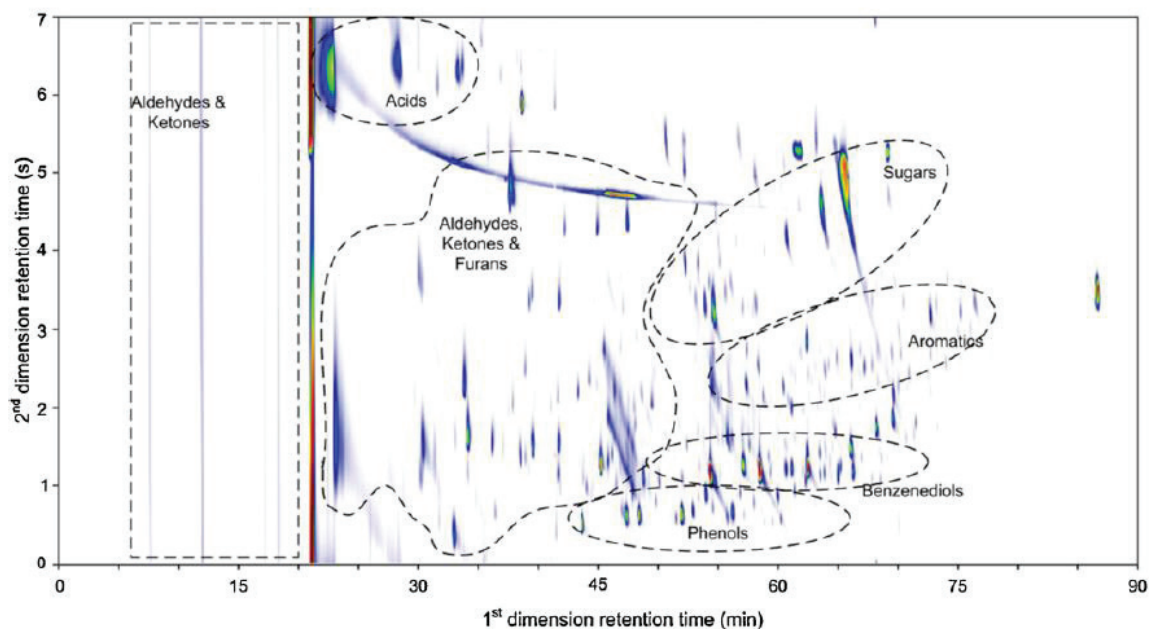


Figure I-11 : Analyse GCxGC/MS d'une huile de pyrolyse rapide BPX-50 (60 m x 0.25 mm ID 0.25 μ m) en première dimension et Rtx-Pona (1 m x 0.25 mm ID 0.5 μ m) en seconde dimension [31].

Plusieurs équipes ont investigué la quantification d'espèces oxygénées en couplant la chromatographie GC ou GCxGC avec un détecteur par ionisation de flamme (FID) [29, 31]. Il est alors nécessaire de prendre en compte les coefficients de réponse de chacun des composés oxygénés pour une quantification rigoureuse, la réponse en FID étant fonction de la structure du soluté. Une partie de ces coefficients a pu être déterminée expérimentalement à l'aide de standard, mais il est impossible de mesurer le coefficient de toutes les molécules par cette approche. De ce fait, un calcul basé sur l'approche du nombre de carbone effectif [35] permet d'estimer le coefficient de réponse d'une molécule. A titre d'exemple, Djokic et al. (Université de Ghent) [36] ont ainsi estimé les coefficients de diverses molécules à l'aide de cette approche connaissant la structure des solutés et en prenant en compte les fonctions chimiques présentes. Afin de valider leurs résultats, ils ont déterminé expérimentalement certains coefficients de réponse à l'aide de standards et ont vérifié que la valeur calculée et celle mesurée étaient en accord (moins de 10 % de variation entre valeurs mesurées et calculées). Sur la vingtaine de composés testés, cette méthodologie semble appropriée. Les auteurs ont alors étendu cette méthodologie pour la quantification de plus de 150 composés, soit 80 % des pics détectés sur leur chromatogramme GCxGC-FID. La même approche a également été employée par Michailof et al. afin de quantifier les composés les plus intenses issus de la pyrolyse d'une cellulose, d'hémicelluloses et de lignine [29]. Dans leur étude ils parviennent donc à quantifier les 10 composés les plus abondants dans chacune des fractions d'une bio-huile. Pour évaluer le potentiel de l'analyse

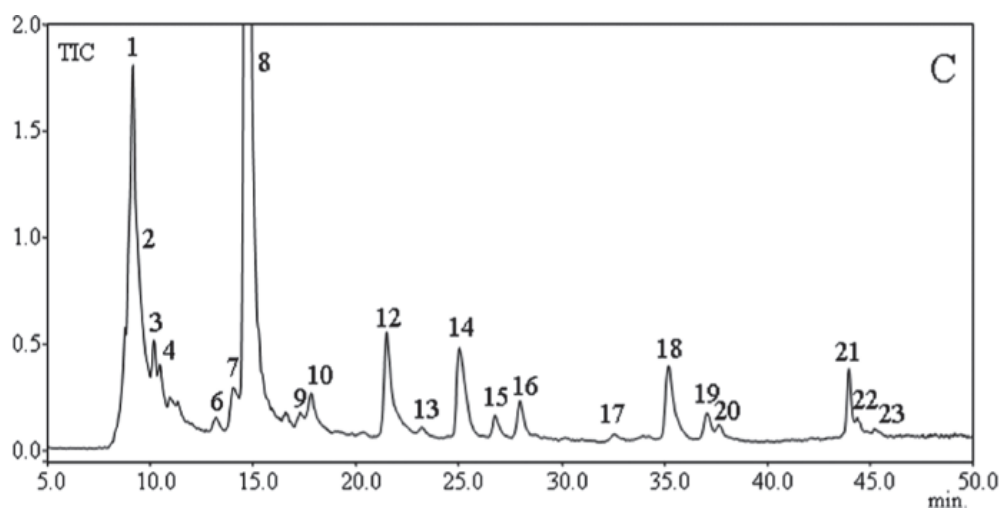
par chromatographie en phase gazeuse, certaines études ont montré qu'environ 40 % d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse peuvent être identifiés et quantifiés par GC-FID/MS[37,38].

La GC et plus particulièrement la GCxGC est donc un outil particulièrement performant pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide. Cette technique permet à la fois l'identification et la quantification des composés les plus volatils présents dans la matrice. Cependant, elle se heurte à plusieurs limitations : le risque de dégradation thermique de molécules thermosensibles (sucres par exemples), les coélutions de solutés, des bases d'identification MS incomplètes au-delà d'un certain nombre d'atomes de carbone ou encore des difficultés à éluer des molécules trop polaires et/ou peu volatiles.

Les bio-huiles peuvent contenir des composés comportant une masse molaire de plusieurs centaines de g/mol (distribution en masses comprise entre 10 et 2000 Da [39]), avec une proportion non négligeable de sucres (entre 20 et 35 % d'après Stas et al. [40]) et de composés polyfonctionnels[40]. Une partie de l'échantillon de bio-huile ne présente donc pas des propriétés en adéquation avec la technique de chromatographie en phase gazeuse par laquelle on obtiendra donc une description détaillée mais partielle de l'échantillon.

3.4 Chromatographie en phase liquide

Moins répandue que les techniques GC ou GCxGC pour l'analyse des huiles de pyrolyse rapide de biomasse, la chromatographie en phase liquide monodimensionnelle (LC) ou bidimensionnelle (LCxLC) ont été employées dans la littérature pour caractériser la phase hydrosoluble d'une huile. La caractérisation des aldéhydes et cétones présent dans une bio-huile a pu être réalisée après dérivation à l'aide de la 2,4-Dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) par exemple[41,42]. Les sucres contenus dans l'huile ont pu être caractérisés après hydrolyse de l'huile et analyse de l'échantillon obtenu en HPLC-RID (Refractive Index Detector). On peut alors quantifier la quantité de glucose issue de la dépolymérisation des sucres par hydrolyse [43]. L'équipe de Dalluge a pu décrire la quantification des principales espèces de sucres et effectuer des bilans en fonction du traitement de la biomasse en amont. Ainsi des sucres tels que le levoglucosane, le glucose, le xylose et le sorbitol ont pu être mis en avant et quantifiés. [44]. D'autres travaux [45] ont privilégié l'emploi de nanoLC pour l'analyse de telles fractions. En effet, cette technique de séparation se caractérise par de petits débits de phase mobile (50 à 500 nL/min). Grâce à cette particularité, l'emploi de source d'ionisation par impact électronique devient possible (maintien du vide et débit adapté à la source). L'emploi de ce type de source s'est montré plus performant que celui de sources à pression atmosphérique pour l'identification moléculaire des composés. Cependant de nombreuses coélutions interviennent encore via cette technique et l'analyse de la matrice complète semble compliquée via cette approche. La Figure I-12 montre un exemple de chromatogramme obtenu à partir de ces échantillons.



N°	1	2	3	4	6	7	8
Composés	Hydroxy méthyl furfural	Benzène diol	Cyclo pentanone	Méthyl cyclo pentanone	Méthyl cyclo pentanone	Benzène diol	Furfural
N°	9	10	12	13	14	15	16
Composés	Méthyl cyclo pentanone	Ethanone	Méthyl furfural	Méthyl benzène diol	Phénol	Diméthoxy phénol	Méthoxy phénol
N°	17	18	19	20	21	22	23
Composés	Ethyl benzène diol	4-Méthyl phénol	2-Méthyl phénol	Méthoxy méthyl phénol	Ethyl phénol	Diméthyl phénol	Ethyl méthoxy phénol

Figure I-12 : Résultats d'une analyse nanoLC/EI-MS d'une fraction aqueuse d'une huile de pyrolyse. Colonne : C₁₈ ; phase mobile : eau/ACN [45].

Comme en GC, l'utilisation de deux dimensions de séparation permet d'augmenter considérablement la capacité de pics. La LC bidimensionnelle peut être employée de deux façons principales. La première en « heart-cutting » où l'on sélectionne une partie du chromatogramme en première dimension pour l'envoyer dans une seconde avec un mécanisme de rétention différent. Cette approche a été investiguée par Hyötyläinen et al. en 2001 afin d'isoler la partie phénolique de l'huile et l'analyser en seconde dimension par la suite. Cette LC-LC en ligne permet de détecter et de quantifier les 10 principaux composés avec un gain en temps et une méthode plus simple. On retrouve dans ces composés : la vanilline, l'acétovanilline, l'eugénol et le dihydroxybenzaldéhyde.

Une seconde approche de la LC bidimensionnelle est la LCxLC (dite « comprehensive »). Ici l'ensemble de la matrice éluée de la première dimension est analysée dans une seconde dimension. Peu de travaux ont investigués cette technique analytique à notre connaissance. Deux études peuvent être citées[45,46]. Dans chacun des cas, la configuration retenue est l'utilisation de deux colonnes de

phase inverse (RPLCxRPLC). Des chromatogrammes comme celui présenté en Figure I-13 peuvent être obtenus. Ils illustrent l'occupation de l'espace possible à l'aide d'une méthode optimisée. On remarque que l'ensemble des points n'occupe pas l'espace entier, cela est dû aux mécanismes de rétention qui ne sont pas complètement orthogonaux. Un des critères pour qualifier une séparation peut être l'occupation (γ) de cet espace chromatographique. Plus il sera grand et plus la capacité de pics et donc la possibilité de séparer des composés sera théoriquement grande. Le Masle et al. [46] se sont focalisés sur le développement d'une méthode RPLCxRPLC permettant potentiellement la détection de plus de 2000 composés. L'emploi de détection UV n'a pas permis l'identification de composé mais prouve indéniablement le potentiel de cette technique pour la caractérisation de bio-huile. Tomasini et al. [45] en employant un détecteur MS après la séparation en RPLCxRPLC sont parvenus à identifier 26 composés comme des cétones, furanes, alcools et en majorité des phénols (12 composés).

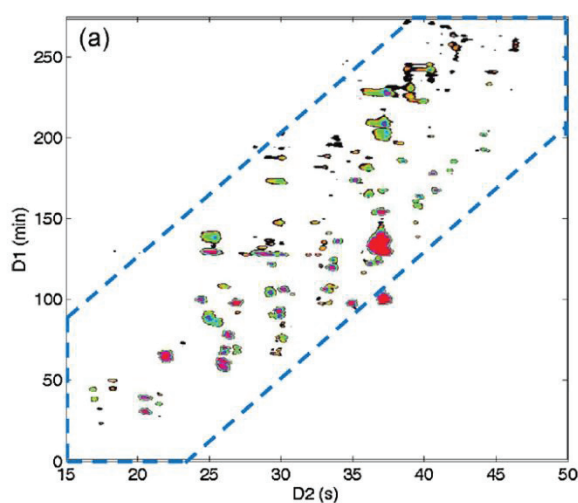


Figure I-13 : Chromatogramme RPLCxRPLC-UV d'une phase aqueuse d'une huile de pyrolyse rapide [46]

D'autres travaux plus récents se sont concentrés sur le couplage entre RPLC et SFC (Supercritical Fluid Chromatography) pour l'analyse de la fraction aqueuse d'une huile [47]. Cette configuration apporte une meilleure orthogonalité entre les deux dimensions en comparaison au montage RPLCxRPLC (l'occupation de l'espace chromatographique $\gamma = 1$ au lieu de $\gamma = 0.59$ pour la RPLCxRPLC dans le cas étudié). Cependant, l'incompatibilité des deux dimensions en termes de nature de phase mobile conduit à des effets à l'injection non négligeables causant la présence de pics très déformés. La capacité de pics résultante est donc légèrement meilleure en RPLCxSFC qu'en RPLCxRPLC (620 au lieu de 560) mais le rapport signal sur bruit est largement supérieur (10 fois) en RPLCxRPLC dû à ces effets à l'injection et ces pics déformés. Les méthodes de chromatographie en phase liquide LC bidimensionnelle recèlent un grand intérêt pour la séparation d'échantillons complexes avec des capacités de pics théoriques pouvant atteindre plusieurs milliers [48] mais cette technique n'est aujourd'hui pas aboutie pour la caractérisation d'huile de pyrolyse rapide.

4 Conclusions

Les huiles de pyrolyse rapide issues de la transformation de la biomasse lignocellulosique correspondent à des matrices complexes contenant un grand nombre de composés oxygénés. La caractérisation de ces matrices est essentielle pour valoriser au mieux ces produits. Plusieurs techniques analytiques ont donc déjà été investiguées afin d'identifier un maximum de composés. Ainsi, la spectroscopie RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse haute résolution mais aussi les méthodes séparatives (LC, GC) souvent en couplage avec la spectrométrie de masse ont toutes apporté une avancée significative dans la caractérisation de ces huiles et ce de manière complémentaire. La spectroscopie RMN offre un fort potentiel dans la description et la quantification des fonctions chimiques présentes. Elle restera limitée en présence de molécules polyfonctionnelles et un fractionnement de la matrice complexe serait souhaitable en amont pour profiter pleinement des atouts de cette technique. La spectrométrie de masse haute résolution permet quant à elle d'obtenir une description exhaustive des composés présents sous forme de cartographie de formules brutes déterminées de manière univoque grâce à une précision en masse de l'ordre du ppm. Enfin, la chromatographie en phase gazeuse mono et bidimensionnelle, permet d'atteindre une identification moléculaire. Cependant, celle-ci reste limitée à une fraction de l'échantillon (environ 40 % poids sur base humide), les composés non volatils, polaires et/ou thermosensibles n'ayant pas des propriétés compatibles avec une séparation par GC. La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle apparaît comme étant plus adaptée à cette fraction d'échantillon encore partiellement décrite, cependant elle reste aujourd'hui encore peu communément employée.

Compte-tenu du niveau de complexité de ces matrices, une approche multi-technique semble nécessaire. Dans l'espoir d'approcher une identification moléculaire de l'ensemble des composés présents, le couplage d'une méthode séparative avec un spectromètre de masse haute résolution apparaît judicieux. La chromatographie en phase supercritique est une méthode séparative qui n'a jamais encore été investiguée pour de tels produits. De par la nature des phases mobiles et stationnaires utilisées avec cette technique, il paraît envisageable de combiner les avantages des chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide. Notamment avec des efficacités de séparation importantes et une parfaite compatibilité avec les produits non volatils et thermosensibles. Ainsi, la chromatographie en phase supercritique semble être une approche intéressante à évaluer pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide et notamment en vue de répondre à nos principaux verrous qui reste d'améliorer notre connaissance de la partie non volatile de l'huile.

La suite de ce chapitre présente donc la technique séparative SFC, son principe, sa mise en œuvre, ainsi que les types de détection envisageables en réalisant un focus particulier sur le couplage avec la spectrométrie de masse.

La chromatographie Supercritique (SFC)

Bien que l'emploi d'un fluide supercritique pour réaliser une analyse chromatographique ne soit pas une technique récente (première publication datant de 1962 [49]), plusieurs évolutions des appareillages ont redonné un véritable intérêt pour l'utilisation de la SFC. Cette dernière utilise des colonnes de séparation de type colonne remplies et un gradient de co-solvant associé au CO₂ pour l'élution des composés. Pour ce type de SFC, l'ajout d'un régulateur actif de pression en sortie de colonne, le développement de pompes calorifugées et la maîtrise totale de l'introduction de l'échantillon dans le circuit sous pression ont permis d'augmenter la robustesse et la fiabilité des analyses.

Désormais, il est possible d'exploiter au maximum les propriétés de ces phases mobiles spécifiques et de coupler ceci au large éventail de phases stationnaires utilisées en LC. L'élution d'une grande gamme de composés est possible sans risquer de les dégrader thermiquement.

Bien comprendre les spécificités des phases mobiles et stationnaires employées en SFC afin de cerner au mieux l'intérêt d'une telle technique pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide est donc nécessaire.

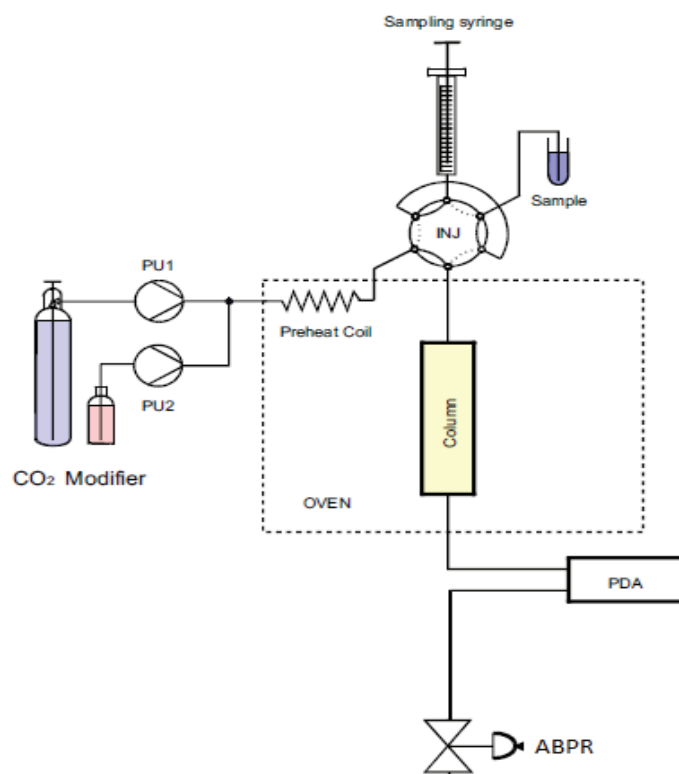


Figure I-14 : Schéma d'un appareil SFC « type LC » [49]

1 Les phases mobiles utilisées en SFC

Après plusieurs essais employant une large variété de fluides, le choix du dioxyde de carbone (CO_2) est apparu comme unanime. En effet, ce dernier regroupe plusieurs avantages : fluide peu coûteux, non inflammable, facilement disponible en qualité supérieure, inerte et présentant une faible absorbance en UV. A cela s'ajoute des conditions critiques facilement maintenues (71 bars et 31 °C) et surtout un large panel de solvants organiques miscibles (261 substances recensées par A.W. Francis [49]).

La densité d'un fluide supercritique varie avec la pression et la température. Pour le CO_2 pur, il varie de 0.2 à 1.1 g/mL, c'est-à-dire entre la densité d'un gaz et celle d'un liquide [50].

Pendant, le CO_2 seul reste limité pour la solubilisation de tous les analytes. C'est pourquoi actuellement, la grande majorité des analyses SFC emploient une phase mobile composée de CO_2 et d'un co-solvant organique pour augmenter cette solubilité et éviter des phénomènes de précipitation lors de l'injection des échantillons. L'augmentation du taux de co-solvant va donc induire une modification du pouvoir solvant de la phase mobile au cours du temps. D'autre part, ces co-solvants vont aussi permettre de réduire l'élargissement des pics en réduisant les interactions non désirées avec les phases stationnaires.

Typiquement, la phase mobile d'une méthode SFC pour l'analyse d'un échantillon constitué de composés de polarité très variable correspondra à un mélange de CO_2 et de co-solvant pouvant varier entre 5 et 50 % au cours de l'analyse [51]. En modifiant ainsi la composition de la phase mobile, on modifie également les valeurs critiques de cette phase mobile. La Figure I-15 montre comment évoluent ces valeurs lorsqu'on augmente la quantité de co-solvant, dans ce cas le méthanol.

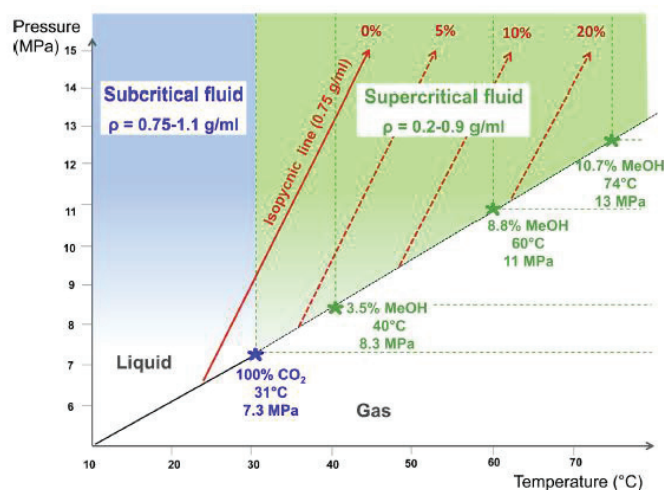


Figure I-15 : Diagramme de phases pour CO_2 pur (en bleu) et avec ajout de MeOH (en vert) [51]

Plus le taux de co-solvant augmente et plus la température critique augmente. La pression critique quant à elle, va passer par un maximum avec l'augmentation de co-solvant (par exemple pour le MeOH aux alentours de 40%) avant de diminuer de nouveau [52].

Les conditions les plus couramment observées dans la littérature traitant de SFC, se situent au-delà de la pression critique mais en dessous de la température critique (30°C et 150 bars). Cette zone, délimitée en bleu sur la Figure I-15, correspond à un état subcritique et non supercritique de la phase mobile. Les propriétés de viscosité et de diffusion restent continues entre ces deux états et les

changements de densité sont moindres dans l'état subcritique [50,53]. Le fait d'être beaucoup moins sensible aux petites variations de conditions opératoires (température, pression) explique pourquoi cet état est à privilégier.

Bien que le CO₂ permette l'utilisation de différents co-solvants, la majorité des travaux publiés emploient un alcool (méthanol, éthanol et isopropanol) (Cf. Figure I-16) offrant la possibilité d'interagir avec les groupes silanols de la phase stationnaire et de réduire ainsi l'élargissement de pics dû à ces derniers [54,55].

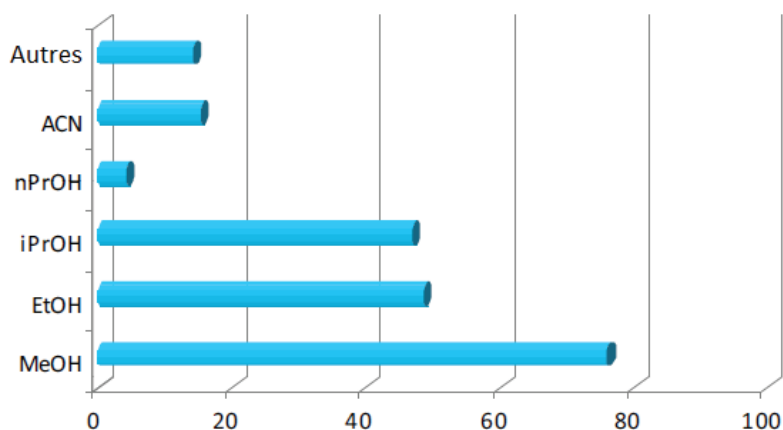


Figure I-16 : Proportion d'articles de recherche citant l'utilisation d'un co-solvant (réalisé en 2014) [55].

2 Les phases stationnaires utilisées en SFC

Le caractère non polaire du CO₂ a souvent conduit les utilisateurs à employer des phases stationnaires polaires, ce qui pouvait s'approcher de la chromatographie en phase liquide à polarité de phase normale. Cependant, l'ajout d'un co-solvant organique dans la phase mobile permet également l'utilisation de colonnes habituellement employées en chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée.

Ces différentes possibilités ont été investiguées dans divers travaux de la littérature [56,57]. L'ajout de co-solvant dans le CO₂ compressé permet donc l'unification des deux domaines distincts en chromatographie liquide offrant ainsi une large gamme d'applications possibles (Tableau I-3).

Tableau I-3 : Possibilités en LC et alternative en SFC [51]

Type de composé	Très polaires et solutés organiques ionisables	Solutés organiques polaires	Mélange solutés polaires/non polaires	Solutés organiques variés	Solutés hydrophobes
Mode LC	HILIC	NPLC	« Mixed mode »	RPLC	NARP
Phase mobile LC	Solvant organique polaire + Eau	Solvant non polaire + IPrOH	Solvant polaire	Eau + Solvant polaire	Solvant Organique
Phase stationnaire LC	Polaire	Polaire (Silice, Diol)	« Mixed mode »	Non polaire	C ₁₈
Phase mobile SFC	CO ₂ + co-solvant + tampon aqueux	CO ₂ + co-solvant (MeOH, ACN, IPrOH...) + additif			CO ₂ + co-solvant
Phase stationnaire SFC	Polaire	Polaire	C ₁₈ avec groupement	Tout type	C ₁₈

Ce large choix représente aussi une difficulté lors de l'élaboration d'une méthode. Il est en effet impossible de tester toutes les phases stationnaires disponibles sur le marché. Les travaux de West *et al.*, basés sur les descripteurs d'Abraham [58,59] et le modèle LSER (Linear Solvation Energy Relationship) (Eq.1) ont permis de classifier les différentes chimies de phase stationnaire en fonction des interactions mises en jeu.

$$\text{Log } k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (\text{Eq. 1})$$

Cette équation permet de relier la rétention d'un composé donné (log k) à différents paramètres physico chimiques de ce composé (correspondant aux termes en majuscule) dans un certain système de phase stationnaire, phase mobile, température et BPR, caractérisé lui-même par des descripteurs (indiqués en minuscule).

Le terme k représente le facteur de rétention

avec $k = \frac{(T_r - T_0)}{T_0}$ où T_r est le temps de rétention et T₀ le temps mort du système.

Le terme c correspond au rapport des phases et dépend de la géométrie propre à chaque colonne.

Les termes e et E représentent la polarisabilité due aux interactions des électrons n et π.

Les termes s et S symbolisent les interactions dipôle-dipôle.

Les termes a, A et b, B correspondent aux échanges acido-basiques entre solutés et phases mobiles et stationnaires.

Les termes v et V rendent compte des interactions dues à la taille des solutés (volume caractéristique de McGowan [60]).

En employant une régression multilinéaire basée sur les descripteurs connus de certaines molécules, il est alors possible de déterminer les termes liés au système. Au travers de plusieurs séries d'expérimentations, un comparatif a pu être mis en place entre la plupart des phases stationnaires disponibles actuellement sur le marché : alkyls [61], aromatiques [62–64] et polaires [65]. West et

Lesellier ont proposé un diagramme permettant la projection de chaque coefficient sur un axe. La Figure I-17 donne un exemple de ce type de représentation. On retrouve dans cette figure des informations pour 70 chimies de phases disponibles dans le commerce. En plus de l'emplacement du point qui renseigne sur le type d'interaction correspondant à une phase stationnaire, la taille de ce point indique également la force des interactions mises en jeu ($u = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2}$). En effet, plus le point sera imposant et plus les interactions entre solutés et phase stationnaire seront fortes. Les études qui ont permis l'obtention de ce diagramme ont été réalisées dans des conditions isocratiques avec 5 % de co-solvant (dans ce cas du méthanol). Si cette représentation permet de rendre compte des interactions possibles, il faut garder en tête qu'en modifiant les conditions (nature et pourcentage de co-solvant par exemple), les coordonnées des points s'en trouvent modifiées. Ce diagramme sert donc de base pouvant être extrapolé afin de réduire le choix de phases stationnaires.

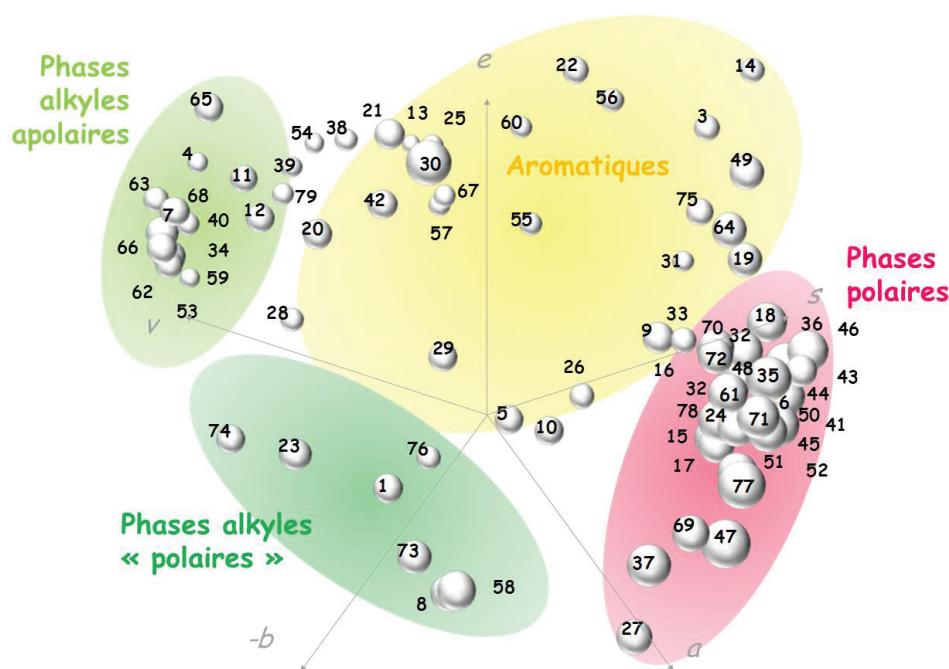


Figure I-17 : Classification de phases stationnaires par la méthode LSER. (*e* : interaction n et π ; *s* : dipôle-dipôle ; *a* : acide ; *b* : basique ; *v* : effets de cavité) [66]

Ainsi, lors d'un développement de méthode SFC, l'utilisation de cette classification simplifie les tests à réaliser car il suffit de tester quelques chimies de colonnes assez bien réparties dans le diagramme pour balayer la majeure partie des interactions différentes. Une fois la zone du diagramme la plus pertinente pour l'application étudiée repérée, quelques chimies de phase très proches peuvent être évaluées afin d'affiner l'optimisation. L'intérêt d'une telle démarche a été investigué par Khater *et al.*[67]. Il convient ensuite de prendre en compte la géométrie de la colonne et de jouer sur les différents paramètres clés régissant une séparation en SFC (nature de la phase mobile, température, BPR...).

3 L'optimisation de méthode en SFC

Si les phases mobiles et stationnaires sont des paramètres primordiaux lors d'une analyse en SFC, il existe également d'autres paramètres clés à optimiser lors d'un développement de méthode afin d'obtenir la meilleure séparation possible. Ainsi, plusieurs équipes se sont attelées à mesurer l'impact de ces différents paramètres. Desfontaines et al.[68] ont ainsi mis en évidence l'importance de l'étape d'injection lors d'une analyse SFC. Cela regroupe le volume injecté et les différents solvants employés (solvant d'injection et de lavage de l'aiguille). Si le choix est donné à l'utilisateur, une attention particulière doit être portée à ces paramètres afin d'améliorer la forme des pics obtenus lors de la séparation. La Figure I-18 donne un exemple de la déformation que les pics peuvent subir en fonction du volume injecté ainsi que du diluant utilisé pour préparer l'échantillon.

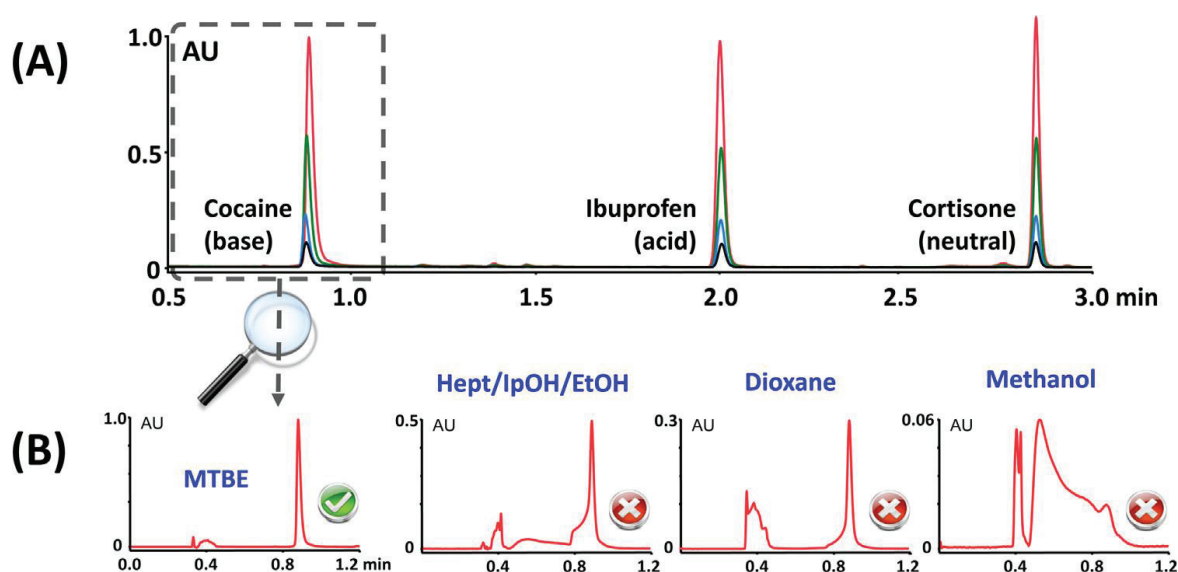


Figure I-18 : Effet du volume d'injection (A) avec 1 (noir), 2 (bleu), 5 (vert) et 10 (rouge) µL injecté de cocaïne, ibuprofène et cortisone à 100 µg/mL chacun dans MTBE et du solvant de dilution (B) lors de l'injection de 10 µL de cocaïne à 100 µg/mL dans 4 solvants différents [68]

Le solvant d'injection impacte la forme des pics. Les auteurs préconisent alors d'employer des solvants tels que DCM (dichlorométhane), MTBE (Méthyl tert-butyl ether), ACN (acétonitrile) et CPME (méthoxycyclopentane) pour limiter les effets dus au solvant d'injection. Le méthanol est quant à lui à proscrire. De plus la volatilité du solvant est également à prendre en compte. Ainsi, l'utilisation de MTBE ou de DCM risque d'induire une concentration de l'échantillon au cours du temps avec l'évaporation du solvant de dilution. Pour palier cela, une température basse peut être réglée lors du stockage dans le module d'injection.

Cependant, dans certains cas la nature de l'échantillon va imposer le solvant. La concentration et le volume injecté devront alors être pris en compte afin de limiter au maximum la déformation des pics. Les auteurs préconisent en effet une injection d'un volume plus petit mais à une concentration plus élevée pour la même quantité de matière injectée afin d'éviter des pics asymétriques [68].

La BPR et la température ayant toutes les deux un impact sur la densité de la phase mobile et donc sur la force d'éluion de cette dernière, plusieurs études prennent en compte l'optimisation de ces paramètres [69–71]. Si pour chacun l'impact est démontré, les conclusions sont quant à elles propres à chaque échantillon analysé. En effet, les valeurs optimales trouvées pour chaque application vont être

dépendantes de l'échantillon étudié et du système chromatographique sélectionné. Ces deux grandeurs sont donc à optimiser afin d'affiner au mieux la méthode mais impacteront de manière moins significative la séparation [72] que le choix des phases par exemple.

Enfin dernièrement, des études ont été conduites afin de déterminer le rôle des additifs dans la phase mobile [73]. West et al. ont ainsi démontré l'impact de ces additifs sur le pH apparent de la phase mobile qui présente déjà un caractère acide de par la présence majoritaire du CO₂ (pH de 5 mesuré par les auteurs) [73]. La polarité de la phase mobile ne se trouve pas modifiée par cet ajout d'additif quel qu'il soit. L'ajout d'acide (acide acétique, acide formique, acide trifluoroacétique, acide méthanesulfonique, tous à 0.1 %) va diminuer le pH de 5 à 1 pour une phase mobile usuelle (co-solvant MeOH). L'ajout d'une base (sels d'ammonium par exemple à 20 mM) ne va pas modifier le pH mais plutôt le stabiliser au cours du gradient.

4 Les systèmes de détection envisageables

De par sa diversité de phases stationnaire et mobile, la SFC apporte de nouvelles perspectives pour la caractérisation d'échantillons complexes tels que les huiles de pyrolyse. Mais pour parvenir à cette caractérisation, il est nécessaire de coupler cette technique de séparation à divers détecteurs pertinents. Les détecteurs les plus couramment utilisés sont l'UV et la spectrométrie de masse.

A noter que d'autres couplages peuvent être développés pour une analyse SFC. Des couplages avec des détecteurs habituellement employés lors d'une analyse GC ont été investigués tels que les détecteurs FID (Flame Ionization Detector) [74], NCD (Nitrogen Chemiluminescent Detector) [75] et SCD (Sulfur Chemiluminescent Detector) [76, 77] prouvent la faisabilité de ces couplages. Cependant des adaptations sont obligatoires et les inconvénients encore nombreux comme le faible taux de co-solvant supporté (maximum 1 % de co-solvant) ou les difficultés à réguler le débit entrant dans le détecteur lors d'une analyse en gradient.

A ces détecteurs de « type GC », on peut également ajouter des systèmes de détection associés usuellement aux systèmes d'analyse LC. Le DEDL (Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière) est un détecteur donnant une information sur la masse des analytes détectés. Cet appareil va relier la quantité de lumière diffusée par les composés à leur masse. L'utilisation d'un tel détecteur semble donc une bonne possibilité puisque le couplage avec la SFC facilite l'emploi du détecteur. En effet, grâce à la décompression de la phase mobile, l'échantillon est déjà vaporisé sous forme de gouttelettes, le besoin en gaz nébulisant est donc moindre et les pertes associées à la projection de gouttelettes sur les parois de la chambre de nébulisation sont moins importantes.

Cependant afin de maximiser la réponse du détecteur, une attention a déjà été portée sur l'emplacement du couplage entre SFC et DEDL [78]. Deux possibilités s'offrent à un utilisateur : soit un capillaire est installé à la sortie du système de régulation de pression, soit le flux en sortie de colonne est séparé en deux avec une partie dirigée vers le DEDL et la seconde vers le régulateur. La Figure I-19 montre bien l'impact de l'emplacement du détecteur. Cela peut s'expliquer par deux raisons. Premièrement, le passage dans le régulateur de pression va ajouter un volume mort supplémentaire néfaste pour le profil chromatographique. D'autre part, si le détecteur est connecté après le régulateur de pression, la décompression du CO₂ supercritique va se faire de manière abrupte et non contrôlée. Un risque de démixtion de phases est alors envisageable, entraînant une non homogénéité des analytes dans la phase mobile et induisant une perte de signal du DEDL.

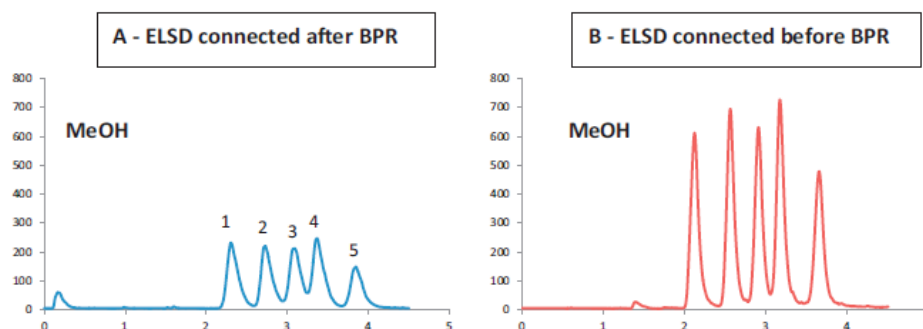


Figure I-19: Effets de l'emplacement du détecteur pour un couplage SFC-DEDL. Colonne Synergie Polar RP, débit : 3ml/min, BPR : 150 bars, T° : 30°C, CO_2 /co-solvant : 95/5, Mélange de plastifiants [80]

Une autre problématique peut se présenter avec la décompression du CO_2 . En effet, en raison de la faible solubilité dans le gaz nébulisant, les analytes peuvent précipiter (car faible quantité de co-solvant). Pour éviter cela, il est possible d'associer un second flux de co-solvant avant la décompression afin de prévenir toute précipitation [78]. De plus cet ajout de co-solvant peut être la solution à un second inconvénient lié au DEDL. La réponse donnée par ce détecteur dépend de la quantité de co-solvant introduit. En effet, en fonction de la composition de la phase mobile lors de l'élution du soluté, la réponse ne sera pas identique [79]. Afin de contrer cet effet, De Villiers *et al.* proposent d'appliquer un gradient inversé dans ce second flux pour obtenir une quantité constante de co-solvant à l'entrée du détecteur [80].

Les différentes modifications apportées pour ce couplage SFC-DEDL permettent donc son emploi pour l'analyse de matrices complexes. Lesellier *et al.* se sont également penchés sur l'influence des divers paramètres tels que la nature du co-solvant, la quantité injectée ainsi que le débit employé [81]. Leurs conclusions assurent que l'utilisation du DEDL est largement favorisée par les conditions opératoires usuelles de la SFC. Les gammes de température et de BPR présentées auparavant sont donc parfaitement applicables pour une détection à l'aide d'un DEDL. Cependant, le second point mis en avant dans cette revue, montre que l'impact des autres paramètres (propres au DEDL), tels que le débit de gaz nébulisant, la température du tube sécheur ne sont pas les mêmes selon la géométrie du détecteur. Cette dépendance à chaque géométrie imposera donc de balayer les différents paramètres afin de trouver le meilleur optimum pour l'application à laquelle nous portons un intérêt.

En conclusion, l'utilisation d'un détecteur DEDL après une séparation en SFC est une possibilité intéressante. En effet, ce couplage pourra être réalisé en complément d'un autre type de détecteur (UV par exemple) avec la configuration proposée par Lecoer *et al.*[78]. De plus, les paramètres de SFC usuels (P : 150 bars et T° : 30 °C) semblent parfaitement compatibles.

4.1 La détection UV

Ce détecteur, un des plus répandu en chromatographie en phase liquide, l'est tout autant en SFC. Moyennant une adaptation de la cellule, proposée par les constructeurs, afin que celle-ci soit compatible en termes de pression ce détecteur est aisément mis en ligne en sortie de SFC. Il est non destructif, ce qui ouvre la possibilité de connecter en série un second mode de détection. Le principe repose sur l'absorbance d'un faisceau lumineux par des solutés au travers d'une cellule. En utilisant la loi de Beer-Lambert on a une relation entre la concentration des solutés et la mesure d'absorbance tel que

$$A = \varepsilon \times L \times C \quad (1)$$

avec A l'absorbance, L la longueur de la cuve UV et C la concentration de l'analyte.

Il est donc possible de réaliser une analyse quantitative par UV moyennant la connaissance du facteur de réponse du composé en question. Il est possible d'enregistrer le signal sur une plage de longueur d'onde de 200-400 nm ce qui permet ensuite d'extraire le signal à une longueur d'onde donnée qui peut parfois être très sélective. Pour un seul échantillon, différents chromatogrammes permettant parfois qualitativement d'obtenir des informations sur les fonctions chimiques présentes dans l'échantillon analysé sont obtenus. Le fait d'utiliser l'acquisition sur une plage de longueur d'onde permet également d'avoir accès aux spectres UV des composés détectés. A noter que ce spectre sera dépendant des conditions dans lesquels il a été acquis. Le spectre UV permet d'ajouter une dimension supplémentaire à celle du temps de rétention pour procéder à une identification à partir de l'injection de standard. De plus, la déformation partielle du spectre UV attendue peut informer sur la présence d'une coélution. Très facile à utiliser sans optimisation particulière ce mode de détection trouve cependant ces limites pour les composés ne comportant pas de chromophores, ou pour procéder à l'identification de composés inconnus.

Les applications sont donc nombreuses pour les analyses SFC-UV. La Figure I-20 donne un exemple de chromatogramme obtenu par SFC-UV, on remarque que la SFC permet de séparer parfaitement les paires de composés chiraux composant l'échantillon analysé. Ainsi pour chaque développement de méthode, ce mode de détection est employé souvent associé à un second donnant accès à plus d'information comme la spectrométrie de masse par exemple.

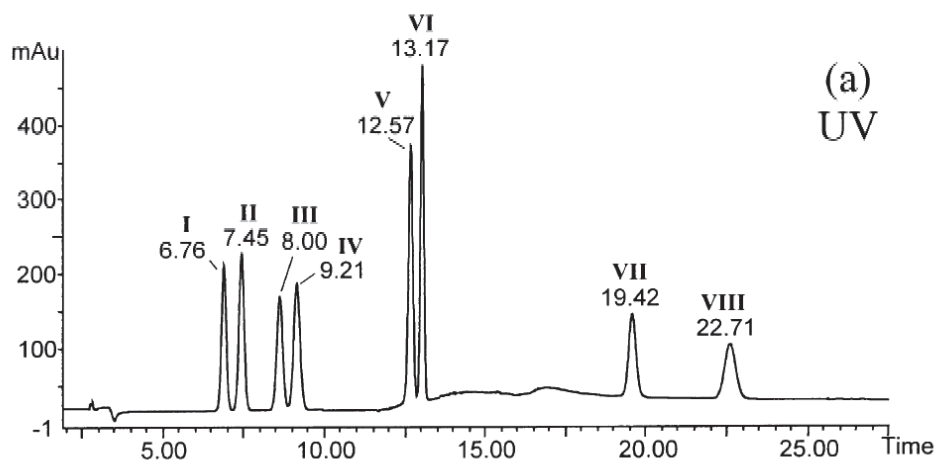


Figure I-20 : Chromatogramme UV (220 nm) d'un mélange de 4 composés antimycosiques (miconazole, éconazole, sulconazole et cétoconazoles). Colonne Chiralpak AD (25 x 0.46 cm, 5 μ m), T° : 35°C, P : 18 MPa, débit : 2.5 ml/min, Co-solvant : EtOH [82]

4.2 La détection par spectrométrie de masse

Les spectromètres de masse font partie de ces puissants détecteurs capables de fournir une information détaillée sur l'analyse de matrices complexes. Un spectromètre de masse se compose

d'une source d'ionisation, d'une combinaison d'analyseurs et d'un détecteur comme symbolisé sur la Figure I-21. Les performances d'un spectromètre de masse (notamment la résolution et la sensibilité) sont très variables d'un instrument à l'autre selon l'analyseur qui le compose. De plus, la source d'ionisation doit être soigneusement sélectionnée en fonction des solutés à ioniser. De par la nature de la phase mobile SFC (sous pression), l'utilisation de source travaillant à pression réduite est compliquée car la décompression empêchera le maintien stable de ce vide. Les sources d'ionisation travaillant à pression atmosphérique sont donc les seuls possibles. Le principe de fonctionnement des sources d'ionisation envisageables ainsi que des principaux analyseurs disponibles sont décrits dans l'Annexe I de ce chapitre.

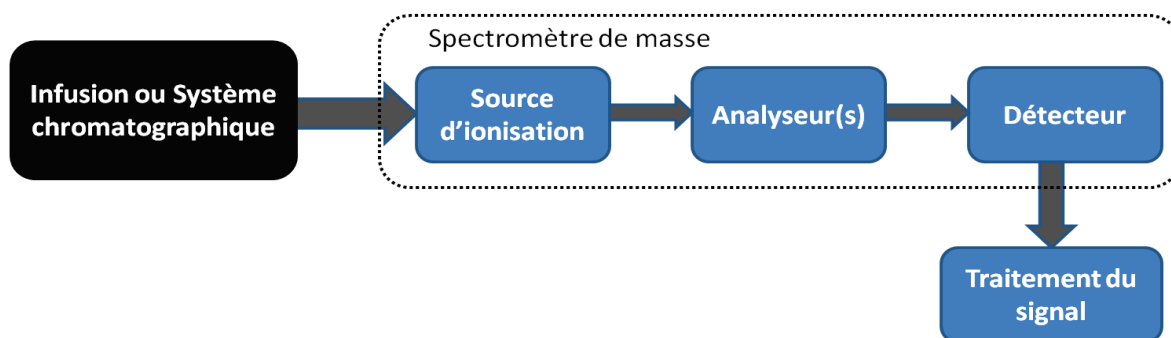


Figure I-21 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

5 Conclusion

L'émergence de nouveaux appareillages SFC induisant des analyses plus répétables permet d'exploiter les propriétés spécifiques de cette phase mobile (faible viscosité, forte gamme de compatibilité). Pour cela, il est important de choisir au mieux différents paramètres comme la phase stationnaire, le co-solvant associé, le gradient employé, la BPR, la température, le volume injecté, le solvant de dilution. Tous ces paramètres n'ont pas le même impact sur la rétention. Au regard de la littérature, il semble primordial de sélectionner une phase stationnaire adaptée. Pour cela l'utilisation d'une classification déjà établie permet de réduire le large choix possible. A cette phase stationnaire s'associe une phase mobile elle aussi à définir précisément pour obtenir le meilleur système chromatographique possible. Ces deux paramètres semblent les plus importants pour le développement d'une méthode analytique et seront dépendants de l'échantillon à analyser. Une fois le système chromatographique sélectionné, les autres paramètres (BPR, température, volume d'injection) peuvent être optimisés.

Le second aspect de la mise au point d'une méthode SFC porte sur la détection employée. Plusieurs détecteurs sont exploitables avec la SFC. Si certains possèdent trop de contraintes pour que leur emploi soit envisageable dans le cadre de cette thèse (FID, NCD, SCD par exemple), l'utilisation de l'UV, du DEDL et de la MS semble pertinente. La détection par UV ne demande pas d'adaptation particulière. Le DEDL apporte le même type d'information que la MS. Le choix a été fait de se focaliser cependant sur le couplage avec la MS plutôt que le DEDL dans cette thèse. Le couplage entre SFC et MS et l'interface à optimiser entre ces deux appareillages sera plus longuement étudié.

Couplage SFC/MS

1 Spécificité du couplage SFC/MS

Bien que certains auteurs aient démontré que l'emploi de sources à pression atmosphérique sans amélioration préalable fonctionnait [90–92], il semble cependant intéressant d'apporter quelques modifications à l'interface afin d'optimiser la sensibilité et les performances de la détection. Tout d'abord, il est important de rappeler qu'avant l'introduction dans la source, la phase mobile issue de la SFC va subir une décompression et donc éliminer le CO₂ qui se trouvait en phase supercritique. Cette décompression va donc être la source des différents verrous liés à ce couplage.

Premièrement la décompression d'un gaz est un phénomène endothermique. Dans le cas du CO₂, sa détente va créer un spray à une température d'environ -70°C . Avec une température aussi basse, plusieurs inconvénients peuvent interférer lors de l'analyse. En effet, un risque de gel à l'interface entre la SFC et la MS est envisageable et peut se traduire soit par une obstruction totale du capillaire de transfert soit par une arrivée par à-coup de la phase mobile SFC dans la source d'ionisation (le capillaire se bouche à cause de petits glaçons mais la pression qui en résulte dans le capillaire est suffisante pour le briser). Le second inconvénient lié à cette basse température se situe au niveau de la formation des ions dans la source. En effet, cette atmosphère froide va modifier les mécanismes de formation des ions dans la source d'ionisation. Ce phénomène est connu et peut avoir un intérêt dans le cadre d'analyse de composés ayant un rendement d'ionisation faible ou pour l'observation de complexes non covalents. Dans ce cas-là, l'utilisation d'un jet froid (cold spray ionization) va permettre l'ionisation [93]. Cette ionisation est permise par l'augmentation de la polarisabilité des composés en baissant la température. Cette faculté à s'ioniser dépend de la constante diélectrique du composé qui va augmenter lorsque la température va diminuer. En effet on a :

$$P = \varepsilon_0(\varepsilon_p - 1) \quad (2)$$

avec P la polarisabilité diélectrique, ε_0 la permittivité du vide, ε_p la constante diélectrique et E le champ électrique. Or ε_p est dépendant de la température selon l'équation (3) :

$$\varepsilon_p = \varepsilon_0 e^{-T/\theta} \quad (3)$$

avec T = température et θ = constante.

Si cela peut avoir un intérêt pour certaines applications, l'effet inhérent est de complexifier l'analyse des spectres et également de diminuer la sensibilité du détecteur. Afin de s'affranchir de ces inconvénients et de les limiter, la solution la plus simple à mettre en place est d'augmenter la température de la source d'ionisation par rapport aux températures employées habituellement lors d'un couplage LC/MS [67,91].

La seconde difficulté de ce couplage entre la SFC et la MS est la précipitation des analytes lors de l'évaporation du CO₂ en particulier en début d'analyse lorsque le taux de co-solvant est très faible. Afin d'éviter ce phénomène, un flux de solvant « make-up » est ajouté en amont de l'introduction dans

la source. Garzotti *et al.* présentent une étude sur un tel couplage et schématisent l'appareillage mis en place [82].

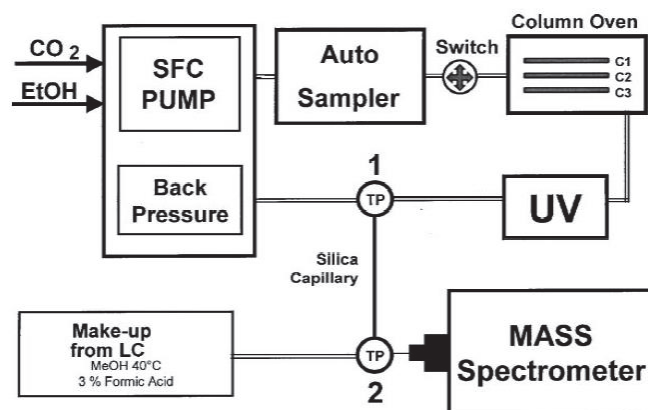


Figure I-22 : Schéma d'un appareillage SFC/MS [82].

On retrouve ce design dans de nombreuses études [94–96]. En effet, en plus de prévenir la précipitation des solutés, cet ajout de « make-up » permettra l'obtention d'un spray stable lors des étapes de nébulisation. Enfin, le débit de ce flux est adapté aux recommandations d'utilisation de chacune des sources. En effet, pour l'ESI, le débit total devra être compris entre 0.4 et 0.8 mL/min. En revanche, pour l'APCI, les débits employés sont bien plus élevés et se situent autour de 1.5 mL/min maximum. Enfin, Guillaume *et al.* ont étudié l'influence du placement de ce fluide « make-up » dans le système [97]. Les deux configurations étudiées sont représentées sur la Figure I-22. Dans le premier cas, en sortie de colonne, un té va permettre de séparer le flux entre la détection MS et la détection UV. Le régulateur de pression sera placé quant à lui après la cellule UV. Dans le second cas, la détection MS se situe après le régulateur de pression et un second fluide dit de « make-up » est ajouté à la sortie de l'UV. Afin de caractériser les deux configurations, les performances chromatographiques ont d'abord été vérifiées. Ainsi sur la Figure I-23, on peut remarquer que les deux configurations (A et B) sont très proches. En effet, l'ajout du fluide de « make-up » ne va pas influencer sur les temps de rétention ni sur l'élargissement des pics et cela malgré l'ajout de connexions et de tubes supplémentaires pour la configuration B.

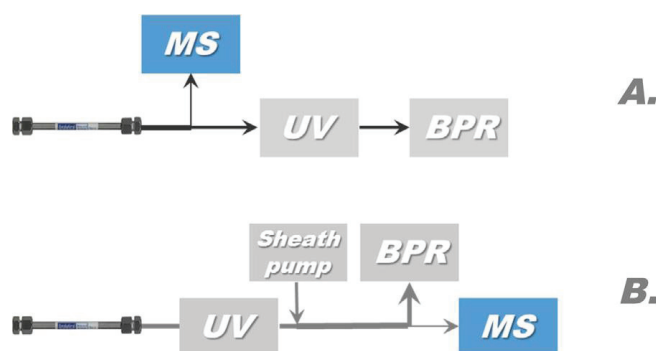


Figure I-23 : Schéma des configurations possibles pour le couplage SFC / Masse [97]

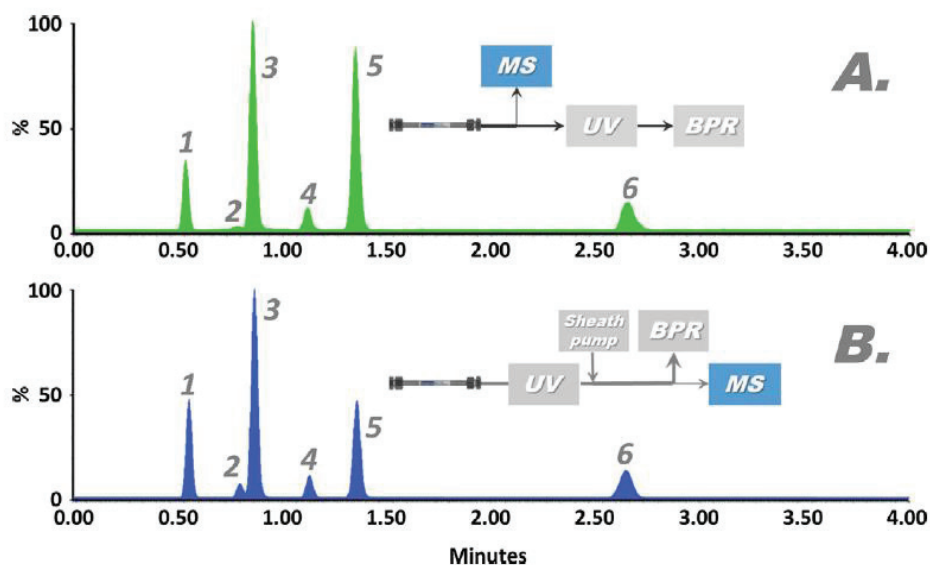


Figure I-24 : TIC chromatogramme pour un mélange de 6 composés pharmaceutiques avec les deux configurations de couplage [97].

Comme la différence reste faible entre les performances chromatographiques des deux configurations, le choix a été réalisé sur les performances de l'ionisation de ces dernières. En ajoutant un fluide de « make-up » chacun des 6 composés a vu l'intensité de son signal multiplié par un facteur compris entre 5 et 30 alors que le bruit de fond associé est lui resté constant. Cela peut s'expliquer par la contribution des molécules de « make-up » comme une source de protons pour l'ionisation des composés. A la vue de ces résultats, on retiendra donc la configuration employant le flux de « make-up » avant le régulateur de pression pour les travaux de cette thèse (configuration B).

Bien que ce design soit le plus répandu dans la littérature, il est généralement associé à l'utilisation d'un appareil SFC fabriqué par Waters (UPC² avec Isocratic Solvent Manager). D'autres fournisseurs d'appareillage SFC (Agilent ou Shimadzu par exemple), on fait le choix d'une configuration entre les deux dimensions sans l'utilisation de split [98–100]. La Figure I-25 schématise les configurations employées avec ce type d'appareillage.

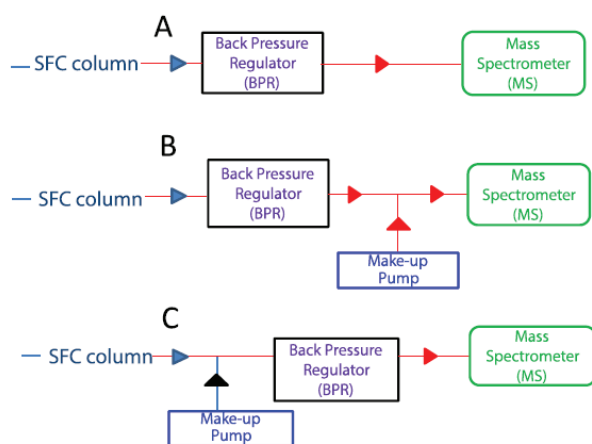


Figure I-25 : Configuration sans split pour l'interface entre SFC et MS [101]

Cette approche de l'interface entre SFC et MS est généralement expliquée par le besoin d'une grande sensibilité lors de la détection par MS. En effet, en s'affranchissant du split imposé par la première configuration, toute la quantité de matière injectée au début de l'analyse et éluée de la colonne pourra potentiellement être détectée [99]. Cependant, cette configuration implique également de porter une attention particulière au tubing de transfert entre le régulateur de pression et l'entrée de la masse. En effet, à cause de la décompression, il faut obligatoirement employer un tubing de faible diamètre interne afin d'éviter tout risque de démixtion de phases lors du transfert. Enfin, si le gain en sensibilité qui résulte de la non utilisation d'un split est recherché, il faut également tenir compte de l'instabilité du spray formé à l'aide de cette configuration.

2 Application de la SFC/MS (ESI et APCI)

Le couplage SFC/MS apparaît donc comme une technique analytique d'intérêt. Et les différentes applications qui l'utilisent dans la littérature illustrent bien ce fait. Ainsi, on distinguera les deux sources d'ionisation dans l'utilisation de ce couplage : l'ESI en premier lieu et l'APCI par la suite.

2.1 Couplages SFC/MS utilisant l'ESI :

L'émergence des nouveaux systèmes SFC, il y a 20 ans, ont été motivés par des acteurs travaillant sur des thématiques spécifiques. En effet, les premiers domaines d'application à employer la SFC ont été le domaine pharmaceutique et celui des produits naturels (dans un premier temps pour séparer des composés chiraux)[51]. Au vu de la taille et de la polarité des molécules d'intérêt pour ces domaines d'application, le choix du couplage avec une source Electrospray était le plus approprié. Plusieurs articles traitant de ce sujet sont publiés comme le dosage de vitamines [102], le suivi d'impuretés [103], le suivi de composés toxiques [104] ou bien encore des polymères [105]. Au travers de ces articles, les auteurs développent leur méthode SFC/ESI-MS en optimisant les différents paramètres. Pour cela, la température, la nature des solvants mais également les additifs employés pour améliorer la détection en MS sont vérifiés.

Pour la plupart de ces développements de méthode SFC, la question se pose de l'intérêt d'une nouvelle technique alors que l'utilisation de chromatographie liquide, plus abordable d'un point de vue économique, est souvent déjà existante. Pour répondre à ce type de question, plusieurs équipes se sont penchées sur la comparaison entre SFC/MS et UHPLC/MS. Ainsi, Berkecz et al. [107] et Lemasson et al. [103] adoptent la même démarche en comparant les facteurs de rétention obtenus à la fois en UHPLC et en SFC. La Figure I-26 montre un exemple de représentation de l'orthogonalité des deux méthodes développées à travers les travaux de Berkecz.

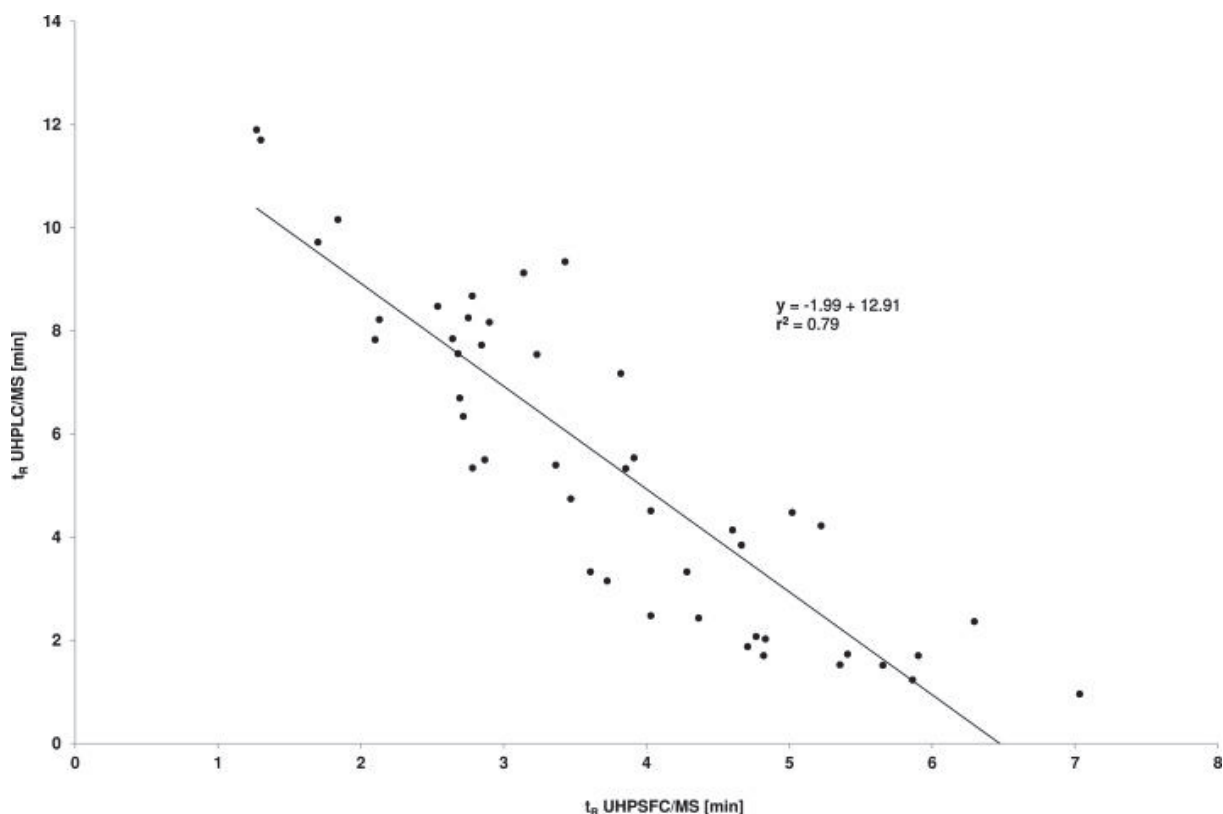


Figure I-26 : Corrélation entre temps de rétention en UHPLC/MS et UHPSFC/MS [107]

Pour les deux équipes, ces représentations permettent de mettre en évidence la complémentarité des techniques chromatographiques. En effet, les mécanismes de rétention mis en jeu dans les deux cas ne sont pas les mêmes et vont donc modifier l'ordre des composés présents. L'intérêt de la SFC dans ce cas-là n'est donc pas de remplacer les méthodes utilisant l'UHPLC, mais d'apporter une technique complémentaire permettant de lever certaines coélutions grâce à la différence de sélectivité.

L'utilisation de la SFC apporte également un gain important en termes de temps d'analyse. Méjean et al. [108] ainsi que Novakova et al. [109] se sont attachés à développer une méthode SFC/MS pour l'analyse de tocophérol (vitamine E). Chacun de ces travaux parvient à réduire considérablement le temps nécessaire pour une analyse. En comparaison avec les méthodes HPLC usuelles, Méjean et al. rapportent un gain de 2 à 8 fois en termes de temps d'analyse par rapport à la littérature. Ce gain s'explique par la différence de viscosité de la phase mobile permettant de travailler à des débits plus élevés sans une augmentation de pression limitante.

L'autre avantage important de la SFC/MS en comparaison à la LC/MS reporté dans la littérature se porte sur la sensibilité de la détection. Que ce soit pour l'analyse de vitamines [108], de pesticides [98], de lipides [107], les différents auteurs reportent tous un gain en sensibilité vis-à-vis de la LC/MS.

Enfin, Desfontaines et al. [110] ont non seulement comparé la SFC/MS avec la LC/MS mais également avec la GC/MS. L'intérêt est de démontrer que la SFC peut également avoir l'avantage d'éliminer les effets de matrices, ici pour l'analyse et la détection d'agents dopants dans une matrice complexe (urine) (Cf. Figure I-27). Les conclusions de ces travaux complètent également les observations concernant le gain en temps d'analyse et en sensibilité.

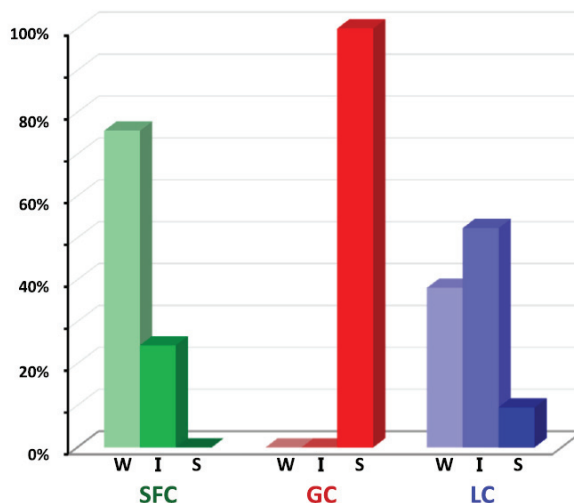


Figure I-27 : Mesure des effets de matrice en fonction de la technique analytique employée (W : 0% < effets < 20%, I : 20% < effets < 100%, S : effets < 100%) [110]

L'utilisation de la SFC/ESI-MS est donc régulièrement testée comme une alternative aux techniques LC/MS déjà existantes. Les différents auteurs s'accordent à dire que cette technique procure une alternative à la LC/MS. Un gain en temps d'analyse et en sensibilité est relevé dans toutes les études. Enfin, l'orthogonalité avec les méthodes LC/MS en fait une technique à considérer comme complémentaire et non de remplacement.

2.2 Couplages SFC/MS utilisant l'APCI

Si le couplage de la SFC avec l'ESI reste le plus courant dans la littérature, l'ouverture à de nouvelles applications pour la SFC voit arriver l'utilisation de la source APCI. L'une des motivations pour employer cette source provient du besoin en sensibilité. En effet, l'utilisation de l'ESI implique un split dû à l'ajout de make-up comme vu auparavant. Dans certains cas [99], ce split va diminuer la quantité de molécules d'intérêt en dessous de la limite de détection. La source APCI quant à elle permet de travailler à des débits élevés (de l'ordre de 1 à 2 mL/min) en accord avec les débits sortant de la SFC. Dans la plupart des cas, l'effluent SFC est récupéré à la sortie de la BPR et envoyé dans la source d'ionisation directement. Les utilisateurs gardent à ce moment toute la quantité d'analytes élués et les débits en entrée de source d'ionisation restent dans la gamme de travail de l'APCI.

L'étude de composés non polaires comme les lipides peut également motiver l'utilisation de l'APCI [101]. Les auteurs utilisent une configuration où l'ensemble du flux à la sortie du régulateur de pression est transféré vers la masse afin d'avoir un débit suffisant en entrée de source. Dans le cadre de cette étude, l'ajout d'un make up juste avant l'entrée de la source d'ionisation est aussi préconisée. Dans ce cas, l'objectif est d'apporter un dopant (NH₄OH ou AF par exemple [99,101,111,112]) pour favoriser l'ionisation. De plus, cet ajout de solvant est aussi décrit par les auteurs comme un stabilisateur lors de la formation du spray avant la décharge couronne. Comme pour l'ESI et les travaux de Guillaume et al., la place du make up a été investiguée et les conclusions démontrent que l'impact de l'emplacement est minime sur la réponse enregistrée par la MS.

La même configuration a été employée par Wolrab et al. [99] pour l'analyse d'acides aminés. Ici aussi l'impact d'additifs (NH₄OAc en négatif et NH₄FA en positif) dans le solvant de make up a pu être mis en avant. Les sels d'ammonium sont ici aussi les additifs procurant la meilleure sensibilité.

Enfin, les auteurs mettent également en avant le fait que l'APCI et l'ESI doivent être considérés comme deux modes complémentaires pour caractériser un maximum de composés.

3 Conclusions

Le couplage entre SFC et MS nécessite des adaptations et des optimisations à bien prendre en compte afin d'obtenir un signal exploitable par la suite. Il faut en priorité prendre en compte les spécificités de la phase mobile SFC. En effet, cette phase sous pression va subir une décompression en arrivant dans la source d'ionisation et entraîner plusieurs complications. Des risques de gel (phénomène endothermique) et de précipitation sont possibles lors du processus de transfert. Pour pallier à cela, l'ajout d'un solvant de « make-up » est préconisé par la majorité des auteurs. L'emplacement de ce make-up ainsi que la configuration du système (avec ou sans split) peut alors varier. Ces différentes configurations sont dépendantes, la plupart du temps, du type de SFC utilisé et du choix que le constructeur a fait. Dans notre cas, Waters fournit son appareillage avec un module de make-up fonctionnant avec un split. Il faudra donc prendre en compte cet aspect lors de la sélection du débit et de la nature du make-up. Pour contrer les effets dus au refroidissement du jet lors de la décompression, il faudra également prêter attention aux différentes températures dans le processus d'ionisation.

L'utilisation de l'ESI est plus largement répandue dans la littérature (comparé à l'APCI) car souvent utilisée en couplage avec la LC (ou LCxLC) pour les mêmes applications. L'emploi de l'APCI est souvent motivé par une impossibilité de travailler avec l'ESI. Entre ces deux sources, la différence majeure à prendre en compte est le débit auquel elles fonctionnent. Une fois de plus, l'importance du « make-up » et du split associé au module sera prépondérant.

Retraitement des données HRMS et MS/MS

Lorsque le couplage entre une méthode séparative et une détection par spectrométrie de masse haute résolution est réalisé, il en résulte un grand volume de données complexe à retraiter. Afin de valoriser au mieux ces données et d'en tirer un maximum d'informations, il est nécessaire de mettre en place une stratégie de retraitement que ce soit d'une part pour traiter les données HRMS et d'autre part pour exploiter les données de fragmentation.

1 Exploitation des données HRMS

L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution est motivée par le nombre de formules brutes possibles en fonction de la précision de l'appareillage. En effet, comme le montre la Figure I-28, plus la précision en masse est élevée et moins il y a de possibilités d'attribution pour un pic de masse. A noter que cette précision exprimée en ppm correspond au rapport entre l'écart en masse et la masse mesurée. L'impact ne sera donc pas le même selon la masse de la molécule. Le nombre de formules brutes possibles en fonction de la précision ne varie pas fortement pour une faible masse (300 Da par exemple) alors que ce nombre va largement augmenter pour des molécules plus grosses (1000 Da par exemple). Une faible erreur en masse permettra donc de limiter au maximum le nombre de formules brutes possibles et ainsi de gagner en précision lors de l'identification.

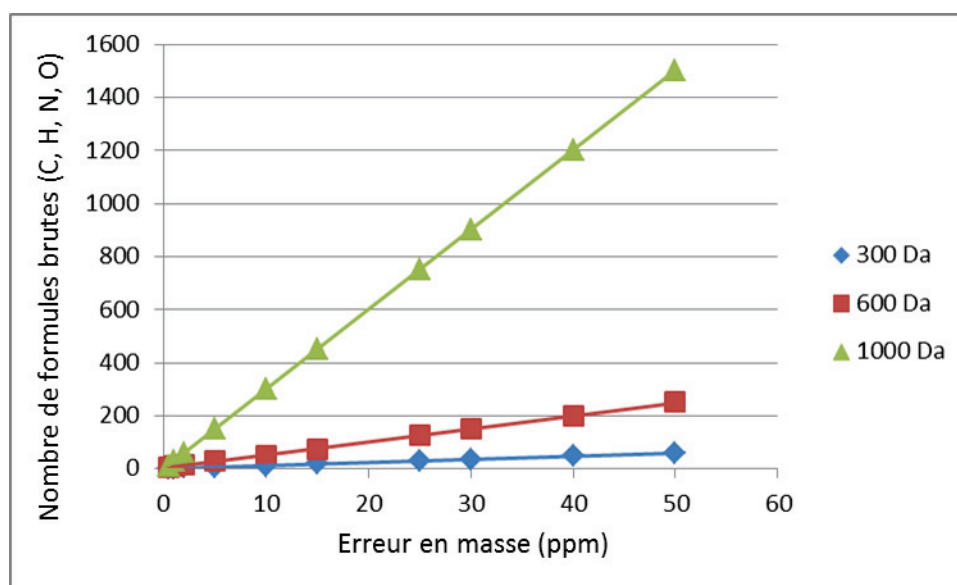


Figure I-28 : Evolution du nombre de formules brutes possibles en fonction de l'erreur en masse

Afin de proposer la combinaison linéaire d'éléments à attribuer à un pic de masse, plusieurs règles sont à prendre en compte et se trouvent listées par Kind *et al.* en 2007 [113]

- la restriction du nombre d'éléments lors de la recherche de formules brutes (utiliser les éléments probables et en nombre probable).
- l'utilisation des règles de valence, vérification de la distribution isotopique.

- la contrainte sur le rapport $H/C < 3$ (le ratio H/C est souvent compris entre 0.4 et 2), cette règle peut être étendue au rapport hétéro-éléments/ C .
- la limitation du nombre d'hétéro-éléments présents sur une molécule.
- la dernière règle porte sur la recherche d'adduits formés lors de l'ionisation (protonés ou sodiés)

Pour parvenir à ces formules brutes, plusieurs logiciels commerciaux et en accès libre sont disponibles. Ils intègrent ces règles de calculs et d'identification. On peut ainsi citer Formula Predictor de Shimadzu et Mass links de Waters qui sont des exemples de logiciels propres aux constructeurs. Cependant, le gros inconvénient de ce type de logiciels provient du fait qu'ils travaillent exclusivement avec des formats de données propres à l'appareil du constructeur. Il est alors compliqué de trouver un logiciel répondant à toutes les attentes d'un utilisateur. En parallèle de cela, plusieurs plateformes internet en libre accès ont vu le jour. Ainsi, XCMS et mzMine sont deux possibilités permettant de visualiser et d'identifier les composés présents dans les acquisitions de masse. Ils présentent l'avantage de gérer plusieurs formats de fichiers qui sont communs à la plupart des constructeurs (mzxml, mzdata, cdf). Ces solutions sont gratuites et participatives. Il est en effet possible de proposer des améliorations ou des correctifs via leur module de développement [114].

2 Méthodologie de retraitement pour les données MS/MS

Une fois l'attribution des formules brutes réalisée, il reste pour chaque composé élué et détecté des milliers de possibilités en termes de structures moléculaires. L'utilisation des spectres de fragmentation entre alors en jeu pour aider à l'identification de potentielles structures.

Il existe différents processus pour fragmenter un ion en spectrométrie de masse. La Figure I-29 illustre les deux voies de fragmentations possibles, soit par chauffage soit par excitation électronique. Lors d'une analyse en GC/MS, l'utilisation d'une source à ionisation électronique assure une fragmentation en source par un mécanisme non-ergodique et permet d'avoir des spectres de fragmentation reproductibles d'une analyse à une autre et d'un appareil à un autre si l'énergie d'ionisation est la même (70 eV usuellement). Dans le cas d'une excitation électronique les processus de fragmentation seront très rapides (10^{-16} s) et permettront d'avoir accès à des informations structurales fines. Lorsqu'on utilise des sources d'ionisation douces qui ne produisent que des ions moléculaires il faut utiliser des expériences MS/MS en fragmentant les molécules par collision avec un gaz neutre (CID) au sein du spectromètre de masse. Ce processus de fragmentation est ergodique, la fragmentation des ions se fait par une série de collision énergétique qui vont chauffer l'ion jusqu'à rompre des liaisons covalentes comme le montre la Figure I-29. Ces différentes étapes vont induire des spectres de fragmentation dépendant fortement des conditions dans lesquelles a lieu cette fragmentation (énergie, gaz de collision, géométrie de l'ion et de l'optique ionique ...). Cela réduira la similitude des spectres de fragmentation d'un appareil à un autre et impactera le retraitement des données.

Méthodes d'activation

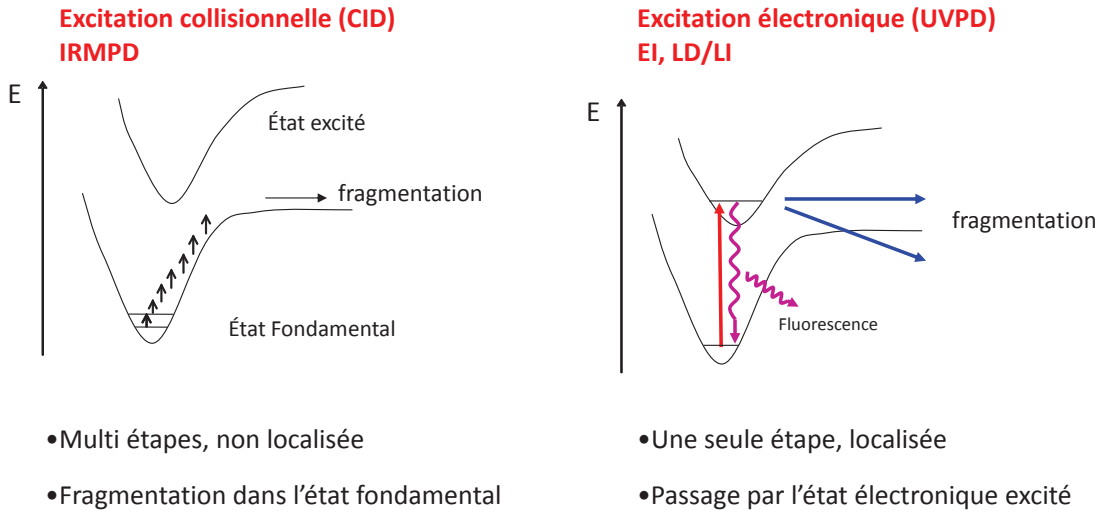


Figure I-29 : Comparaison entre fragmentation par CID et par EI, LD/LI

Afin d'interpréter les spectres de fragmentation obtenus et de déterminer la structure la plus plausible, il est nécessaire d'employer une interface qui mesure la similarité entre les données expérimentales et une référence. Il existe différents logiciels effectuant ce travail. Kind et al. à travers leur article de synthèse regroupent les différentes possibilités qui s'offrent à un utilisateur et les résumant dans le Tableau I-4.

Tableau I-4 : Liste des logiciels de comparaison en HRMS

#	Name	Operating system	Freely (+) or commercially (\$) available
1	NIST MS Search	Windows	+
2	NIST MS PepSearch	Windows	+
2	MS-DIAL	Windows	+
3	MSforID	Windows	\$
4	SMILEMS	Windows	\$
5	ACD/Spectrus	Windows	\$
6	MS PepSearch	Windows	+
7	Mass Frontier	Windows	\$
8	Mass++	Windows	+
9	Progenesis QI	Windows	\$
10	Refiner MS	All	\$
11	OpenMS	All	+
12	XCMS2	All	+

Ces différents logiciels prennent en compte la plupart des formats de fichiers. De plus, certains sont disponibles en « open source » afin que la communauté puisse contribuer à leur amélioration. A noter également que les différents constructeurs de spectromètres de masse proposent de plus en plus de logiciels permettant le retraitement des données MS/MS.

Chaque logiciel travaille à comparer les spectres de fragmentation acquis associés à la masse de l'ion fragmenté, avec les spectres présents dans une ou plusieurs bases de données et acquis expérimentalement sur molécules modèles. Ces bases de données multiplient les conditions d'énergie de fragmentation pour que l'ensemble couvre un champ assez large en termes de processus de fragmentation. De nombreuses bases de données de ce type sont disponibles en ligne. Kind et al. recensent les principales bases disponibles ainsi que le nombre de spectres et de molécules disponibles à l'intérieur de chacune. Le Tableau I-5 liste ces différentes bases de données. On remarque que le nombre de molécules disponibles est très variable. Cela provient du fait que certaines bases de données, tel que « Spektraris », se concentrent sur un type de composés particuliers, ici les métabolites des plantes. Les bases de données les plus fournies sont celles dédiées à l'analyse de lipides ou composés pharmaceutiques.

Tableau I-5 : Liste des principales bases de données disponibles et leurs caractéristiques.

#	Name	Number of MS/MS spectra	Number of compounds	Online search	Freely available	Instrument diversity	In silico
1	NIST14 MS/MS	193 120	9344	-	\$	+++	-
2	MassBank	22 000	2800	+	+	+++	-
3	METLIN	72 268	14 034	+	+/ \$	++	+/-
4	LipidBlast	212 516	119 200	-	+	++	+
5	MoNA	194 000	68 700	+	+	+++	+/-
6	mzCloud	182 000	2800	+	+	+	-
7	MetaboBASE	26 000	13 000	-	\$	+	-
8	GNPS	212 230	12 694	+	+	++	-
9	Spektraris	2626	487	+	+	+	-
10	ReSpect	9000	4000	+	+	+	-
11	MSforID	20 000	1200	-	\$	+	-
12	HMDB	5773	3729	+	+	++	+/-
13	MetaMS	150	150	+	+	+	-
14	Sumner Library	1734	289	-	+	+	-
15	ChemicalSoft	1619	6476	-	+/ \$	+	-
16	UNPD-ISDB	170 602	170 602	-	+	+	+
17	Designer drugs	10 000	750	-	\$	+	-
18	Drugs/poisons	10 000	6816	-	\$	+	-

Si cette approche est adaptée aux applications en métabolomique ou en protéomique (pour des molécules de grosses tailles dont la fragmentation est maîtrisée), elle peut rapidement montrer des limites notamment pour les composés de plus petites tailles comme ceux attendus dans les huiles de pyrolyse rapide où la fragmentation est moins systématique. Il sera donc plus compliqué de trouver une base de données regroupant les spectres des molécules ciblées enregistrés dans des conditions comparables.

Comme il est à l'heure actuelle difficile de disposer d'une base donnée exhaustive, une seconde approche complémentaire peut être utilisée. A partir de la formule brute du précurseur déterminée par

mesure HRMS, une première base de produits chimiques est interrogée (Chemspider par exemple) pour lister des structures cibles. Ensuite, des algorithmes vont simuler les spectres de fragmentation de ces structures et comparer ces données à celles obtenues expérimentalement. Il s'agit d'une approche dite *in silico*. Cette fragmentation *in silico* résulte soit du calcul de l'énergie de dissociation des liens (BDE) [115], soit de modèles statistiques de fragmentation basés sur un apprentissage. La fragmentation *in silico* peut être utilisée pour identifier et classer les spectres MS/MS inconnus en associant des fragments théoriques aux spectres MS/MS expérimentaux. Certaines bases utilisent une approche hybride qui correspond à une combinaison des deux approches décrites ci-dessus : base de données expérimentales combinée à la fragmentation *in silico* [116].

A chaque proposition de structure, un score est associé. Le calcul de ces scores est basé sur l'exactitude des spectres et leur similarité entre l'expérimental et l'attendu. Ainsi, il est possible de classer les différentes propositions de la plus probables à la moins probables. A noter qu'à l'heure actuelle ces outils fonctionnent pour les deux modes d'ionisation (+/-) avec des performances supérieures en mode d'ionisation positif. En effet, davantage de données sont disponibles dans la littérature en mode d'ionisation positif, ce qui conduit à des bases d'apprentissages plus conséquentes. En revanche, ces bases ne considèrent en général que les ions protonés ou déprotonés, les adduits ne sont pas considérés ce qui peut être un point limitant [117].

Dans le cadre de cette thèse, une attention particulière a été apportée à la plateforme internet MetFrag basée sur une approche hybride. Elle utilise donc une combinaison entre la fragmentation *in silico* basée sur l'énergie des liaisons et la bibliothèque de spectres de fragmentation MoNA [116]. Cette base de données (Mass Bank of North America) contient plus de 190 000 spectres de masse provenant à la fois des spectres générés par leurs propres expériences mais également de la mise en commun avec d'autres bases : Mass Bank et LipidBlast.

En conclusion, le traitement des données de fragmentation est actuellement en pleine expansion. Plusieurs équipes s'attachent à développer des protocoles afin de faciliter la compréhension de ces gros volumes de données. En fonction de l'appareillage et de l'application, l'utilisateur devra donc s'orienter vers le logiciel et la base de données les plus adaptés à son domaine d'application. Dans notre cas, aucune base de données ne semble assez exhaustive pour couvrir l'ensemble des molécules suspectées. L'approche *in silico* devra donc être prise en compte dans un premier temps tout en ayant conscience que cette approche reste encore en perpétuelle amélioration.

3 Conclusions

Le retraitement de données HRMS et MS/MS permet de parvenir à une identification structurale des différents composés détectés lors de l'analyse. Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires. En premier lieu, le retraitement des données HRMS passe par la détermination de la formule brute à l'aide de la mesure de masse précise. Plus la mesure est précise et moins le nombre de formules brutes est important. Pour trouver la meilleure combinaison d'éléments, plusieurs règles sont à respecter comme les rapports entre éléments, le respect des règles de valence, la présence de signaux isotopiques correspondants etc. Plusieurs logiciels commerciaux sont disponibles pour réaliser ce travail. Cependant, ils constituent des « boîtes noires » pour l'utilisateur sans la possibilité d'adapter les algorithmes à une application précise. De plus, leur dépendance aux extensions de fichiers propres à

chaque constructeur, limite grandement leur utilisation. Réaliser ce travail via une interface créée à façon pourrait permettre une plus grande adaptabilité aux problématiques rencontrées par l'utilisateur.

Pour valoriser les données MS/MS et parvenir à l'identification structurale de chaque précurseur fragmenté, l'utilisation de plateformes de comparaison sur internet semble la méthode la plus répandue. Il existe plusieurs plateformes permettant la comparaison avec certaines bases de données. La difficulté de cette méthodologie provient du fait que les spectres de fragmentation obtenus en CID sont dépendants des conditions et de l'appareillage utilisés pour l'acquisition. Cela entraîne une forte diversité de spectres de fragmentation pour une même molécule et la comparaison est donc à faire en prenant des précautions (conditions similaires essentiellement). Pour compléter les lacunes de cette approche, il est également possible d'effectuer une comparaison avec des spectres théoriques calculés *in silico*. Cette approche permet de compenser les lacunes des bases de données qui ne sont pas forcément adaptées aux types de molécules suspectées selon les matrices. La combinaison de ces deux types de comparaison semble la plus appropriée à la problématique d'analyse des huiles de pyrolyse rapide par SFC/MS.

Conclusions générales

L'utilisation des huiles de pyrolyse de biomasse semble une alternative aux énergies fossiles mais afin de pouvoir les valoriser correctement, il est indispensable de parvenir à caractériser ces matrices complexes. Actuellement, bien que de nombreuses études aient été menées sur le sujet, aucune caractérisation complète et détaillée de ces mélanges n'a pu être apportée. Pourtant plusieurs techniques analytiques puissantes ont déjà été investiguées mais ni la GCxGC ni la LCxLC ne sont encore parvenues à lever tous les verrous scientifiques liés à ces matrices. Ces techniques permettent d'obtenir des informations sur des fractions de ces huiles mais jamais une analyse de la matrice complète n'a pu être réalisée. La polarité, la thermolabilité ou bien la faible volatilité de certaines molécules constituent encore des verrous scientifiques d'actualité pour les huiles de pyrolyse rapide. La chromatographie en phase supercritique semble être une solution pertinente. Elle pourrait permettre de combiner les avantages de la chromatographie en phase gazeuse ainsi que ceux de la chromatographie en phase liquide.

Ce chapitre a permis de voir les possibilités offertes par cette technique analytique le plus souvent utilisée dans le domaine pharmaceutique. La SFC est une technique universelle dans le sens où toutes les combinaisons de phases mobiles et stationnaires peuvent être employées ainsi qu'une large gamme de détecteurs. Il n'y a que très peu de restrictions si l'on désire développer une méthode analytique basée sur une séparation à l'aide du CO₂ supercritique.

L'utilisation d'une classification des phases stationnaires et de leurs mécanismes de rétention semble le meilleur outil pour ne pas se disperser lors du choix des conditions opératoires. Les paramètres à optimiser sont nombreux pour parvenir à la caractérisation des produits ex-biomasse et une méthodologie rigoureuse devra donc être instaurée afin de parvenir à une caractérisation détaillée.

Une fois la séparation optimisée, la détection et l'utilisation de diverses sources d'informations semblent être nécessaires afin de couvrir une large gamme de possibilités et ainsi détecter un maximum de composés au sein de ces matrices. L'utilisation de la spectrométrie de masse HRMS et en tandem est nécessaire pour parvenir à une identification des composés. Afin d'ioniser et donc d'analyser un maximum de molécules, plusieurs sources d'ionisation sont envisageables.

Enfin, une fois les données acquises, une stratégie de retraitement adaptée est nécessaire pour valoriser ces données. Pour cela, divers logiciels de comparaison et de multiples bases de données sont disponibles sur internet. Les difficultés seront de trouver une base de données adaptée aux molécules recherchées et aux conditions opératoires choisies et optimisées car les spectres de fragmentation sont dépendants de ces derniers.

Références

- [1] D. Ballerini, Les biocarburants: état des lieux, perspectives et enjeux du développement, 2006.
- [2] A. Oasmaa, E. Kuoppala, S. Gust, Y. Solantausta, Fast Pyrolysis of Forestry Residue. 1. Effect of Extractives on Phase Separation of Pyrolysis Liquids, *Energy & Fuels* 17 (1) (2002) 1–12.
- [3] N. Charon, J. Ponthus, D. Espinat, F. Broust, G. Volle, J. Valette, D. Meier, Multi-technique characterization of fast pyrolysis oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 116 (2015) 18–26.
- [4] A. Oasmaa, D. Meier, Norms and standards for fast pyrolysis liquids, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 73 (2) (2005) 323–334.
- [5] A.V. Bridgwater, H. Hofbauer, S. van Loo, *Thermal Biomass Conversion*, 2009.
- [6] N.S. Tessarolo, R.V.S. Silva, G. Vanini, A. Casilli, V.L. Ximenes, F.L. Mendes, A. de Rezende Pinho, W. Romão, E.V.R. de Castro, C.R. Kaiser, D.A. Azevedo, Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques: 1 H NMR, GC × GC-TOFMS and FT-ICR MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 117 (2016) 257–267.
- [7] B. Scholze, C. Hanser, D. Meier, Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin), *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59 (2001) 387–400.
- [8] D.S. Argyropoulos, P NMR in wood chemistry: A review of recent progress, *Research on Chemical Intermediates* 21 (1995) 373–395.
- [9] M.M. Sanguineti, N. Hourani, M. Witt, S.M. Sarathy, L. Thomsen, N. Kuhnert, Analysis of impact of temperature and saltwater on *Nannochloropsis salina* bio-oil production by ultra high resolution APCI FT-ICR MS, *Algal Research* 9 (2015) 227–235.
- [10] I. Miettinen, M. Mäkinen, T. Vilppo, J. Jänis, Characterization of Phase-Separated Pine Wood Slow Pyrolysis Oil by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass, *Energy & Fuels* (2015).
- [11] J. Hertzog, V. Carré, Y. Le Brech, A. Dufour, F. Aubriet, Toward Controlled Ionization Conditions for ESI-FT-ICR-MS Analysis of Bio-Oils from Lignocellulosic Material, *Energy Fuels* 30 (7) (2016) 5729–5739.
- [12] J. Hertzog, V. Carré, Y. Le Brech, C.L. Mackay, A. Dufour, O. Mašek, F. Aubriet, Combination of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization and laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the investigation of complex mixtures - Application to the petroleomic analysis of bio-oils, *Analytica Chimica Acta* 969 (2017) 26–34.
- [13] H.-L. Yan, Z.-M. Zong, Z.-K. Li, X.-Y. Wei, Characterization of bio-oils from the alkanolyses of sweet sorghum stalk by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Fuel* 160 (2015) 596–604.
- [14] N.S. Tessarolo, R.V.S. Silva, G. Vanini, A. Casilli, V.L. Ximenes, F.L. Mendes, A. Rezende Pinho, W. Romão, E.V.R. Castro, C.R. Kaiser, D.A. Azevedo, Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques: 1 H NMR, GC × GC-TOFMS and FT-ICR MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 117 (2016) 257–267.
- [15] N.S. Tessarolo, R.C. Silva, G. Vanini, A. Pinho, W. Romão, E.V.R. Castro, D.A. Azevedo, Assessing the chemical composition of bio-oils using FT-ICR mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Microchemical Journal* 117 (2014) 68–76.
- [16] E.A. Smith, S. Park, A.T. Klein, Y.J. Lee, Bio-oil Analysis Using Negative Electrospray Ionization: Comparative Study of High-Resolution Mass Spectrometers and Phenolic versus Sugarcane Components, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3796–3802.
- [17] J.M. Jarvis, Am McKenna, R.N. Hilten, Characterization of pine pellet and peanut hull pyrolysis bio-oils by negative-ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Energy & ...* (2012).

- [18] J.M. Jarvis, A.M. McKenna, R.N. Hilten, K.C. Das, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Characterization of Pine Pellet and Peanut Hull Pyrolysis Bio-oils by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3810–3815.
- [19] J.M. Jarvis, D.S. Page-Dumroese, N.M. Anderson, Y. Corilo, R.P. Rodgers, Characterization of Fast Pyrolysis Products Generated from Several Western USA Woody Species, *Energy Fuels* 28 (10) (2014) 6438–6446.
- [20] I. Miettinen, M. Mäkinen, T. Vilppo, J. Jänis, Characterization of Phase-Separated Pine Wood Slow Pyrolysis Oil by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass, *Energy Fuels* (2015).
- [21] N. Sudasinghe, J.R. Cort, R. Hallen, M. Olarte, A. Schmidt, T. Schaub, Hydrothermal liquefaction oil and hydrotreated product from pine feedstock characterized by heteronuclear two-dimensional NMR spectroscopy and FT-ICR mass spectrometry, *Fuel* 137 (2014) 60–69.
- [22] D.J. McClelland, A.H. Motagamwala, Y. Li, M.R. Rover, A.M. Wittrig, C. Wu, J.S. Buchanan, R.C. Brown, J. Ralph, J.A. Dumesic, G.W. Huber, Functionality and molecular weight distribution of red oak lignin before and after pyrolysis and hydrogenation, *Green Chem* 19 (5) (2017) 1378–1389.
- [23] J.M. Jarvis, A.M. McKenna, R.N. Hilten, K.C. Das, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Characterization of Pine Pellet and Peanut Hull Pyrolysis Bio-oils by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3810–3815.
- [24] J.M. Jarvis, D.S. Page-Dumroese, N.M. Anderson, Y. Corilo, R.P. Rodgers, Characterization of Fast Pyrolysis Products Generated from Several Western USA Woody Species, *Energy & Fuels* 28 (10) (2014) 6438–6446.
- [25] T. Kekäläinen, T. Venäläinen, J. Jänis, Characterization of Birch Wood Pyrolysis Oils by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: Insights into Thermochemical Conversion, *Energy Fuels* 28 (7) (2014) 4596–4602.
- [26] P.V. Abdelnur, B.G. Vaz, J.D. Rocha, de Almeida, Marlon B. B., Teixeira, Marco Antonio G., Pereira, Rosana C. L., Characterization of Bio-oils from Different Pyrolysis Process Steps and Biomass Using High-Resolution Mass Spectrometry, *Energy & Fuels* 27 (11) (2013) 6646–6654.
- [27] D.P. Cole, E.A. Smith, D. Dalluge, D.M. Wilson, E.A. Heaton, R.C. Brown, Y.J. Lee, Molecular characterization of nitrogen-containing species in switchgrass bio-oils at various harvest times, *Fuel* 111 (2013) 718–726.
- [28] M. Stas, D. Kubic, J. Chudoba, M. Pospíš, Overview of Analytical Methods Used for Chemical Characterization of Pyrolysis Bio-oil, *Energy & Fuels* (28) (2014) 385–402.
- [29] C. Michailof, T. Sfetsas, S. Stefanidis, K. Kalogiannis, G. Theodoridis, A. Lappas, Quantitative and qualitative analysis of hemicellulose, cellulose and lignin bio-oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1369 (2014) 147–160.
- [30] L. Negahdar, A. Gonzalez-Quiroga, D. Otyuskaya, H.E. Toraman, L. Liu, Jastrzebski, Johann T B H, K.M. van Geem, G.B. Marin, J.W. Thybaut, B.M. Weckhuysen, Characterization and Comparison of Fast Pyrolysis Bio-oils from Pinewood, Rapeseed Cake, and Wheat Straw Using ¹³C NMR and Comprehensive GC × GC, *ACS sustainable chemistry & engineering* 4 (9) (2016) 4974–4985.
- [31] M.R. Djokic, T. Dijkmans, G. Yildiz, W. Prins, K.M. van Geem, Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography, *Journal of chromatography. A* 1257 (2012) 131–140.
- [32] K. Sipilä, E. Kuoppala, L. Fagernäs, A. Oasmaa, Characterization of biomass-based flash pyrolysis oils, *Biomass and Bioenergy* 14 (2) (1998) 103–113.
- [33] J.H. Marsman, J. Wildschut, F. Mahfud, H.J. Heeres, Identification of components in fast pyrolysis oil and upgraded products by comprehensive two-dimensional gas chromatography and flame ionisation detection, *Journal of chromatography. A* 1150 (1-2) (2007) 21–27.
- [34] F. Bertoncini, E. Durand, N. Charon, D. Espinat, A. Quignard (Eds.), *Distillation and multidimensional GC analysis of a biomass pyrolysis oil*, American Chemical Society, 2006.

- [35] J.-Y. de Saint Laumer, E. Cicchetti, P. Merle, J. Egger, A. Chaintreau, Quantification in Gas Chromatography: Prediction of Flame Ionization Detector Response Factors from Combustion Enthalpies and Molecular Structures, *Analytical Chemistry* 82 (15) (2010) 6457–6462.
- [36] M.R. Djokic, T. Dijkmans, G. Yildiz, W. Prins, K.M. van Geem, Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography, *Journal of chromatography. A* 1257 (2012) 131–140.
- [37] A. Fullana, J.A. Contreras, R.C. Striebich, S.S. Sidhu, Multidimensional GC/MS analysis of pyrolytic oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74 (1-2) (2005) 315–326.
- [38] N. Charon, J. Ponthus, D. Espinat, F. Broust, G. Volle, J. Valette, D. Meier, Multi-technique characterization of fast pyrolysis oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 116 (2015) 18–26.
- [39] M. Garcia-Perez, A. Chaala, H. Pakdel, D. Kretschmer, C. Roy, Characterization of bio-oils in chemical families, *Biomass and Bioenergy* 31 (4) (2007) 222–242.
- [40] M. Staš, J. Chudoba, D. Kubička, J. Blažek, M. Pospíšil, Petroleomic characterization of pyrolysis bio-oils: a review, *Energy Fuel* 31 (10) (2017) 10283–10299.
- [41] C. Tessini, N. Müller, C. Mardones, D. Meier, A. Berg, D. Baer, Chromatographic approaches for determination of low-molecular mass aldehydes in bio-oil, *Journal of chromatography. A* 1219 (2012) 154–160.
- [42] E.D. Christensen, G.M. Chupka, J. Luecke, T. Smurthwaite, T.L. Alleman, K. Iisa, J.A. Franz, D.C. Elliott, R.L. McCormick, Analysis of Oxygenated Compounds in Hydrotreated Biomass Fast Pyrolysis Oil Distillate Fractions, *Energy Fuels* 25 (11) (2011) 5462–5471.
- [43] P.A. Johnston, R.C. Brown, Quantitation of sugar content in pyrolysis liquids after acid hydrolysis using high-performance liquid chromatography without neutralization, *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (32) (2014) 8129–8133.
- [44] D.L. Dalluge, T. Daugaard, P. Johnston, N. Kuzhiyil, M.M. Wright, R.C. Brown, Continuous production of sugars from pyrolysis of acid-infused lignocellulosic biomass, *Green Chem* 16 (9) (2014) 4144–4155.
- [45] D. Tomasini, F. Cacciola, F. Rigano, D. Sciarrone, P. Donato, M. Beccaria, E.B. Caramão, P. Dugo, L. Mondello, Complementary Analytical Liquid Chromatography Methods for the Characterization of Aqueous Phase from Pyrolysis of Lignocellulosic Biomasses, *Anal. Chem.* 86 (22) (2014) 11255–11262.
- [46] A. Le Masle, D. Angot, C. Guoin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of chromatography. A* 1340 (2014) 90–98.
- [47] M. Sarrut, A. Corgier, G. Crétier, A. Le Masle, S. Dubant, S. Heinisch, Potential and limitations of on-line comprehensive reversed phase liquid chromatography×supercritical fluid chromatography for the separation of neutral compounds: An approach to separate an aqueous extract of bio-oil, *Journal of chromatography. A* 1402 (2015) 124–133.
- [48] A. Le Masle, D. Angot, C. Guoin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of chromatography. A* 1340 (2014) 90–98.
- [49] A.W. Francis, Ternary Systems of Liquid Carbon Dioxide, *J. Phys. Chem.* 58 (12) (1954) 1099–1114.
- [50] G. Guiochon, A. Tarafder, Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1218 (8) (2011).
- [51] E. Lesellier, C. West, The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review, *Journal of Chromatography A* 1382 (2015) 2–46.
- [52] M. Saito, History of supercritical fluid chromatography: instrumental development, *Journal of bioscience and bioengineering* 115 (6) (2013) 590–599.
- [53] A. Tarafder, K. Kaczmarek, D.P. Poe, G. Guiochon, Use of the isopycnic plots in designing operations of supercritical fluid chromatography. V. Pressure and density drops using mixtures of carbon dioxide and methanol as the mobile phase, *Journal of chromatography. A* 1258 (2012) 136–151.

- [54] G.O. Cantrell, R.W. Stringham, J.A. Blackwell, J.D. Weckwerth, P.W. Carr, Effect of Various Modifiers on Selectivity in Packed-Column Subcritical and Supercritical Fluid Chromatography, *Analytical Chemistry* 68 (20) (1996) 3645–3650.
- [55] C. West, Enantioselective Separations with Supercritical Fluids - Review (2014) 99–120.
- [56] E. Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, *Journal of Chromatography A* 1216 (10) (2009) 1881–1890.
- [57] E. Lesellier, Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases, *Journal of Separation Science* 31 (8) (2008) 1238–1251.
- [58] M.H. Abraham, Scales of solute hydrogen-bonding: Their construction and application to physicochemical and biochemical processes, *Chemical Society Reviews* 22 (2) (1993) 73–83.
- [59] C.F. Poole, S.K. Poole, Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, *Journal of Chromatography A* 965 (1–2) (2002) 263–299.
- [60] M.H. Abraham, J.C. McGowan, The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography, *Chromatographia* 23 (1987) 243–246.
- [61] C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model. I. Alkylsiloxane-bonded stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1110 (1-2) (2006) 181–190.
- [62] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model IV. Aromatic stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1115 (1-2) (2006) 233–245.
- [63] C. West, E. Lesellier, A. Tchaplal, Retention characteristics of porous graphitic carbon in subcritical fluid chromatography with carbon dioxide–methanol mobile phases, *Journal of Chromatography A* 1048 (1) (2004) 99–109.
- [64] C. West, E. Lesellier, Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon, *Journal of Chromatography A* 1087 (1-2) (2005) 64–76.
- [65] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model. III. Polar stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1110 (1-2) (2006) 200–213.
- [66] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1191 (1-2) (2008) 21–39.
- [67] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1319 (2013) 148–159.
- [68] V. Desfontaine, A. Tarafder, J. Hill, J. Fairchild, A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, A systematic investigation of sample diluents in modern supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1511 (2017) 122–131.
- [69] M. Sun, G. Lidén, M. Sandahl, C. Turner, Ultra-high performance supercritical fluid chromatography of lignin-derived phenols from alkaline cupric oxide oxidation, *Journal of Separation Science* 39 (16) (2016) 3123–3129.
- [70] W. Wu, Y. Zhang, H. Wu, W. Zhou, Y. Cheng, H. Li, C. Zhang, L. Li, Y. Huang, F. Zhang, Simple, rapid, and environmentally friendly method for the separation of isoflavones using ultra-high performance supercritical fluid chromatography, *Journal of Separation Science* 40 (13) (2017) 2827–2837.
- [71] V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 113 (2015) 56–71.
- [72] D. Åsberg, M. Enmark, J. Samuelsson, T. Fornstedt, Evaluation of co-solvent fraction, pressure and temperature effects in analytical and preparative supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1374 (2014) 254–260.
- [73] C. West, J. Melin, H. Ansouri, M. Mengue Metogo, Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase, *Journal of chromatography. A* 1492 (2017) 136–143.
- [74] J.T.B. Strode III, L.T. Taylor, Optimization of electron-capture detector when using packed-column supercritical fluid chromatography with modified carbon dioxide, *Journal of Chromatography A* 723 (2) (1996) 361–369.

- [75] H. Shi, L.T. Taylor, E.M. Fujinari, Chemiluminescence nitrogen detection for packed-column supercritical fluid chromatography with methanol modified carbon dioxide, *Journal of Chromatography A* 757 (1–2) (1997) 183–191.
- [76] H. Shi, L.T. Taylor, E.M. Fujinari, X. Yan, Sulfur-selective chemiluminescence detection with packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 779 (1–2) (1997) 307–313.
- [77] S. Shah, M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor, Analysis of triazine and triazole herbicides by gradient-elution supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 505 (1) (1990) 293–298.
- [78] M. Lecoer, N. Simon, V. Sautou, B. Decaudin, C. Vaccher, A chemometric approach to elucidate the parameter impact in the hyphenation of evaporative light scattering detector to supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1333 (2014) 124–133.
- [79] Mathews, B. T., Higginson, P. D., R. Lyons, Mitchell, J. C., Sach, N. W., Snowden, M. J., Taylor, M. R., Wright, a. G., Improving Quantitative Measurements for the Evaporative Light Scattering Detector, *Chromatographia* 60 (11-12) (2004) 625–633.
- [80] A. Villiers, T. Górecki, F. Lynen, R. Szucs, P. Sandra, Improving the universal response of evaporative light scattering detection by mobile phase compensation, *Journal of chromatography. A* 1161 (1-2) (2007) 183–191.
- [81] E Lesellier, A. Valarché, C. West, M. Dreux, Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1250 (2012) 220–226.
- [82] M. Garzotti, M. Hamdan, Supercritical fluid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry: a powerful tool for the analysis of chiral mixtures, *Journal of Chromatography B* 770 (1-2) (2002) 53–61.
- [83] J.A. Syage, L.C. Short, S.-S. Cai, Atmospheric pressure photoionization - The second source for LC-MS?, *LC GC NORTH AMERICA* 26 (3) (2008) 286+.
- [84] P. Dubreuil, Introduction à la chromatographie, <http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma4.html>.
- [85] A. Patrick, Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III, *Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives base docum (ref. article p1492)* (2009).
- [86] I. Marchi, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review, *Talanta* 78 (1) (2009) 1–18.
- [87] J.R. Yates, C.I. Ruse, A. Nakorchevsky, Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications, *Annual Review of Biomedical Engineering* 11 (1) (2009) 49–79.
- [88] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, *Analytical Chemistry* 78 (7) (2006) 2113–2120.
- [89] M. Nappi, C. Weil, C.D. Cleven, L.A. Horn, H. Wollnik, R.G. Cooks, Visual representations of simulated three-dimensional ion trajectories in an ion trap mass spectrometer, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 161 (1-3) (1997) 77–85.
- [90] F. Sadoun, H. Virelizier, P.J. Arpino, Packed-column supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 647 (2) (1993) 351–359.
- [91] Y. Hsieh, L. Favreau, K.-C. Cheng, J. Chen, Chiral supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of pindolol and propranolol in metabolic stability samples, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (21) (2005) 3037–3041.
- [92] Y. Hsieh, L. Favreau, J. Schwerdt, K.-C. Cheng, Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometric method for analysis of pharmaceutical compounds in metabolic stability samples, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 40 (3) (2006) 799–804.
- [93] K. Yamaguchi, Cold-spray ionization mass spectrometry: Principle and applications, *Journal of mass spectrometry JMS* 38 (5) (2003) 473–490.
- [94] M.C. Ventura, W.P. Farrell, C.M. Aurigemma, M.J. Greig, Packed Column Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry for High-Throughput Analysis. Part 2, *Anal. Chem.* 71 (19) (1999) 4223–4231.

- [95] G. Lavison-Bompard, D. Thiébaud, J.-F. Beziau, B. Carrazé, P. Valette, X. Duteurtre, J.-C. Tabet, Hyphenation of atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry to supercritical fluid chromatography for polar car lubricant additives analysis, *Journal of chromatography. A* 1216 (5) (2009) 837–844.
- [96] J.F. Anacleto, L. Ramaley, R.K. Boyd, S. Pleasance, M.A. Quilliam, P.G. Sim, F.M. Benoit, Analysis of polycyclic aromatic compounds by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry using atmospheric-pressure chemical ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5 (4) (1991) 149–155.
- [97] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: from hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds, *Journal of chromatography. A* 1339 (2014) 174–184.
- [98] Y. Fujito, Y. Hayakawa, Y. Izumi, T. Bamba, Importance of optimizing chromatographic conditions and mass spectrometric parameters for supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1508 (2017) 138–147.
- [99] D. Wolrab, P. Frühauf, C. Gerner, Direct coupling of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids and related compounds: Comparing electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization, *Analytica Chimica Acta* 981 (2017) 106–115.
- [100] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.-F. Tranchant, É. Lesellier, Contribution of Supercritical Fluid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry and UV detections for the analysis of a complex vegetable oil – Application for characterization of a *Kniphofia uvaria* extract, *Comptes Rendus Chimie* 19 (9) (2016) 1113–1123.
- [101] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.-F. Tranchant, E. Lesellier, Hyphenation of ultra high performance supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation high resolution mass spectrometry: Part I. Study of the coupling parameters for the analysis of natural non-polar compounds, *Journal of chromatography. A* 1509 (2017) 132–140.
- [102] F. Jumaah, S. Larsson, S. Essén, L.P. Cunico, C. Holm, C. Turner, M. Sandahl, A rapid method for the separation of vitamin D and its metabolites by ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1440 (2016) 191–200.
- [103] E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, E. Lesellier, C. West, Comparison of ultra-high performance methods in liquid and supercritical fluid chromatography coupled to electrospray ionization - mass spectrometry for impurity profiling of drug candidates, *Journal of chromatography. A* 1472 (2016) 117–128.
- [104] F. Lei, C. Li, S. Zhou, D. Wang, Y. Zhao, Y. Wu, Hyphenation of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for fast determination of four aflatoxins in edible oil, *Rapid communications in mass spectrometry RCM* 30 Suppl 1 (2016) 122–127.
- [105] N.O. Pretorius, C.M. Willemse, A. Villiers, H. Pasch, Combined size exclusion chromatography, supercritical fluid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of complex aliphatic polyesters, *Journal of chromatography. A* 1330 (2014) 74–81.
- [106] A. Sen, C. Knappy, M.R. Lewis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, N.W. Smith, Analysis of polar urinary metabolites for metabolic phenotyping using supercritical fluid chromatography and mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1449 (2016) 141–155.
- [107] R. Berkecz, M. Lísa, M. Holčápek, Analysis of oxylipins in human plasma: Comparison of ultrahigh-performance liquid chromatography and ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1511 (2017) 107–121.
- [108] M. Méjean, A. Brunelle, D. Touboul, Quantification of tocopherols and tocotrienols in soybean oil by supercritical-fluid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry* 407 (17) (2015) 5133–5142.
- [109] V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková, Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography

- mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum, *Analytica Chimica Acta* 934 (2016) 252–265.
- [110] V. Desfontaine, L. Nováková, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Liquid chromatography and supercritical fluid chromatography as alternative techniques to gas chromatography for the rapid screening of anabolic agents in urine, *Journal of chromatography. A* 1451 (2016) 145–155.
- [111] D. Giuffrida, M. Zoccali, S.V. Giofrè, P. Dugo, L. Mondello, Apocarotenoids determination in *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero, by supercritical fluid chromatography-triple-quadrupole/mass spectrometry, *Food chemistry* 231 (2017) 316–323.
- [112] Y. Cho, M.-H. Choi, B. Kim, S. Kim, Supercritical fluid chromatography coupled with in-source atmospheric pressure ionization hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for compound speciation, *Journal of chromatography. A* 1444 (2016) 123–128.
- [113] T. Kind, O. Fiehn, Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC bioinformatics* 8 (2007) 105.
- [114] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Oresic, MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC bioinformatics* 11 (2010) 395.
- [115] S. Wolf, S. Schmidt, M. Müller-Hannemann, S. Neumann, In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra, *BMC bioinformatics* 11 (2010) 148.
- [116] C. Ruttkies, E.L. Schymanski, S. Wolf, J. Hollender, S. Neumann, MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation, *Journal of cheminformatics* 8 (2016) 3.
- [117] CASMI contest.

Annexe 1: Principe des différents organes d'un spectromètre de masse

Les sources d'ionisation:

Les sources d'ionisation peuvent être classées en plusieurs catégories. Le premier groupe composé de sources d'ionisation fonctionnant à pression réduite (ionisation électronique (EI), ionisation chimique (CI) par exemple). Ce type d'ionisation est habituellement employé pour les molécules volatiles et thermiquement résistantes et en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. En ionisation électronique un faisceau d'électrons énergétique (70eV) va bombarder l'échantillon avec la formation de cations radicalaires et d'ions fragments. Le spectre de masse obtenu permet d'avoir des informations structurales sur la molécule analysée soit en utilisant des bases de données soit en utilisant les règles de fragmentations. En ionisation chimique (CI) un gaz réactif (ionisé par EI) est utilisé pour créer des ions protonés ($[M+H]^+$) par échange de protons ou des adduits $[M+GH]^+$. En fonction de l'affinité protonique du gaz employé (ammoniac, isobutane, méthane, hydrogène,...) et de l'analyte, on aura accès soit à des fragments de la molécule à analyser soit à l'ion moléculaire soit à un mélange des deux. De plus ces sources d'ionisation fonctionnent à pression réduite et ne tolèrent pas des débits de solvants trop importants. Le fait que la phase mobile SFC soit sous pression (au-delà de 100 bars) et avec un débit d'environ 1 mL/min sera un obstacle à utiliser ces sources.

Dans le cas de couplages avec la LC classique ou pour l'analyse de composés polaires, thermiquement fragiles ou bien peu volatils, d'autres types d'ionisation seront préférés. Ainsi, les sources travaillant à pression atmosphérique sont à privilégier lors des couplages avec la chromatographie en phase liquide et donc par conséquent adaptables aux spécificités de la SFC. Les sources à pression atmosphérique les plus répandues sont l'ESI (« ElectroSpray Ionization »), l'APCI (« Atmospheric Pressure Chemical Ionization ») et l'APPI (« Atmospheric Pressure PhotoIonization »). Ces trois sources d'ionisation à pression atmosphérique se distinguent par leur mode de fonctionnement et la gamme de produits qu'elles seront capables d'ioniser. (Figure I-30).

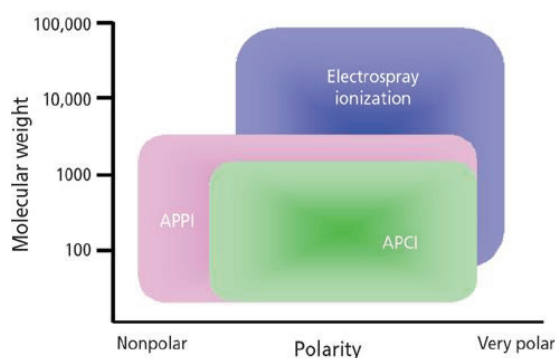


Figure I-30 : Zone de masses moléculaires et de polarités optimales pour l'utilisation de chacune des trois sources à pression atmosphérique [83]

Dans la source ESI, l'échantillon est infusé et introduit via un capillaire métallique sur lequel un potentiel est appliqué (Figure I-31). En sortie de ce capillaire, un spray est formé à l'aide d'un gaz de nébulisation (généralement de l'azote). Les gouttelettes formées rencontrent un flux d'azote chaud à contre-courant qui conduit à l'évaporation progressive du solvant. Le premier effet en est la diminution de la taille de la gouttelette ainsi que, corrélativement, l'augmentation de la densité de charges au sein de ces gouttelettes. Lorsque la répulsion coulombienne excède la tension superficielle de la gouttelette (limite de Rayleigh), celle-ci explose en formant des gouttelettes de seconde génération, beaucoup plus petites. Après plusieurs étapes successives d'évaporation et d'explosion coulombienne on obtient des ions désolvatés en phase gazeuse. Cela se traduit par la production d'ions en phase gazeuse, physiquement intacts et pouvant porter plusieurs charges en raison de l'attachement de protons aux sites basiques des molécules (dans le cas du mode positif).

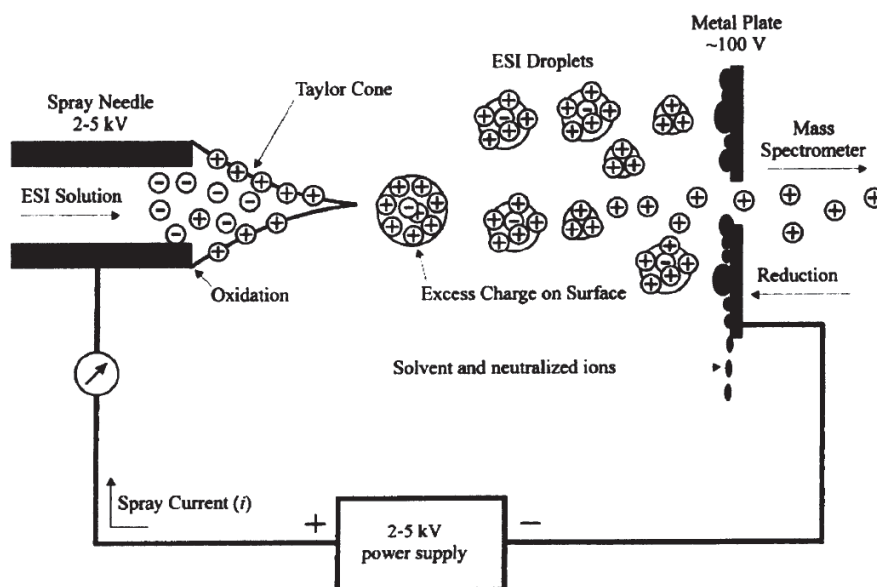


Figure I-31 : Schéma de principe d'une source d'ionisation ESI [84]

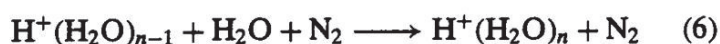
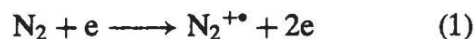
Les molécules sont généralement détectées sous la forme d'ions moléculaires mono chargés ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$), multichargés ($[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$) ou sous la forme d'adduits tels que des adduits sodium ou potassium ($[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$) pour le mode positif ou des adduits chlorés ($[M+Cl]^-$ ou $[M+EtO]^-$) en mode négatif. L'ionisation en mode + ou - est régie par l'acido-basicité de l'analyte, les composés basiques répondront mieux en ESI+ et les acides et neutres en ESI-. On privilégiera cette source pour les molécules de hautes masses moléculaires et avec un caractère polaire prononcé.

La source APCI utilise un nébuliseur pneumatique à azote pour former un aérosol à l'intérieur d'une chambre (le vaporiseur) chauffée à des températures élevées (entre 350 °C et 500 °C) (Figure I-32). Dans le vaporiseur, l'effluent de la colonne de chromatographie (solvants + analytes) ou le soluté analysé par infusion est chauffé et se mélange avec le gaz nébuliseur (ou gaz de transport) pour conduire les analytes vers l'électrode à décharge couronne constituée d'une aiguille et la chambre de nébulisation (volume de la source) qui sert de contre-électrode.

Dans cette zone, la différence de potentiel élevée (entre ± 3 et ± 6 kV) appliquée sur cette aiguille, provoque une décharge couronne (décharge électrique lumineuse) de $\sim 2-3$ μA . Cette décharge

est une source constante d'électrons pour le processus d'ionisation en APCI : elle ionise l'air ambiant et crée un plasma (*i.e.* pseudo équilibre entre espèces neutres, ionisées et électrons, autour de la pointe de l'aiguille).

Le flux d'azote lors de son passage à proximité de la décharge couronne va former un plasma constitué d'azote neutre, d'électrons et d'azote sous forme de cations radicalaires (N_2^+). Ces derniers vont réagir avec le solvant d'élution ou make up protique (H_2O , $MeOH$,...) pour donner des espèces protonées. Ces espèces seront l'espèce réactive qui pourra transférer son proton à l'analyte. Ces réactions chimiques donnent lieu à l'ionisation des molécules d'analytes comme suit :



En fonction du potentiel appliqué sur l'aiguille (positif ou négatif), les réactions chimiques induites ne donneront pas accès aux mêmes ions moléculaires. En mode positif, les ions radicalaires du plasma vont fournir un H à l'analyte et on formera alors des ions de type $[M+H]^+$. En mode négatif, les ions du solvant vont arracher un H de la molécule de soluté et on obtiendra des ions du type $[M-H]^-$

Cette source est généralement utilisée pour la détection de composés moins polaires que ceux détectables en ESI et donc un peu plus difficilement protonables. Cependant la méthode d'ionisation est moins douce que l'ESI car les molécules thermolabiles peuvent être affectées par le chauffage. De plus, le processus d'échange de charge peut mener à une fragmentation des ions pseudo-moléculaires.

Du fait du système de chauffage de la source permettant la volatilisation de l'effluent, il est possible d'utiliser la source APCI à des débits plus élevés que l'ESI (allant jusqu'à 2 mL/min).

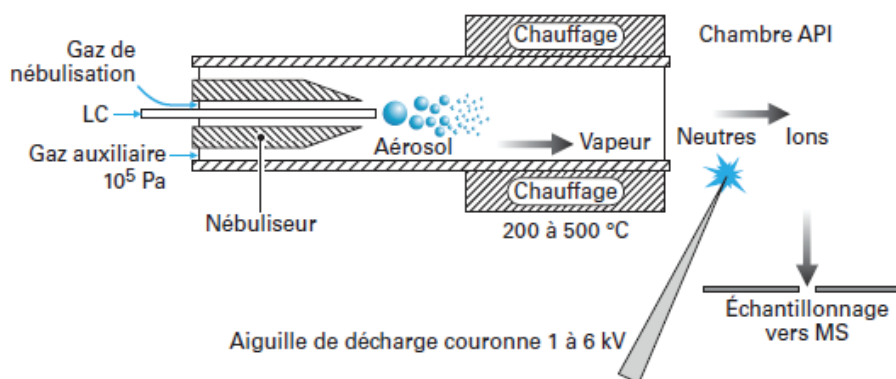


Figure I-32 : Schéma de principe d'une source d'ionisation APCI [85]

Enfin, la source APPI utilise le même système de nébulisation que l'APCI, la différence entre ces deux sources d'ionisation provient de comment l'énergie est apportée afin d'ioniser les analytes. Si dans le cas de l'APCI, les électrons sont produits en continu par la décharge couronne et le plasma qui en résulte, dans le cas de l'APPI, une lampe UV émettrice de photons est utilisée afin de déclencher le processus de photo-ionisation. Si la géométrie de source est la même entre les deux, l'APPI aura un fonctionnement optimale pour un débit de phase liquide beaucoup moins important (50 µL/min contre 1mL/min pour l'APCI) [86]. Bien que l'APPI couvre plus de possibilité en comparaison à l'APCI (cf. Figure I-30), la sensibilité moindre et la présence d'ions moléculaires de type M^+ et $[M+H]^+$ compliquent le spectre de masse obtenu. De plus, il faut que les molécules absorbent les photons UV pour être ionisées. Ainsi, il n'est pas possible d'observer toutes les espèces chimiques. En employant ESI et APCI en mode négatif et positif, une large gamme de masse molaire et de polarité sera couverte par nos expériences.

Les analyseurs

Une fois les analytes ionisés au sein de la source, un second module est nécessaire afin de parvenir à mesurer le rapport masse sur charge de ces derniers : c'est l'analyseur. Tout comme les sources d'ionisation, il en existe plusieurs types avec leurs caractéristiques et leurs avantages propres. Les analyseurs se distinguent par leurs grandeurs caractéristiques comme la possibilité de faire de la fragmentation, la sensibilité, la résolution, le temps de scan et la gamme dynamique. Le Tableau I-6 donne les performances et caractéristiques de certains de ces analyseurs. Dans le contexte de cette thèse, la spectrométrie de masse a pour but premier de donner à la fois des informations précises en termes de masse moléculaire mais également des renseignements sur la structure des différents analytes détectés. Pour cette raison, nous nous focaliserons dans ce chapitre sur les analyseurs offrant la possibilité de fragmenter, à savoir : FT-ICR/MS, IT, ToF, triple-Quadripôle et Orbitrap.

Tableau I-6 : Performances des principaux analyseurs en MS [87]

Analyseur	Résolution	Précision sur la mesure de masse (ppm)	Sensibilité	Gamme dynamique	Vitesse de scan
LIT (Linear Ion Trap) ou LTQ (Linear Trap Quadrupole)	2000	100	Femtomole	10^4	Rapide
Triple Quadrupole (TQ)	2000	100	Attomole	10^6	Rapide
LTQ-Orbitrap	100 000	2	Femtomole	10^4	Lente
LTQ-FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), Q-FTICR	500 000 - 1 000 000	<2	Femtomole	10^4	Lente
Q-ToF (Time of Flight), IT-ToF	10 000 - 60 000	2-5	Attomole	10^6	Rapide
Q-LIT	2000	100	Attomole	10^6	Modérée

- FT-ICR/MS :

L'analyseur FT-ICR/MS permet par mesure de la fréquence de résonance cyclotronique de mesurer le rapport m/z d'ions. Les ions sont transférés dans la cellule ICR (Ion cyclotron resonance) via un train d'optiques ioniques composé de multi pôles. Il est possible d'avoir un quadripôle ou un piège ionique linéaire en amont. La cellule ICR baigne dans un champ magnétique produit par un aimant supraconducteur de 7 à 21 T pour les instruments modernes. La cellule ICR est composée de quatre électrodes comme montré sur la Figure I-33. Deux pour exciter le paquet d'ions et lui donner un mouvement cohérent et deux utilisées pour la détection du courant induit par le passage des ions. La fréquence de rotation cyclotronique mesurée pour une population d'ions est une somme de signaux sinusoïdaux appelé transient il est possible d'avoir le spectre de fréquences en appliquant une transformé de Fourier. Connaissant le champ magnétique il est alors possible d'obtenir le spectre de masse ($f = \frac{qB}{2\pi m}$). Cette technique permet d'atteindre des résolutions élevées de l'ordre de 100 à 1000 k et une précision en masse de l'ordre du ppm.

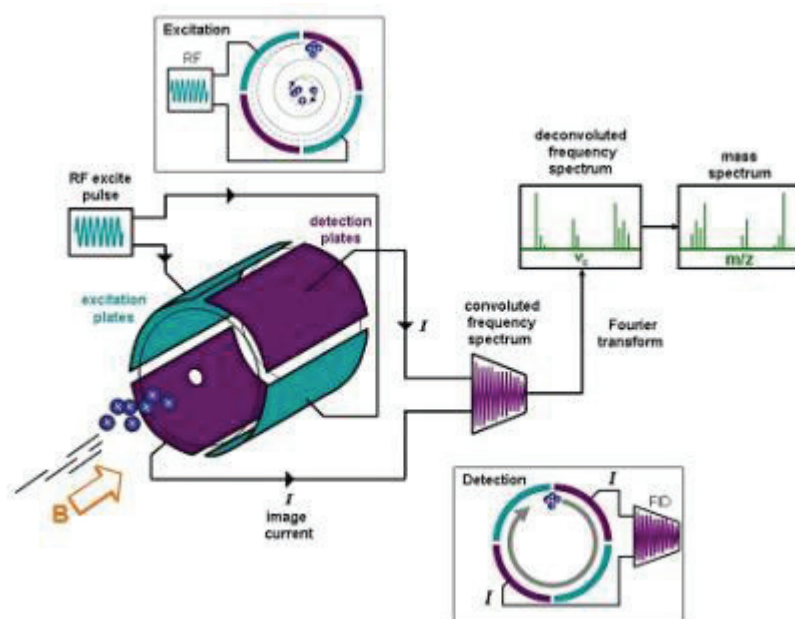


Figure I-33 : Principe d'une cellule ICR

- Orbitrap :

L'Orbitrap se compose de deux électrodes : l'une, externe, est creuse et la seconde, centrale, est placée coaxialement, en forme de fuseau (Cf. Figure I-34). Cette dernière est portée à une tension alternative à la polarité opposée aux ions. La forme particulière des électrodes est en effet inspirée par la forme des champs électriques. Une des particularités de cet analyseur se situe au niveau de l'injection. En effet, les ions sont injectés dans la cellule Orbitrap par paquet, d'où la nécessité d'utiliser un système de stockage d'ions (piège ionique) qui sont produits en continu, avant de les envoyer en même temps vers l'Orbitrap. Le mouvement des ions selon l'axe de l'électrode (z) est directement proportionnel au m/z de l'analyte. De plus, ce mouvement génère un courant induit

enregistré par le détecteur qui est placé sur les électrodes creuses. L'image du courant induit est un signal transitoire qui est ensuite transformé en spectre de fréquence par la transformation de Fourier, puis le spectre de fréquence est facilement converti en spectre de m/z pour obtenir les spectres de masse.

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$

Les spectromètres de masse type Orbitrap sont utilisés dans plusieurs domaines, grâce à sa haute résolution qui reste inférieure à celle du FT-ICR mais qui peut atteindre les 100 000 pour des masses autour de 400 m/z [88]. De par sa haute résolution, l'Orbitrap a une précision en masse très haute. On parviendra à des mesures < 1 ppm d'écart avec une calibration interne et environ 3 ppm avec une calibration externe.

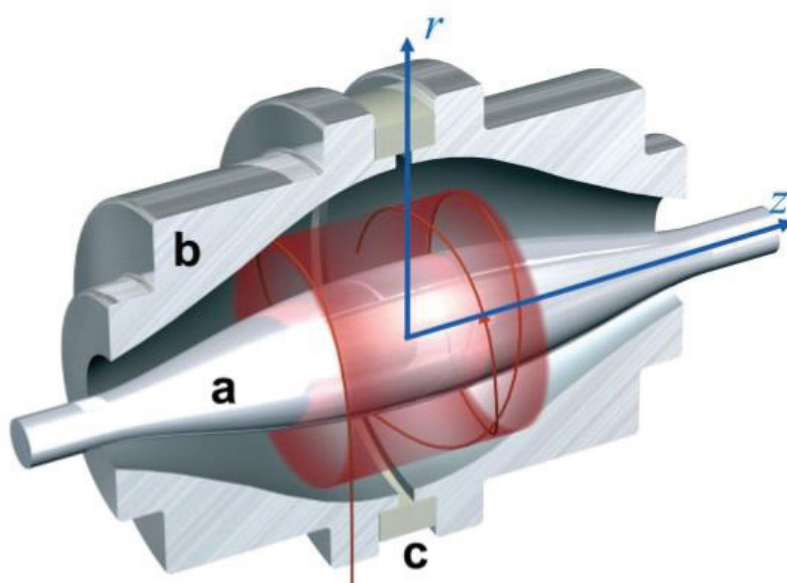


Figure I-34 : Schéma d'un analyseur Orbitrap

- Quadripôle :

Cet analyseur est composé de 4 électrodes cylindriques. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et soumises au même potentiel ($U + V\cos(\omega t)$). Les deux autres électrodes sont soumises à une tension opposée $-(U + V\cos(\omega t))$. Le potentiel crée au sein du quadripôle permet donc de guider les ions en balayant le rapport U/V . Les valeurs de tensions appliquées vont définir une gamme de stabilité pour les ions traversant l'analyseur. De ce fait, il sera possible de filtrer les ions voulus. L'intérêt de cet analyseur est de pouvoir analyser une gamme de masse (full scan) ou de filtrer un ou des ions donnés (Single Ion Monitoring). Il existe également la possibilité de coupler trois quadripôles à la suite. Cet analyseur triple quadripôle va pouvoir être utilisé de différentes manières. Un des modes les plus utilisés en quantification ciblée est le mode Multiple Reaction Monitoring. Dans ce cas, le premier quadripôle permet de sélectionner un rapport m/z donné souvent l'ion moléculaire, le second permet la fragmentation par collision (CID) et le dernier filtre sur un ion fragment caractéristique de l'ion moléculaire (ou plusieurs). Ainsi on a un gain très important en sensibilité.

- Le piège ionique / IT :

L'analyseur à piège ionique existe sous deux types : 2D Linear Ion Trap et 3DCircular Ion Trap. Le CIT est constitué d'une électrode circulaire où on applique un courant continu et un courant alternatif, et de deux électrodes chapeaux. Les potentiels appliqués permettent la création d'un champ quadripolaire au centre du piège ionique où les ions sont piégés, environ 1 cm^3 ce qui limite la quantité d'ions qu'il est possible de piéger (dû à la charge d'espace). Du gaz est injecté à très basse pression (He) pour thermaliser les ions, ainsi il est possible d'augmenter l'efficacité de piégeage. Les équations de Mathieu régissent la trajectoire des ions dans un environnement électrostatique, la résolution de ces dernières pour un piège ionique quadripolaire donne un digramme de stabilité avec en ordonné la tension U_{dc} et en abscisse la tension V_{rf} . La trajectoire des ions va donc dépendre du rapport m/z . Dans le cas d'une trajectoire stable, une forme de huit dans l'espace est observée avec des micros mouvements tout au long de trajectoire. Comme le piège est en trois dimensions, pour que les ions restent au centre, il faut que les ions soient stabilisés dans trois dimensions, dont chaque dimension est assimilée à un axe (x, y et z).

L'intérêt de cet analyseur réside dans sa capacité à isoler et à fragmenter des ions. En effet, les ions dans le piège ionique sont caractérisés par deux fréquences, une radiale et une axiale [89]. Pour les expulser on applique un courant alternatif sur les électrodes chapeaux, où l'amplitude est constante et suffisamment grande, tandis que la fréquence axiale augmente progressivement. On appelle cela un balayage de fréquences qui vont progressivement éjecter tous les ions. Afin d'isoler un ion en particulier, il suffit d'omettre la fréquence axiale qui lui correspond. Généralement on omet une gamme autour de cette fréquence et cette largeur de gamme correspond à la fenêtre d'isolement. Plus la fenêtre est fine, plus le spectre est propre, mais si la fenêtre est trop étroite on risque d'éjecter les ions d'intérêt. Une fois l'ion précurseur isolé, on applique un potentiel et on ajoute un gaz neutre afin d'induire une collision et d'augmenter l'énergie interne de l'ion précurseur. Une fois la fragmentation réalisée les ions sont expulsés vers le détecteur.

- Temps de vol /ToF (Time of Flight) :

Le principe de cet analyseur est simple, il repose sur le temps parcouru des ions dans un tube de vol.

L'analyseur à temps de vol est composé d'une zone d'accélération dans lequel un potentiel va être appliqué aux ions ($E_p = qV$) puis ils vont se trouver dans une zone de vol libre, ainsi leur $E_{\text{potentiel}}$ va se transformer en $E_{\text{cinétique}}$ ($E_c = \frac{m \times v^2}{2}$).

On a alors $E_p = E_c$ et donc en remplaçant $\frac{m \times v^2}{2} = q \times E$

En mesurant le temps d'arrivée des ions au détecteur connaissant la longueur du temps de vol et la tension d'accélération on a accès à m/z .

La dispersion en énergie des ions dans la zone d'accélération fait qu'il y a besoin de refocaliser les ions pendant leur vol libre pour corriger ce biais. Ainsi, la plupart des analyseurs à temps de vol utilisent des réflectrons (miroirs électrostatiques). La précision sur ces analyseurs varie entre 1 et 10 ppm.

Ces différents analyseurs peuvent être utilisés seuls ou combinés. L'intérêt est de pouvoir créer des analyseurs hybrides en couplant certains analyseurs. Les exemples les plus courants sont l'IT-ToF, le Q-ToF ou bien encore l'Orbitrap-IT. Ces expériences permettent de faire de la spectrométrie de masse en tandem.

Dans le cadre de cette thèse, trois types de spectromètres ont pu être employés. Il s'agit de l'IT-ToF et un simple quadripôle en couplage avec la SFC et un FT-ICR/MS.

Annexe 2 : Composés détectés par GC et GCxGC[43]

Nom	C	H	O	N	Masse moléculaire
Methanol	1	4	1	0	32.03
Ethanol	2	6	1	0	46.04
Proprenol	3	6	1	0	58.04
Ethendiol	2	6	2	0	62.04
Isobutanol	4	10	1	0	74.07
Butenol	4	8	1	0	72.06
Dimethylpentanol	7	16	1		116.12
cyclopentanol	5	10	1	0	86.07
propanetriol	3	8	3	0	92.05
Dioxolane-methanol	4	8	3	0	104.05
Dimethoxyethanol	4	10	3	0	106.06
Dimethylcyclohexanol	8	16	1	0	128.12
octanol	8	18	1	0	130.14
isopropylcyclohexanol	9	18	1	0	142.14
xylitol	5	12	5	0	152.07
formic acid	1	2	2	0	46.01
acetic acid	2	4	2	0	60.02
propenoic acid	3	4	2	0	72.02
propionic acid	3	6	2	0	74.04
hydroxy acetic acid	2	4	3	0	76.02
isocrotonic acid	4	6	2	0	86.04
butyric acid	4	8	2	0	88.05
pentadienoic acid	5	6	2	0	98.04
methyl butenoic acid	5	8	2	0	100.05
valeric acid	5	10	2	0	102.07
hydroxybutiric acid	4	8	3	0	104.05
levulinic acid	5	8	3	0	116.05
hexanoic acid	6	12	2	0	116.08
propylpentanedioic acid	8	14	4	0	174.09
hydroxytridecanoic acid	13	26	3	0	230.19
formaldehyde	1	2	1	0	30.01
acetaldehyde	2	4	1	0	44.03
propenal	3	4	1	0	56.03
propanal	3	6	1	0	58.04

ethanedial	2	2	2	0	58.01
glycoaldehyde	2	4	2	0	60.02
crotonaldehyde	4	6	1	0	70.04
butanal	4	8	1	0	72.06
oxopropanal	3	4	2	0	72.02
hydroxypropanal	3	6	2	0	74.04
methylbutenal	5	8	1	0	84.06
pentenal	5	10	1	0	86.07
succinaldehyde	4	6	2	0	86.04
glyceraldehyde	3	6	3	0	90.03
glutaraldehyde	5	8	2	0	100.05
octanal	8	16	1	0	128.12
acetone	3	6	1	0	58.04
butanone	4	8	1	0	72.06
acetol	3	6	2	0	74.04
cyclopentanone	5	8	1	0	84.06
pentanone	5	10	1	0	86.07
butanedione	4	6	2	0	86.04
hydroxybutano ne	4	8	2	0	88.05
cyclopentendione	5	6	2	0	98.04
cyclohexanone	6	10	1	0	98.07
hexanone	6	12	1	0	100.09
hydroxypentanone	5	10	2	0	102.07
dimethylcyclopentenone	7	10	1	0	110.07
dimethylcyclopentanone	7	12	1	0	112.09
hexanedione	6	10	2	0	114.07
trimethylcyclopentenone	8	12	1	0	124.09
methylheptanone	8	16	1	0	128.12
acetyloxybutanone	6	10	3	0	130.06
methyl formate	2	4	2	0	60.02
methyl acetate	3	6	2	0	74.04
ethyl formate	3	6	2	0	74.04
vinylacetate	4	6	2	0	86.04
ethyl acetate	4	8	2	0	88.05
methylbutanoate	5	10	2	0	102.07
methylpentanoate	6	12	2	0	116.08
hydroxy propanone acetate	5	8	3	0	116.05
propenyl butanoate	7	12	2	0	128.08
hydroxybutanone acetate	6	10	3	0	130.06
allyl acetylacetate	7	10	3	0	142.06
isobutylisobutanoate	8	16	2	0	144.12
methyl octanoate	9	18	2	0	158.13

ethyl methyl succinate	7	12	4	0	160.07
hexene	6	12	0	0	84.09
dimethylcyclopentene	7	12	0	0	96.09
ethoxybutane	6	14	1	0	102.10
ethoxypentane	7	16	1	0	116.12
decan	10	22	0	0	142.17
dibutylformamide	9	19	1	1	157.15
methylfluorene	14	12	0	0	180.09
fluorenol	13	10	1	0	182.07
ditolylmethane	15	16	0	0	196.13
furan	4	4	1	0	68.03
methylfuran	5	6	1	0	82.04
furanone	4	4	2	0	84.02
Vinylfuran	6	6	1	0	94.04
furfural	5	4	2	0	96.02
furfuryl alcohol	5	6	2	0	98.04
furandione	4	2	3	0	98.00
valerolactone	5	8	2	0	100.05
propylfuran	7	10	1	0	110.07
methylfurandione	5	4	3	0	112.02
hydroxymethylfurfural	6	6	3	0	126.03
methyl furoate	6	6	3	0	126.03
dimethylhydroxyfuranone	6	8	3	0	128.05
dimethoxytetrahydrofuran	6	12	3	0	132.08
heptylbutyrolactone	11	20	2	0	184.15
dihydropyran	5	8	1	0	84.06
pyranone	5	4	2	0	96.02
pyranedione	5	4	3	0	112.02
hydroxydihydropyranone	5	6	3	0	114.03
hydroxy methyl pyran one	6	6	3	0	126.03
dihydroxymethylpyranone	6	6	4	0	142.03
pyridine	5	5	0	1	79.05
methylpyridine	6	7	0	1	93.06
pyridinol	5	5	1	1	95.04
formylpyrrol	5	5	1	1	95.04
acetylpyrrol	6	7	1	1	109.06
levoglucosenone	6	6	3	0	126.03
anhydroarabinofuranose	5	8	4	0	132.04
anhydroxylofuranose	5	8	4	0	132.04

levoglucosan	6	10	5	0	162.05
anhydrogalactopyranose	6	10	5	0	162.05
melibiose	12	22	11	0	342.12
lactose	12	22	11	0	342.12
benzene	6	6	0	0	78.05
toluene	7	8	0	0	92.06
styrene	8	8	0	0	104.06
ethylbenzene	8	10	0	0	106.08
xylene	8	10	0	0	106.08
propynylbenzene	9	8	0	0	116.06
indene	9	8	0	0	116.06
ethyltoluene	9	12	0	0	120.09
naphtalene	10	8	0	0	128.06
methyl indene	10	10	0	0	130.08
methylnaphtalene	11	10	0	0	142.08
ethylindene	11	12	0	0	144.09
dimethylnaphtalene	12	12	0	0	156.09
benzylalcohol	7	8	1	0	108.06
benzofuran	8	6	1	0	118.04
ethenyloxybenzene	8	8	1	0	120.06
dihydrobenzofuran	8	8	1	0	120.06
acetophenone	8	8	1	0	120.06
methoxymethylbenzene	8	10	1	0	122.07
benzoic acid	7	6	2	0	122.04
dihydroxytoluene	7	8	2	0	124.05
methylbenzofuran	9	8	1	0	132.06
phenyl propanone	9	10	1	0	134.07
methoxydimethylbenzen	9	12	1	0	136.09
methyl naphtol	11	10	1	0	158.07
methoxymethylbenzofuran	10	10	2	0	162.07
trimetoxybenzene	9	12	3	0	168.08
biphenylol	12	10	1	0	170.07
naphtoic acid	11	8	2	0	172.05
methoxynaphtol	11	10	2	0	174.07
trimethoxy methyl benzene	10	14	3	0	182.09
methoxy naphtoic acid	12	10	3	0	202.06
methoxymethyl nitrophtalic acid	10	9	7	1	255.04
benzaldehyde	7	6	1	0	106.04
methylbenzaldehyde	8	8	1	0	120.06
hydroxybenzaldehyde	7	6	2	0	122.04
phenylpropenal	9	8	1	0	132.06

hydroxymethylbenzaldehyde	8	8	2	0	136.05
dihydroxybenzaldehyde	7	6	3	0	138.03
ethoxymethoxybenzaldehyde	10	12	3	0	180.08
anisol	7	8	1	0	108.06
methyl anisol	8	10	1	0	122.07
dimethylanisol	9	12	1	0	136.09
phenol	6	6	1	0	94.04
cresol	7	8	1	0	108.06
vynilphenol	8	8	1	0	120.06
ethylphenol	8	10	1	0	122.07
dimethylphenol	8	10	1	0	122.07
allylphenol	9	10	1	0	134.07
propenylphenol	9	10	1	0	134.07
propylphenol	9	12	1	0	136.09
ethylmethylphenol	9	12	1	0	136.09
trimethylphenol	9	12	1	0	136.09
allylmethylphenol	10	12	1	0	148.09
di tert buthyl methyl phenol	15	24	1	0	220.18
catechol	6	6	2	0	110.04
resorcinol	6	6	2	0	110.04
hydroquinone	6	6	2	0	110.04
methylcatechol	7	8	2	0	124.05
ethylcatechol	8	10	2	0	138.07
methoxycatechol	7	8	3	0	140.05
guaiacol	7	8	2	0	124.05
methylguaiacol	8	10	2	0	138.07
ethylguaiacol	9	12	2	0	152.08
vanilin	8	8	3	0	152.05
syringol	8	10	3	0	154.06
eugenol	10	12	2	0	164.08
homovanilin	9	10	3	0	166.06
methylsyringol	9	12	3	0	168.08
vanilic acid	8	8	4	0	168.04
coniferaldehyde	10	10	3	0	178.06
coniferol	10	12	3	0	180.08
vinylsyringol	10	12	3	0	180.08
guaiacyl actone	10	12	3	0	180.08
propioguaiacone	10	12	3	0	180.08
dimethoxyacetophenone	10	12	3	0	180.08
syringaldehyde	9	10	4	0	182.06
hydroxypropylguaiacol	10	14	3	0	182.09
ethylsyringol	10	14	3	0	182.09

allylsyringol	11	14	3	0	194.09
propenylsyringol	11	14	3	0	194.09
ferulic acid	10	10	4	0	194.06
propylsyringol	11	16	3	0	196.11
sinapaldehyde	11	12	4	0	208.07
syringyl acetone	11	14	4	0	210.09
sinapyl alcohol	11	14	4	0	210.09
homosyringic acid	10	12	5	0	212.07

Objectifs de la thèse et Méthodologie

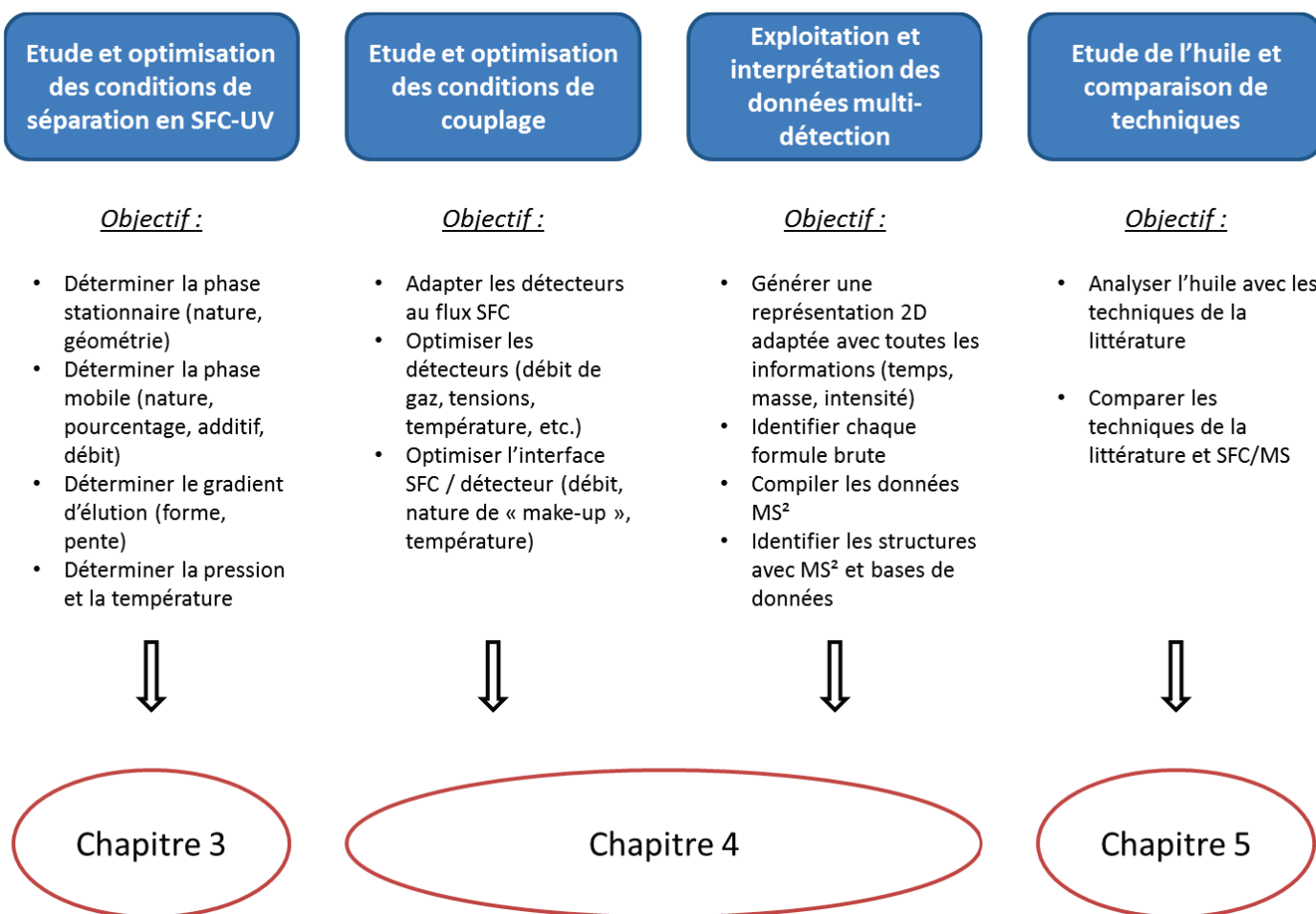
Objectifs de la thèse

Ce sujet de thèse a pour objectif de développer une méthodologie adaptée à la caractérisation d'échantillons complexes en prenant pour exemple les huiles de pyrolyse rapide et en employant un couplage entre la chromatographie en phase supercritique (SFC) avec des détecteurs ultraviolet (UV) et spectrométrie de masse (MS). Comme l'état de l'art a pu le mettre en évidence dans le chapitre 1, ces matrices oxygénées sont complexes à caractériser car composées d'espèces thermosensibles, polaires et/ou de hautes masses moléculaires. L'un des objectifs de mes travaux de thèse est de déterminer dans quelle mesure un couplage SFC-UV/MS peut apporter des informations complémentaires à celles déjà acquises par GCxGC/MS ou FT-ICR/MS sur ces matrices.

L'utilisation de cette technique analytique n'a jamais été investiguée pour cette application et le couplage entre SFC et MS n'est pas la configuration la plus répandue dans la littérature. De même, au sein de IFPEN, cette approche est complètement nouvelle et a nécessité la mise en place d'une méthodologie particulière. Elle s'articule autour de quatre axes principaux :

- **Étude et optimisation des conditions de séparation en SFC** : en jouant sur les propriétés de la phase stationnaire, la nature de la phase mobile (proportion de modificateur organique, ajout d'additifs), les conditions de gradient d'élution, les conditions de BPR et de température avec comme objectif d'obtenir un maximum de pics séparés dans le cas de l'analyse d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse.
- **Étude et optimisation des différents couplages avec la MS** : le couplage est à optimiser en prenant en compte les propriétés singulières de la phase mobile SFC sous pression et la géométrie des différentes sources d'ionisation travaillant à pression atmosphérique. De nombreux paramètres comme l'ajout de « make-up », les différentes températures, les débits de gaz et les voltages impactent le signal acquis et nécessitent une optimisation.
- **Exploitation et interprétation des données** : l'acquisition de données dans quatre modes d'ionisation différents génèrent une grande quantité d'informations et la mise en place d'outils automatisés et adaptés pour les traiter sera nécessaire. Ces outils devront permettre de représenter au mieux les données afin de faire ressortir les informations pertinentes, de parvenir à l'identification des formules brutes et des structures via les données de fragmentation et la comparaison avec des bases de données. Ce travail constitue une approche nouvelle au sein de IFPEN avec peu de recul sur la pertinence des bases de données disponibles actuellement.
- **Étude et comparaison des informations SFC/MS** : versus GCxGC/MS et FT-ICR/MS. Dans la littérature, l'essentiel des informations sur les huiles de pyrolyse rapide provient de l'utilisation de la GCxGC/MS et de la spectrométrie de masse haute résolution FT-ICR/MS. Les trois techniques analytiques, GCxGC/MS, FT-ICR/MS et SFC-UV/MS ont été appliquées à un échantillon commun. La mise en parallèle des résultats obtenus permettra de mesurer la complémentarité de ces différentes approches afin de positionner le potentiel du couplage SFC-UV/MS par rapport aux deux autres techniques.

Chacun de ces axes constitue un chapitre dans ce manuscrit comme le résume la Figure 1.



*Chapitre 2 : Partie expérimentale,
« matériels et méthodes »*

Sommaire du chapitre

Sommaire du chapitre	86
Liste des figures et tableaux	87
Introduction	89
Appareillage	90
1 Système SFC	90
2 Caractérisation du système	91
3 Normalisation des pentes de gradient	91
4 Optimisation des paramètres	92
5 Interface SFC-UV/MS	95
6 Analyseur simple quadripôle	96
7 Analyseur IT-ToF/MS	98
8 Analyses complémentaires	101
8.1 GCxGC/MS	102
8.2 FT-ICR/MS	102
8.3 Fractionnement SEC	103
Produits et échantillons	104
1 Solvants	104
2 Molécules standards et calibrant IT-ToF	104
3 Mélange modèle pour quantification	104
4 Huiles de pyrolyse rapide	105
Logiciel et retraitement des données	106
1 Logiciel INDIGO pour les chromatogrammes UV	106
2 Traitement des données SFC-UV/MS	106
2.1 Mise au point d'une méthodologie spécifique pour le traitement des données SFC-UV/MS	106
2.2 Identification structurale via MetFrag	110
Conclusion	112
References	113
Annexe 1: Molécules modèles	114

Liste des figures et tableaux

Figure II-1 : Appareil UPC ² (Waters) avec 1 : régulateur de contre-pression, 2 : système d'injection, 3 : pompes de solvants, 4 : four à colonnes, 5 : détecteur PDA, 6 : pompe ISM.....	90
Figure II-2 : Détermination du temps de délai (trois essais représentés en ligne pleine et programme en pointillés)	91
Figure II-3 : Profil de gradient générique appliqué (T_{pi} : temps de palier initial, T_g : temps de gradient, T_a : temps de retour à C_i , T_{pf} : temps de palier final).....	92
Figure II-4 : Classification des colonnes choisies pour le screening d'après West et al.[1] (ϵ : interaction n et π ; s : dipôle-dipôle ; a : acide ; b : basique ; v : effets de cavité) (Tableau II-1 pour les numéros).....	93
Figure II-5 : Configuration SFC-UV/MS avec simple Quad (ESI et APCI) et IT-ToF/MS (ESI).....	95
Figure II-6 : Configuration SFC-UV/MS avec IT-ToF/MS (APCI)	96
Figure II-7 : Schéma de principe du LCMS 2020	96
Figure II-8 : Exemple de source d'ionisation du LCMS 2020 avec différents paramètres intervenant dans le processus d'ionisation (l'aiguille Corona est uniquement présente dans le cas de l'APCI).....	97
Figure II-9 : Schéma de principe de l'IT-ToF/MS	99
Figure II-10 : Source d'ionisation de l'IT-ToF/MS	99
Figure II-11 : Logigramme d'une analyse MS/MS avec l'IT-ToF/MS.....	100
Figure II-12 : Schéma de principe du spectromètre FT-ICR/MS Thermo Scientific LTQ FT Ultra.....	102
Figure II-13 : Formule développée des composés modèles choisis : guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzone, benzylresorcinol.....	107
Figure II-14 : Chromatogramme BPC du mélange de guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzone, benzylresorcinol (de gauche à droite) en SFC/ESI(-)-MS	107
Figure II-15 : Mass map du mélange de guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzone, benzylrésorcinol (de gauche à droite) en SFC/ESI(-)-MS.....	108
Figure II-16 : Développement de l'analyse SFC-UV/MS.....	112
Tableau II-1 : Colonnes SFC utilisées lors de l'optimisation de méthode	93
Tableau II-2 : Conditions finales de SFC.....	94
Tableau II-3 : Conditions finales de MS avec le simple quadripôle et une source d'ionisation ESI.....	97
Tableau II-4 : Conditions finales de MS avec le simple quadripôle et une source d'ionisation APCI.....	98
Tableau II-5 : Conditions finales de MS avec IT-ToF/MS en ESI.....	101
Tableau II-6 : Conditions finales de MS avec IT-ToF/MS en APCI.....	101
Tableau II-7 : Conditions d'analyse par FT-ICR/MS.....	103
Tableau II-8 : Préparation de la solution mère à environ 1000 mg/kg.....	104
Tableau II-9 : Préparation des mélanges modèles pour la méthode de l'étalonnage externe	105
Tableau II-10 : Préparation des échantillons pour la méthode des ajouts dosés.....	105

Tableau II-11 : Propriétés des huiles de pyrolyses étudiées (sur base humide)	105
Tableau II-12 : Eléments et gammes utilisés pour l'attribution des formules brutes à chaque pic détecté par spectrométrie de masse haute résolution	109
Tableau II-13 : Ratios entre éléments utilisés pour l'identification via Kendrick Inside	110
Tableau II-14 : Liste des paramètres disponibles sur MetFrag et leur signification.....	111

Introduction

Ce chapitre décrit l'ensemble des appareils, leurs différentes caractéristiques, les produits et échantillons analysés ainsi que les logiciels d'acquisition, de calcul et de retraitement de données employés au cours de ces travaux. La première partie détaille les différents appareils utilisés, à savoir un système de chromatographie en phase supercritique équipé d'un détecteur UV, un système de chromatographie en phase gaz bidimensionnelle, deux spectromètres de masse haute résolution (un FT-ICR/MS et un IT-ToF/MS) et un spectromètre de masse basse résolution (un simple quadripôle). Le couplage entre SFC et spectromètre de masse (IT-ToF/MS ou simple quadripôle) est ensuite présenté. La seconde partie listera les différents produits, solvants et échantillons employés au cours de ces travaux. Enfin, la dernière partie traitera des logiciels d'acquisition et de retraitement de données développés et utilisés pour exploiter les résultats SFC-UV/MS discutés dans les chapitres suivants.

Appareillage

1 Système SFC

L'appareillage employé pour toutes les manipulations est un appareillage commercial de chromatographie en phase supercritique développé par la société WATERS (Milford, MA, USA). Ce système, nommé Acquity UPC² (Ultra Performance Convergence Chromatography), se compose de 6 modules tous pilotés à l'aide du logiciel Empower 3 et identifié sur la Figure II-1 :

- Un régulateur de contre-pression assurant le maintien des conditions supercritiques dans le système (pression en sortie de colonne entre 105 et 410 bars) (Module n°1)
- Un gestionnaire d'injection d'échantillons pouvant réguler la température (entre 4 et 40 °C) et doté d'une boucle de 10 µL (Module n°2)
- Un gestionnaire de solvant binaire composé de deux pompes. L'une est dédiée au pompage du CO₂ supercritique (pompe refroidie à 3°C pour garder le fluide dans son état compressé). La seconde pompe est dédiée au co-solvant organique associé au CO₂, elle travaille quant à elle à température ambiante (Module n°3)
- Un four avec deux emplacements de colonnes (maximum 15 cm et température entre 4 et 90 °C) (Module n°4)
- Un détecteur UV de type PDA permettant l'acquisition d'un signal entre 210 et 400 nm (volume 8 µL, chemin optique 10 mm, pression max 410 bars) (Module n°5)
- Une pompe ISM (Isocratic Solvent Manager) travaillant à température ambiante pour l'ajout de solvant en sortie de colonne et en amont de la détection, MS par exemple (Module n°6).

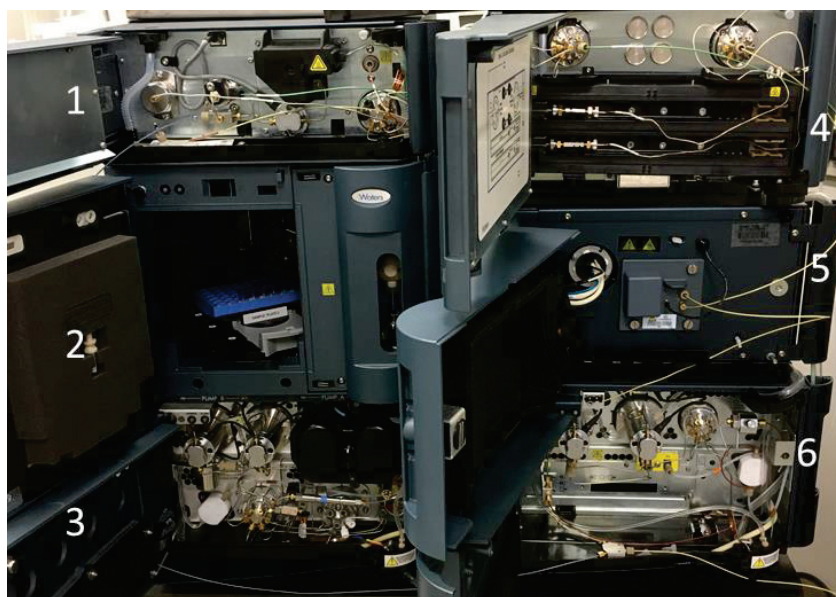


Figure II-1 : Appareil UPC² (Waters) avec 1 : régulateur de contre-pression, 2 : système d'injection, 3 : pompes de solvants, 4 : four à colonnes, 5 : détecteur PDA, 6 : pompe ISM

2 Caractérisation du système

Afin de maîtriser au mieux le système et parvenir à développer une méthode d'analyse, il est nécessaire de caractériser l'appareillage en déterminant le volume de délai.

Ce volume correspond à la somme de tous les volumes (tubes + chambre de mélange) à travers lesquels la phase mobile va cheminer avant d'arriver en tête de colonne. En fonction du débit employé, il faudra donc un temps de délai (proportionnel au volume de délai), avant qu'un changement de phase mobile ne parvienne en tête de colonne.

Pour mesurer ce volume, la colonne d'analyse est remplacée par une union de volume mort égal à 0. A partir de la programmation d'un gradient d'éluion adéquat (de 70 à 100 % de co-solvant) et d'un co-solvant contenant un traceur UV, on mesure le temps nécessaire pour arriver au milieu du gradient. Ce temps est équivalent à $T = T_d + T_g/2$ avec T_d temps de délai et T_g le temps de gradient.

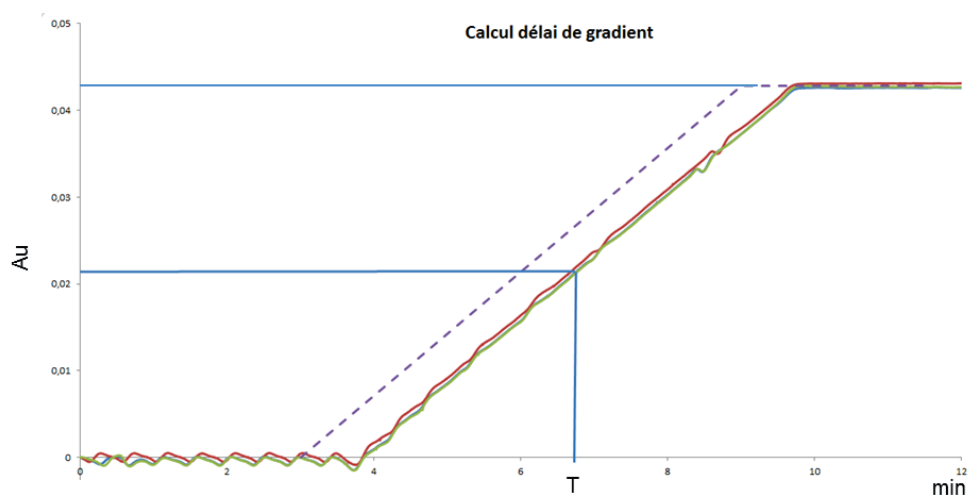


Figure II-2 : Détermination du temps de délai (trois essais représentés en ligne pleine et programme en pointillés)

Dans notre cas, un volume de délai de 525 μL a pu être déterminé. En comparaison aux systèmes UHPLC disponibles actuellement sur le marché, cette valeur semble bien supérieure (environ 100 μL pour UHPLC). Cela s'explique par la nécessité d'avoir une chambre de mélange plus grande (425 μL) afin de parvenir à homogénéiser parfaitement les deux fluides composant la phase mobile. En effet, on cherche ici à mélanger un fluide subcritique (CO_2) et un liquide (co-solvant). Afin de ne pas risquer de démixtion de phase et d'assurer un signal avec un bruit de fond minimum, une chambre de mélange supplémentaire est nécessaire. Cela se traduit en pratique par un temps de délai plus long et non négligeable lors de l'élaboration des programmes de gradient pour l'optimisation des méthodes SFC.

3 Normalisation des pentes de gradient

Au travers des travaux d'optimisation de la méthode SFC pour les matrices ex-biomasse, plusieurs géométries de colonnes ont été testées. Afin de ne comparer que les performances liées aux phases stationnaires et ne pas prendre en compte les effets dus aux changements de dimension entre colonnes, un gradient générique et normalisé a été mis en place.

$$T_g = \frac{\Delta C \times V_{tot} \times \varepsilon}{s \times F} \quad (1)$$

Avec T_g : temps de gradient (min)

ΔC : différence entre C_i (composition initiale) et C_f (composition finale)

V_{tot} : volume total de la colonne (mL)

ε : porosité de la colonne

s : pente normalisée du gradient

F : débit de la phase mobile (mL/min)

De même, les différents temps de palier employés dans la méthode ont été normalisés en prenant en compte le temps de délai (T_d) et le temps mort (T_0). La Figure II-3 présente le profil générique du gradient utilisé. Ainsi, le temps de palier initial (T_{pi}), le temps de palier final (T_{pf}) et le retour à la composition finale (T_a) sont définis comme suit :

$$\frac{T_{pi} + T_d}{T_0} = Cst \quad (2)$$

$$T_a = 2 \times T_0 \quad (3)$$

$$T_{pf} = 5 \times T_0 + T_d \quad (4)$$

L'utilisation de cette normalisation permettra donc de pouvoir comparer les colonnes de géométries différentes sans être impactée par les caractéristiques physiques de ces dernières.

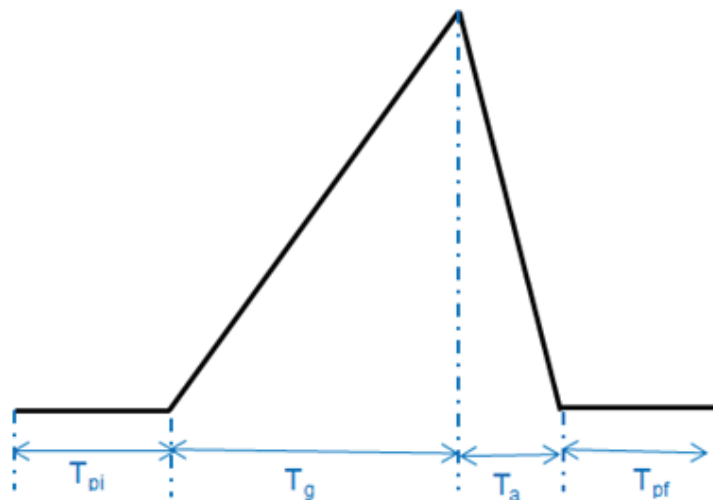


Figure II-3 : Profil de gradient générique appliqué (T_{pi} : temps de palier initial, T_g : temps de gradient, T_a : temps de retour à C_i , T_{pf} : temps de palier final)

4 Optimisation des paramètres

Au cours de ces travaux, plusieurs paramètres ont été optimisés afin de parvenir à la séparation ayant la plus grande capacité de pics. Le Tableau II-1 présente les différentes colonnes qui ont été testées lors de cette optimisation. Le type de phase sélectionnée a été déterminé à l'aide de la littérature et des travaux de West et al.[1] afin de couvrir l'ensemble des interactions offertes par les phases stationnaires. Ainsi les 7 phases stationnaires choisies devraient permettre de couvrir un large

domaine de sélectivité afin d'effectuer un screening. En adoptant le même type de représentation que dans cet article, la Figure II-4 représente le positionnement de nos différentes phases stationnaires.

Tableau II-1 : Colonnes SFC utilisées lors de l'optimisation de méthode

Numéro	Nom commercial	Fabricant	Chimie de phase stationnaire	d_c^a (mm)	L_c^b (cm)	d_p^c (μm)	L_c/d_p
1	Acquity UPC ² BEH	Waters	Silice	3.0	10	1.7	5.88
2	Acquity UPC ² HSS C ₁₈ SB	Waters	C ₁₈	3.0	10	1.8	5.55
3	Acquity UPC ² BEH 2-EP	Waters	Ethyl Pyridine	3.0	10	1.7	5.88
4	Luna Cyano	Phenomenex	Cyanopropyl	4.6	15	3.0	5.00
5	Acquity UPC ² BEH RP18 Shield	Waters	C ₁₈ avec groupement polaire	3.0	10	1.7	5.88
6	Nucleodur Polartech	Macherey-Nagel	C ₁₈ avec groupement polaire	3.0	10	2.5	4.00
7	Acquity UPC ² CSH Fluorophényl	Waters	Fluorophényl	3.0	10	1.7	5.88

^aDiamètre interne ^bLongueur de colonne ^cDiamètre de particule.

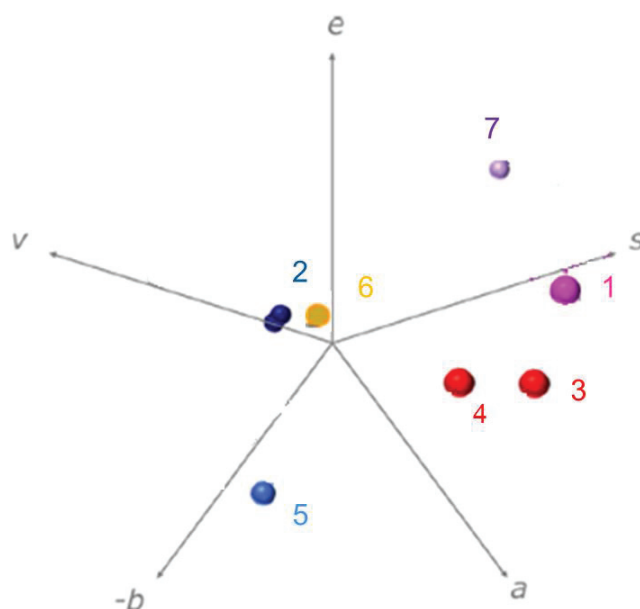


Figure II-4 : Classification des colonnes choisies pour le screening d'après West et al.[1] (e : interaction n et π ; s : dipôle-dipôle ; a : acide ; b : basique ; v : effets de cavité) (Tableau II-1 pour les numéros)

Les paramètres critiques pour optimiser une séparation en SFC sont principalement : la nature des phases mobiles et stationnaires, la BPR, la température, le débit, les conditions de gradient (pente, composition initiale). L'optimisation de ces paramètres fera l'objet du chapitre 3. D'autres paramètres

(solvant d'injection, volume injecté, solvant de rinçage) ont été maintenus constants pour chacune des expériences discutées dans ce rapport.

Le solvant de dilution est imposé par les échantillons analysés. En effet, les bio-huiles sont miscibles en grande partie dans des solvants oxygénés dont le THF ou le méthanol. Ces deux solvants ont été testés et leurs chromatogrammes (« blancs ») sont corrects car sans pic détecté. De plus, comme des insolubles sont présents lors d'une dilution dans le méthanol, le choix a été fait de travailler avec le THF comme solvant de dilution. Bien que ce solvant ne soit pas recommandé par le constructeur (car risque de dégradation), avec un faible volume injecté lors des analyses, la nature du solvant n'endommagera pas le système. En accord avec le chapitre 1, ce volume d'injection a été laissé constant et à une valeur préconisée par la littérature [2] pour éviter toute distorsion de pics. Un volume de 1 μL a été injecté pour chacune des expériences décrites dans ce manuscrit. Enfin, une attention a été apportée à la dilution de l'échantillon. Compte tenu de sa viscosité, l'huile ne peut être injectée pure dans le système. Deux dilutions dans le THF ont été testées (dilution par 5 et par 10 en masse). La dilution par 5 permet une plus grande sensibilité et n'induit pas de saturation ou de déformation pour les pics détectés en comparaison à l'analyse réalisée avec une dilution par 10. Afin de faciliter la détection des espèces les moins concentrées dans la matrice, la dilution par 5 a été conservée. En fin de cycle d'injection, l'aiguille de prélèvement est nettoyée avec deux solvants (un pour l'intérieur de l'aiguille et un pour l'extérieur) pour assurer la non contamination entre deux injections. Ces deux solvants, méthanol et isopropanol, sont préconisés par le constructeur, pour solubiliser un maximum de composés. L'utilisation de THF, bien que théoriquement utile pour éliminer toutes traces de l'échantillon, est à proscrire dans ce cas-là pour ne pas endommager le système avec des volumes trop importants de ce solvant agressif pour les pièces de l'injecteur (aiguille notamment).

Les conditions finales de SFC sont résumées dans le Tableau II-2 ci-dessous.

Tableau II-2 : Conditions finales de SFC

<i>Phase stationnaire</i>	<i>Co-solvant</i>	<i>Débit</i>	<i>Température</i>	<i>BPR</i>
Acquity UPC ² BEH 2EP (150 x 3.0 mm ; 1.7 μm)	Acétonitrile / eau (98/2; v/v)	1.4 mL/min	30°C	150 bars
<i>Volume injecté</i>	<i>Détection</i>	<i>Conditions de gradient</i>	<i>Make up</i>	<i>Débit de make up</i>
1 μL	PDA entre 210 et 400 nm	De 1 à 40 % de co-solvant ($T_{\text{pi}} = 5 \text{ min}$ $T_{\text{g}} = 14 \text{ min}$ $T_{\text{a}} = 1 \text{ min}$ $T_{\text{pf}} = 2 \text{ min}$) (Cf. Figure II-3)	Méthanol	0.5 mL/min

Afin d'assurer une non contamination et une bonne répétabilité de nos expériences, une séquence type a été créée en insérant une étape de rinçage et une injection de « blanc » de THF entre chaque échantillon injecté. Cette séquence a été employée pour toutes les injections décrites et discutées dans ce manuscrit.

5 Interface SFC/ MS

En nous basant sur différents travaux de la littérature, nous avons adopté le schéma instrumental présenté sur la Figure II-5 pour le couplage de la SFC avec la spectrométrie de masse. Ainsi, afin de prévenir tout risque de précipitation et d'obtenir un débit en entrée de la source d'ionisation suffisant (particulièrement en début d'analyse où le taux de co-solvant reste très faible), un module de pompage supplémentaire est ajouté au dispositif afin d'apporter un débit de phase mobile supplémentaire en sortie de cellule UV. Dans la suite du rapport, on nommera ce module ISM (Isocratic Solvent Manager). A noter que pour certaines expériences (utilisation de la source APCI sur le spectromètre IT-ToF/MS) le montage a été modifié comme sur la Figure II-6.

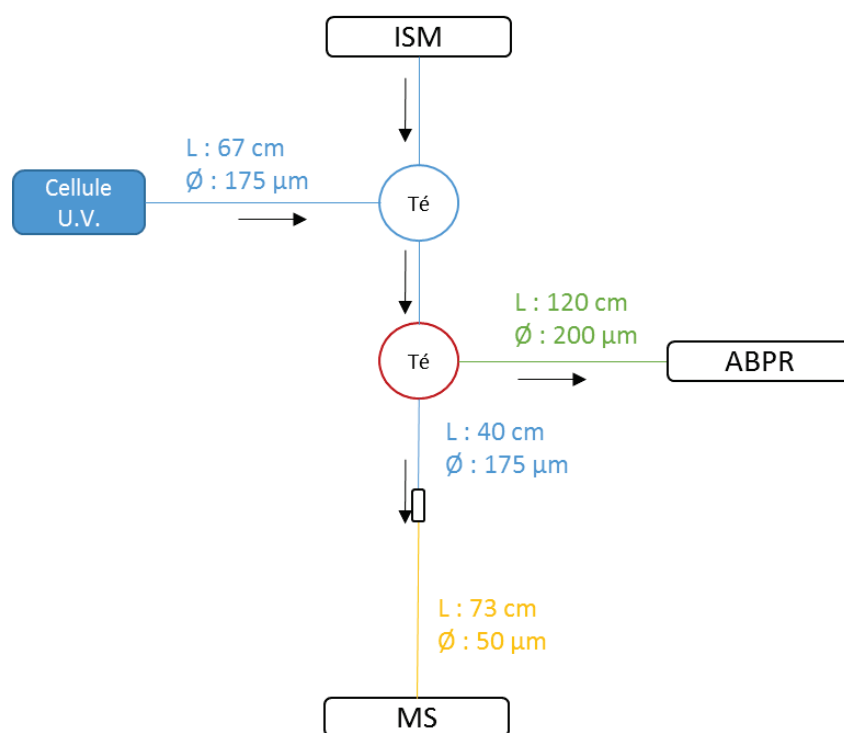


Figure II-5 : Configuration SFC-UV/MS avec simple Quad (ESI et APCI) et IT-ToF/MS (ESI)

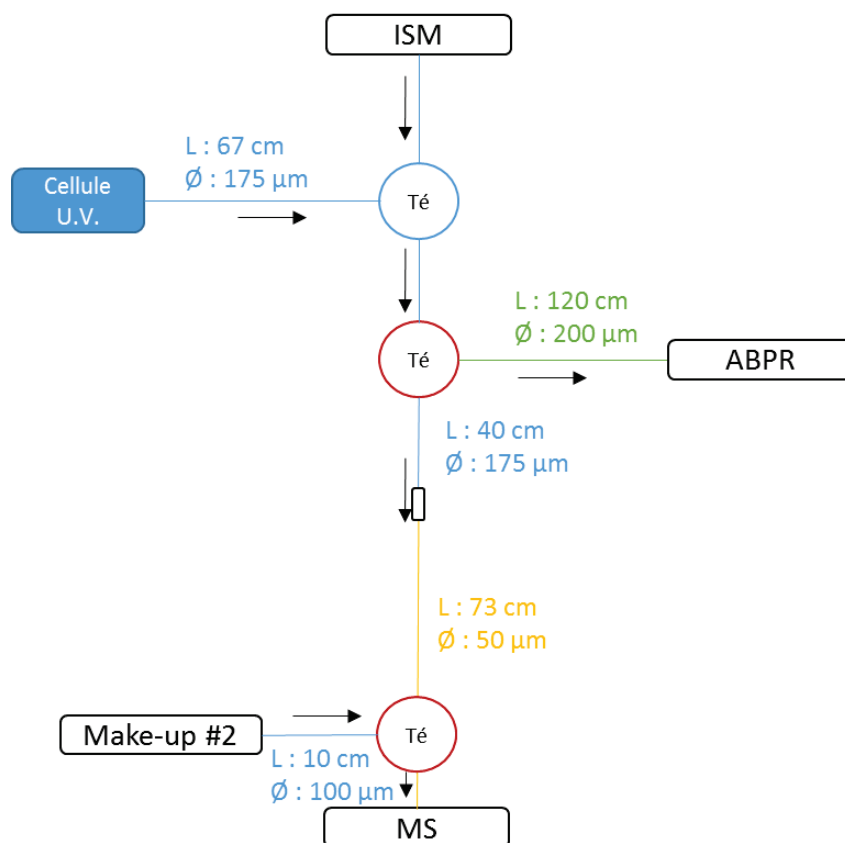


Figure II-6 : Configuration SFC-UV/MS avec IT-ToF/MS (APCI)

La caractérisation de ces interfaces fait l'objet d'une discussion concernant les différents débits employés, le ratio de split mesuré et l'optimisation des paramètres qui en découlent dans le chapitre 4.

6 Analyseur simple quadripôle

Les premiers travaux de couplage SFC-UV/MS ont été réalisés en associant la SFC décrite auparavant à un spectromètre de masse de type simple quadripôle (LCMS 2020 Shimadzu, Kyoto, Japon). La Figure II-7 schématise cet appareillage. Il est composé d'une ligne de désolvatation (CDL), d'un système d'optique pour focaliser les ions et enfin de l'analyseur quadripôle juste avant le détecteur. Pour plus de détails sur l'analyseur, le lecteur pourra se reporter à l'Annexe 1 du chapitre 1.

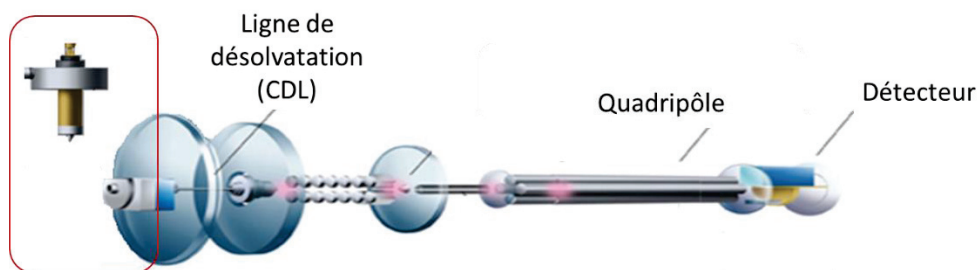


Figure II-7 : Schéma de principe du LCMS 2020

Deux sources d'ionisation sont à notre disposition pour ces travaux : une source ElectroSpray (ESI) et une source APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) pouvant fonctionner toutes deux en mode d'ionisation positif ou négatif. La Figure II-8 illustre la source ESI.

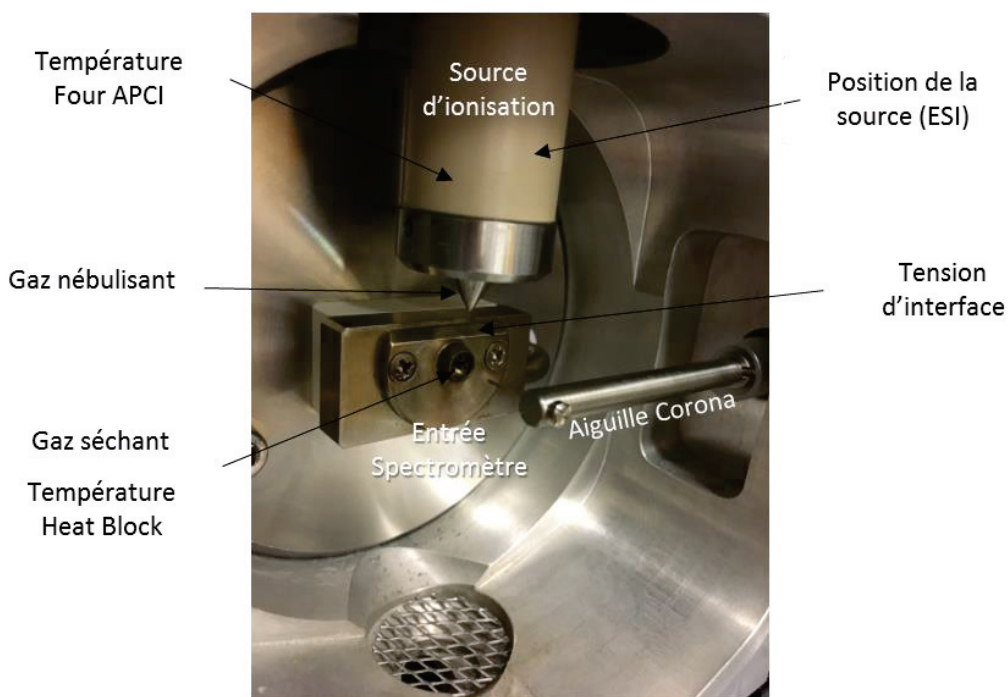


Figure II-8 : Exemple de source d'ionisation du LCMS 2020 avec différents paramètres intervenant dans le processus d'ionisation (l'aiguille Corona est uniquement présente dans le cas de l'APCI).

Les différents paramètres influençant l'ionisation et la détection ont été optimisés à l'aide de molécules modèles, dans le but de maximiser la détection de l'ion pseudo-moléculaire dans chacun des cas. Ces optimisations sont décrites dans la partie A du chapitre 4. On trouvera dans le Tableau II-3 et Tableau II-4 les conditions expérimentales finales retenues, respectivement en ESI et APCI.

Tableau II-3 : Conditions finales de MS avec le simple quadripôle et une source d'ionisation ESI

Gamme de masse	Tension du CDL	Débit de gaz nébulisant (N₂)	Débit de gaz séchant (N₂)	Température du CDL
80 - 800 uma	0 V	0.5 L/min	15 L/min	250 °C
Température du Heat block	Tension d'interface (négatif et positif)		Position de la source	
400°C	-5 kV	4 kV	3 mm	

Tableau II-4 : Conditions finales de MS avec le simple quadripôle et une source d'ionisation APCI

<i>Gamme de masse</i>	<i>Tension du CDL</i>	<i>Débit de gaz nébulisant (N₂)</i>	<i>Débit de gaz séchant (N₂)</i>	<i>Température du CDL</i>
80 - 800 uma	0 V	0.5 L/min	15 L/min	250 °C
<i>Température Heat block</i>	<i>Tension d'interface (négatif et positif)</i>		<i>Température de l'APCI</i>	
250°C	-5 kV	4 kV	450 °C	

L'appareil a été piloté à l'aide du logiciel Shimadzu LCMS Solution (version 3.80). Afin d'obtenir des expériences comparables entre elles, une attention a été portée au lancement du « Start » sur les deux logiciels en simultané. Ainsi au moment de l'injection en SFC, un signal électrique transmis via un câble entre les deux appareils permet le lancement de l'acquisition sur le second logiciel. Les temps de rétention sont donc parfaitement comparables d'une analyse à une autre.

7 Analyseur IT-ToF/MS

Pour le couplage entre SFC et MS, le second spectromètre de masse employé est un instrument IT-ToF/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan) équipé de deux sources d'ionisation différentes : APCI et ESI, toutes les deux travaillant en mode positif ou négatif.

Cet appareil est composé de deux analyseurs. L'analyseur à temps de vol (Time of Flight ToF) permet une mesure précise des masses détectées alors que le second analyseur, piège ionique (Ion Trap IT), va permettre de réaliser des fragmentations MS/MS, voire également de faire plusieurs étapes de fragmentation consécutives, du type MSⁿ. Les spécifications de l'analyseur à temps de vol procurent une résolution de 10 000 pour le rapport $m/z = 520.9095$ Th avec une erreur en masse de 5 ppm à l'aide d'une calibration interne et de 20 ppm pour une calibration externe. Pour la calibration externe, l'emploi de formiate de sodium et des clusters qui en résultent augmente la gamme de calibration de 90 à 900 Th en mode positif et de 45 à 928 Th en mode négatif. La Figure II-9 schématise l'appareillage ainsi que les différents paramètres optimisés. Pour plus d'informations sur le fonctionnement de chaque analyseur, le lecteur se rapportera à l'Annexe 1 du chapitre 1.

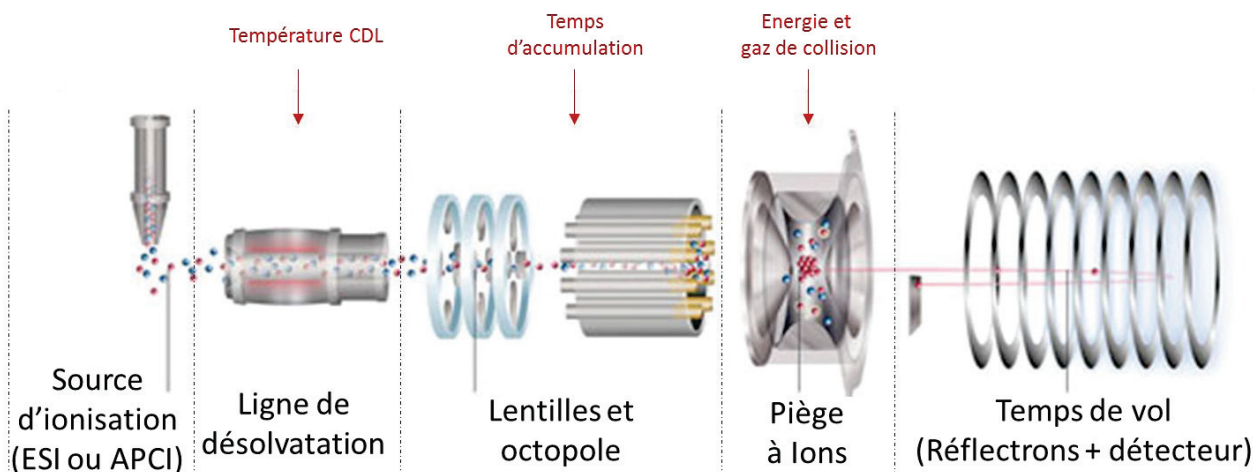


Figure II-9 : Schéma de principe de l'IT-ToF/MS

Pour les autres paramètres optimisés et recensés dans les Tableau II-5 et Tableau II-6, ils s'appliquent tous à la source d'ionisation. La Figure II-10 schématise et illustre la géométrie de cette source.

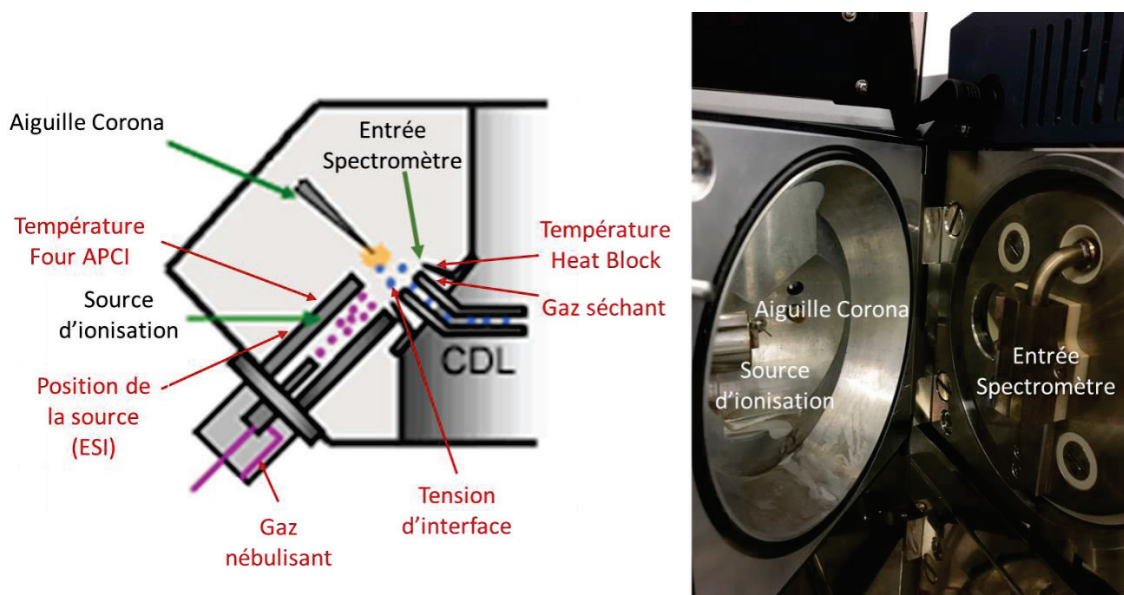


Figure II-10 : Source d'ionisation de l'IT-ToF/MS

Tout comme pour les paramètres de séparation, les paramètres d'ionisation et de détection ont fait l'objet d'une optimisation. Cette optimisation est décrite dans la partie B du chapitre 4.

L'utilisation de deux analyseurs (IT et ToF) induit l'utilisation de nombreux paramètres pour les acquisitions en MS^2 . La Figure II-11 résume le déroulement d'une séquence d'acquisition lorsque la fragmentation d'ions est effective. Un premier scan est réalisé en MS_1 . Avant l'acquisition du second scan, l'analyse du premier va induire un choix pour l'appareil : soit des ions sont détectés au-delà d'une valeur seuil et le scan #2 correspondra à un scan de fragmentation MS^2 , soit cette valeur n'est atteinte par aucun ion détecté et un scan de type MS_1 va alors suivre. Dans le cas où la MS^2 est déclenchée, la sélection de l'ion à fragmenter se fait par intensité décroissante. Une fois l'ion sélectionné, l'appareil vérifie que ce dernier ne fait pas partie de la liste d'exclusion. Si ce n'est pas le

cas, l'ion est fragmenté et les fragments sont analysés via l'analyseur ToF. Sinon le second ion le plus intense est sélectionné et ainsi de suite jusqu'à trouver un ion au-delà de la valeur seuil d'intensité et qui n'est pas sur la liste d'exclusion. Ce processus se répète alors tout au long de l'analyse.

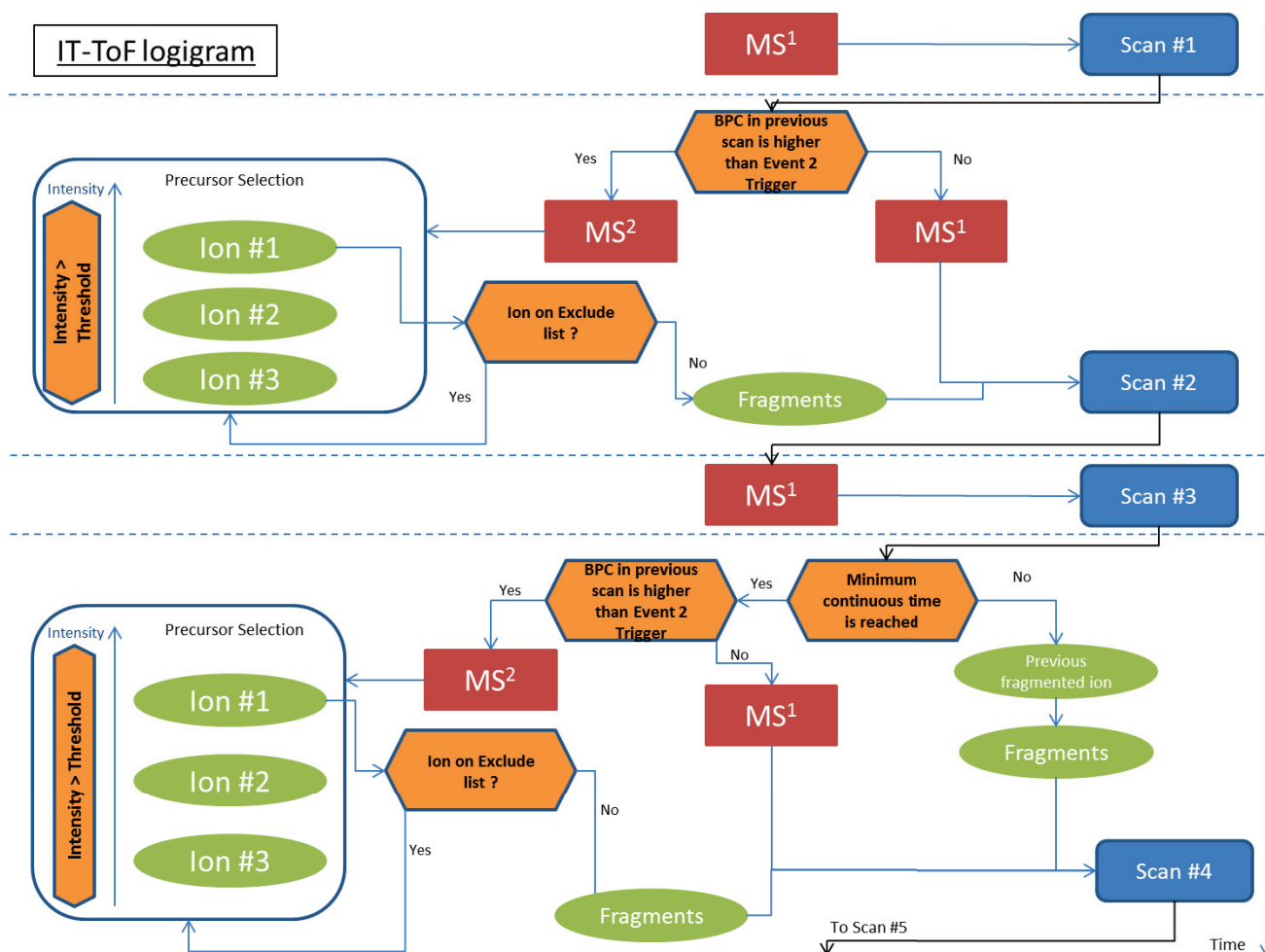


Figure II-11 : Logigramme d'une analyse MS/MS avec l'IT-ToF/MS

Les analyses ont été menées de manière non ciblée dans le cadre des huiles de pyrolyse rapide afin de détecter un maximum de composés. De ce choix, plusieurs paramètres doivent être fixés. Ainsi le temps d'accumulation dans le piège a été maintenu identique entre la MS¹ et la MS² et égal à 30 ms. Ce temps doit être assez long pour obtenir suffisamment de signal pour chaque scan mais assez court pour fragmenter un maximum d'ions d'intérêt qui arriveraient dans le piège entre deux scans. Le seuil de déclenchement de la fragmentation a été déterminé grâce aux analyses MS¹ réalisées en amont afin de ne fragmenter que les ions d'intérêt et de ne pas perdre du temps à fragmenter des ions très peu intenses ou correspondant à du bruit. Enfin, le temps d'exclusion (Dynamic period), correspondant au temps durant lequel un ion n'est plus considéré comme un précurseur possible, a été fixé à 1 seconde afin de décrire au mieux chaque précurseur plusieurs fois sans occulter d'autres précurseurs en cas de coélution.

Pour les expériences visant à quantifier et à identifier des composés précis, des analyses ciblées ont également été mises en place. A la différence du paragraphe précédent, la sélection des ions

précurseurs est cette fois-ci limitée par une table d'exclusion. On peut ainsi imposer la fragmentation de certains ions. De plus, afin d'être le plus complet sur ces ions d'intérêt, le temps d'exclusion réglé auparavant à 1 seconde afin de prendre en compte les coélutions est abaissé à 0.1 seconde. De ce fait, l'appareillage peut fragmenter plus de fois l'ion d'intérêt et ainsi augmenter le nombre de fragmentations réalisées. Les paramètres d'ionisation restent eux inchangés entre le mode ciblé et le mode non ciblé.

Tout comme pour le simple quadripôle, le déclenchement simultané des acquisitions sur le logiciel Empower (SFC) et LabSolution (MS) est rendu possible grâce à l'utilisation d'un câble électrique entre les deux appareils.

Tableau II-5 : Conditions finales de MS avec IT-ToF/MS en ESI

<i>Gamme de masse</i>	<i>Temps d'accumulation</i>	<i>Débit du gaz nébulisant (N₂)</i>	<i>Pression de gaz séchant (N₂)</i>	<i>Température du CDL</i>	<i>Position de la source verticale</i>
80 - 800 uma	30 ms	0.5 L/min	100 kPa	250 °C	0
<i>Température Heat block</i>	<i>Tension d'interface (négatif et positif)</i>		<i>Energie de collision</i>	<i>Gaz de collision (Ar)</i>	<i>Position de la source horizontale</i>
280°C	-3.5 kV	4 kV	300 %	75 %	0

Tableau II-6 : Conditions finales de MS avec IT-ToF/MS en APCI

<i>Gamme de masse</i>	<i>Temps d'accumulation</i>	<i>Débit du gaz nébulisant (N₂)</i>	<i>Pression du gaz séchant (N₂)</i>	<i>Température du CDL</i>	<i>Température de l'APCI</i>
80 - 800 uma	30 ms	0.5 L/min	100 kPa	250 °C	250°C
<i>Température Heat block</i>	<i>Tension d'interface (négatif et positif)</i>		<i>Energie de collision</i>	<i>Gaz de collision (Ar)</i>	
280°C	-3.5 kV	4 kV	300 %	75 %	

8 Analyses complémentaires

Afin de situer les résultats obtenus par SFC/MS, des analyses complémentaires ont été réalisées à l'aide de techniques analytiques déjà développées à IFPEN. La GCxGC/MS ainsi que la FT-ICR/MS ont donc été employées sur les mêmes échantillons afin de comparer les informations obtenues par chacune des techniques. Ces comparaisons feront l'objet du chapitre 5 de ce manuscrit. La suite de ce chapitre précise les conditions expérimentales utilisées pour chacune des techniques.

8.1 GCxGC/MS

L'appareillage utilisé est un chromatographe en phase gazeuse, Agilent 7890A, doté d'un modulateur thermique (Zoex Corporation ZX2). Les échantillons sont injectés à l'aide d'un passeur automatisé de type Agilent G4513A.

Le montage réalisé est un montage de type normal avec en première dimension une colonne de type non polaire : HP-PONA (longueur 20m, diamètre interne 0.2mm et épaisseur de film 0.25 μ m). La seconde dimension de polarité intermédiaire est une colonne BPX-50 (50% polyphénylsiloxane, 50% polydiméthylsiloxane) (longueur 1.5m, diamètre interne 0.1mm et épaisseur de film 0.1 μ m). L'interface entre les deux colonnes est composée d'une boucle de modulation inerte constituée d'une colonne de longueur 1.5m et de diamètre interne 0.1mm. La période de modulation est de 8 secondes. Le programme de température suivant est utilisé : de 35°C jusqu'à 280°C à 2.0°C/min. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit constant de 1.5 mL/min. La température d'injecteur est réglée à 280°C. Le volume injecté est de 1 μ L avec un split de 50.

Les spectres de masse sont acquis à l'aide d'un spectromètre AccuTOF GCV 4G JEOL doté d'une source à ionisation électronique (EI) à 200°C et d'un analyseur à temps de vol muni d'un réflectron d'une précision de 10 ppm. Les acquisitions sont enregistrées à 70 eV pour l'énergie d'ionisation et à une fréquence de 25 Hz. La gamme de masses est fixée entre 10 et 500 m/z. L'identification des composés est réalisée à l'aide du logiciel Mass Center 4 en comparant les spectres de masse avec ceux issus à la fois de la base de données NIST 09 (2009) mais également de bibliothèques internes.

8.2 FT-ICR/MS

L'appareillage FT-ICR/MS employé est un Thermo Scientific LTQ FT Ultra (Bremen, Germany) composé d'un piège à ion linéaire et d'une cellule à résonance cyclotronique (ion cyclotron resonance) dans un aimant super conducteur de 7 Tesla. Une résolution de 100 000 pour la masse m/z= 400 (Full Weight Height Medium) a été appliquée à nos analyses et la gamme de masses employée a été réglée entre 80 et 800 m/z. Le nombre de microscans a été fixé à 8 et pour chaque acquisition 50 scans ont été accumulés.

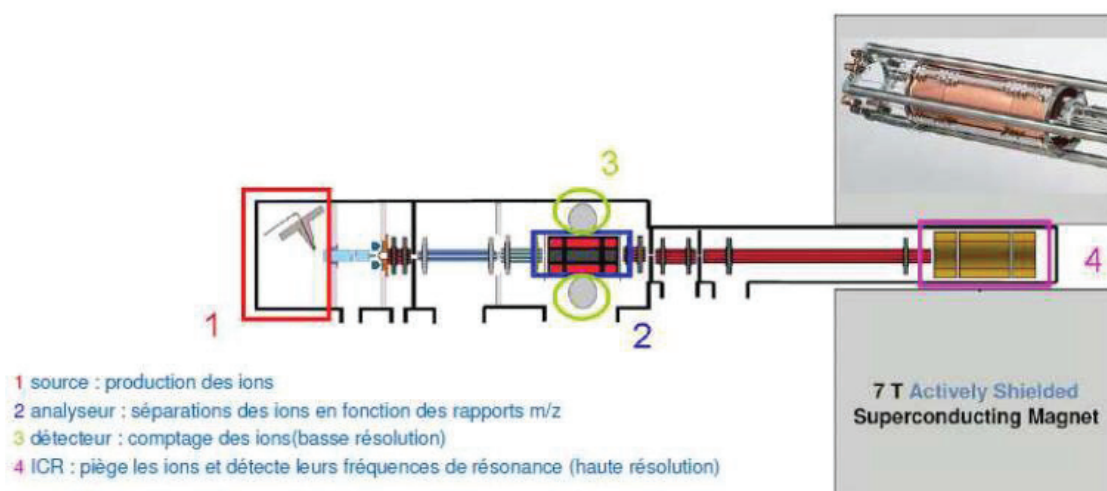


Figure II-12 : Schéma de principe du spectromètre FT-ICR/MS Thermo Scientific LTQ FT Ultra

Le piège à ion linéaire est un quadripôle linéaire qui a pour rôle fondamental la préparation, la régulation du nombre et l'injection des ions à analyser dans la cellule ICR. Cet analyseur permet l'injection de paquets d'ions qui sont alors conduits jusqu'à la cellule ICR par un système de lentilles et de multipôles. En entrant dans la cellule ICR, les ions sont soumis au champ magnétique de l'aimant supraconducteur où ils subissent une force de Lorentz. Cette force va induire un mouvement circulaire autour de l'axe parallèle au champ magnétique. Ce mouvement, appelé mouvement cyclotronique, aura une fréquence dépendante à la fois du champ magnétique mais également du rapport m/z de l'analyte. En mesurant cette fréquence, on parvient donc à déterminer le rapport m/z . Avant d'effectuer la mesure, il est nécessaire d'avoir un mouvement d'ensemble de tous les ions cohérent, c'est-à-dire avec la même orbite et la même phase. L'application d'un champ électrique à l'aide de plaques d'excitation va permettre de mettre tous les ions dans un état cohérent et ainsi de parvenir à la mesure des fréquences de résonance qui conduiront à la détermination du rapport m/z .

Deux sources d'ionisation ont été utilisées en amont de ces analyseurs : APCI et ESI, toutes les deux travaillant en mode d'ionisation positif ou négatif. Les échantillons ont été analysés en infusion directe dans la source à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les bio-huiles ont été diluées 50 fois (en volume) dans le méthanol. Que ce soit en mode d'ionisation négatif ou positif, un additif a été ajouté pour favoriser l'ionisation. L'acide formique (0.1% volumique) et NH_4OH (0.1% volumique) ont été ajoutés respectivement en mode d'ionisation positif et négatif.

Tableau II-7 : Conditions d'analyse par FT-ICR/MS

<i>Gamme de masse</i>	<i>Débit de gaz nébulisant</i>	<i>Température de capillaire</i>	<i>Tension de capillaire</i>
80 - 800 uma	25 U.A.	230°C	-30 V
<i>Tension de spray (négatif et positif)</i>		<i>Température du four APCI</i>	<i>Décharge Couronne APCI</i>
-3.5 kV	4.80 kV	250°C	+/- 3.5 kV

8.3 Fractionnement SEC

La chromatographie d'exclusion stérique a été réalisée à une échelle semi-préparative sur un instrument constitué d'une pompe isocratique Varian (Prepstar 218) et d'un compartiment à colonne thermostaté. La détection a été effectuée avec un détecteur d'indice de réfraction (RID). L'huile de pyrolyse rapide a été préparée dans du THF, puis filtrée à travers un filtre à seringue de 0.45 μm avant l'analyse. Un volume de 500 μL de cette solution, préparée à environ 200 g/L, a été injecté dans un système composé de trois colonnes (25 x 300 mm, granulométrie 10 μm , 50 Å) placées en série. Un gel de copolymère polystyrène-divinylbenzène fortement réticulé a été utilisé comme garnissage de colonne (Agilent, PLGel). Une analyse chromatographique typique a été effectuée en 50 minutes à 30°C et avec un débit de 8 mL/min de THF comme éluant. Après la détection, un collecteur de fractions a récupéré les fractions en fonction du temps de rétention. Les fractions ont ensuite été évaporées à sec sous flux d'azote. Une fois l'évaporation terminée, les fractions ont été rediluées dans un volume de THF calculé pour garder la même concentration que l'huile de pyrolyse injectée en SFC-UV/MS.

Produits et échantillons

1 Solvants

Le dioxyde de carbone de grade SFC (99.7%) employé est fourni par Air Liquide sous forme compressé (Bouteille B50 sous pression). Les co-solvants employés sont de l'acétonitrile, du méthanol et de l'eau de qualité HPLC/MS fournis par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). Les différents additifs utilisés pour le couplage SFC-UV/MS (acide formique et ammoniac) proviennent également de Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne) (qualité > 99%).

2 Molécules standards et calibrant IT-ToF

Trente-six molécules modèles (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne) ont été choisies à l'aide de la littérature afin de représenter les principales fonctions chimiques connues dans les huiles de pyrolyse rapide. Chacune de ces molécules est diluée dans du THF à une concentration d'environ 200 mg/kg. Ces préparations ont été conservées à 4°C afin de prévenir toute évolution au cours du temps. Les caractéristiques de ces différentes molécules modèles se retrouvent en Annexe 1.

Le calibrant sélectionné pour l'IT-ToF/MS est le formiate de sodium à environ 100ppm dans un mélange eau/méthanol. Pour préparer cette solution, on introduit 0.5g de NaOH et 1.15g de HCOOH dans 1L d'eau ultra pure. Cette solution est diluée 25 fois dans un mélange eau/méthanol.

3 Mélange modèle pour quantification

Une étude de quantification est discutée au sein du chapitre 4. Pour cela plusieurs solutions modèles ont été préparées afin de réaliser une courbe d'étalonnage externe mais aussi des ajouts dosés. Deux molécules modèles ont été employées dans ces mélanges : la vanilline et le coniféraldéhyde.

Une première solution mère a été créée à environ 1000 mg/kg de chaque composé dans un mélange THF/H₂O (97/3 : m/m).

Tableau II-8 : Préparation de la solution mère à environ 1000 mg/kg

Nom du mélange	Solution mère	
	masse (g)	concentration en mg/kg
Vanilline	0.0112	1014.90
Coniféraldéhyde	0.011	996.77
THF/H ₂ O (97/3)	11.0024	

Cette solution mère a ensuite été diluée plusieurs fois afin de créer la gamme d'étalonnage externe comme résumé dans le Tableau II-9.

Tableau II-9 : Préparation des mélanges modèles pour la méthode de l'étalonnage externe

Nom du mélange	MF 125 ppm	MF 250 ppm	MF 500 ppm	MF 625 ppm
Mélange mère (g)	1.008	2	3.0042	3.0007
THF/H ₂ O (97/3) (g)	7.0145	6.016	3.013	1.8003
Total (g)	8.0225	8.016	6.0172	4.801
Concentration Vanilline (mg/kg)	127.52	253.22	506.71	634.33
Concentration Coniféraldéhyde (mg/kg)	125.24	248.70	497.66	623.00

Ces différents mélanges ont donc permis d'obtenir les échantillons nécessaires à la création des courbes d'étalonnage externe.

Pour les ajouts dosés, ces mélanges modèles ont servi de diluant à l'huile de pyrolyse rapide dans les mêmes proportions que l'huile seule (1 g d'huile ajouté à 4 g de diluant). Le Tableau II-10 résume les conditions de préparation de ces huiles dopées.

Tableau II-10 : Préparation des échantillons pour la méthode des ajouts dosés

Nom du mélange	Huile 100 ppm	Huile 200 ppm	Huile 400 ppm	Huile 500 ppm	Huile seule
Diluant employé	MF 125 ppm	MF 250 ppm	MF 500 ppm	MF 625 ppm	THF
Masse d'huile (g)	1.0044	1.0025	1.0115	1.0129	1.0097
Masse de diluant (g)	4.0106	4.0152	4.006	4.0171	4.0108
Total(g)	5.015	5.0177	5.0175	5.03	5.0205
Concentration Vanilline ajouté (mg/kg)	101.98	202.63	404.56	506.59	0.00
Concentration Coniféraldéhyde ajouté (mg/kg)	100.16	199.01	397.33	497.54	0.00

4 Huiles de pyrolyse rapide

Plusieurs huiles issues de la pyrolyse rapide de biomasses ont été investiguées dans ces travaux. Le Tableau II-11 résume les propriétés à disposition pour l'huile de pyrolyse utilisée tout au long de la thèse et nommée par la suite Huile 1. D'autres échantillons d'huile ont été utilisés pour l'étude menée et discutée dans le chapitre 3. Elles seront nommées Huiles A à K. Pour celles-ci, aucune mesure analytique n'est connue de même que l'origine exacte de ces huiles.

Tableau II-11 : Propriétés de l'huile de pyrolyse étudiée (sur base humide)

Propriété	Méthode analytique	Huile 1 (Sciure de conifères)
Masse volumique à 15°C (g/mL)	ASTM D4052	1.23
Teneur en eau (%m/m)	ASTM E203	21.7
Teneur en carbone (%m/m)	ASTM D5291	42.1
Teneur en hydrogène (%m/m)	ASTM D5291	7.3

Logiciel et retraitement des données

Plusieurs types de données ont été générées au cours de ces travaux et outre les logiciels usuels de traitement de données brutes tel que EXCEL ou OriginLab, trois logiciels développés en interne au sein d'IFPEN ont permis de valoriser nos acquisitions. Des plateformes de comparaison de bases de données ont également été utilisées.

1 Logiciel INDIGO pour les chromatogrammes UV

Afin de comparer les données issues de différentes conditions d'acquisition en SFC-UV lors de l'optimisation de la méthode de séparation, un premier logiciel, développé en interne, a été employé et a permis de traiter les chromatogrammes UV obtenus.

Ce logiciel, INDIGO, permet dans notre cas de détecter et de comptabiliser les pics du chromatogramme après avoir réaligné une déviation de la ligne de base. Le seuil de détection utilisé, correspond à une hauteur de pic minimale après lissage de la ligne de base, et a été fixé à une valeur de 3 fois le rapport signal sur bruit afin de comptabiliser l'ensemble des pics. On obtient alors le nombre de pics total ainsi que leur temps de rétention. Ces informations sont alors utilisées pour calculer chacun des critères permettant la qualification de la séparation réalisée.

2 Traitement des données SFC-UV /MS

Suite à l'optimisation des conditions d'élution et de détection par SFC-UV/MS, on dispose donc de cinq sources d'informations pour l'analyse d'un seul et même échantillon :

- Un chromatogramme UV entre 210 et 400 nm
- Deux chromatogrammes MS provenant des espèces ionisées par APCI (un en mode d'ionisation négatif et un en mode d'ionisation positif)
- Deux chromatogrammes MS provenant des espèces ionisées en ESI (un en mode d'ionisation négatif et un en mode d'ionisation positif).

Il est donc important de pouvoir croiser les différentes informations provenant de tous ces modes de détection.

2.1 Mise au point d'une méthodologie spécifique pour le traitement des données SFC-UV/MS

Une méthodologie de traitement des données de spectrométrie de masse a été spécifiquement développée dans ce travail. En effet, afin de répondre parfaitement à nos besoins et de limiter au minimum les contraintes liées aux logiciels commerciaux, le choix a été fait de mettre en place une solution interne. A l'aide de logiciels de programmation et d'utilitaires (Rstudio, Excel, Origin), il a été possible de retraiter les données brutes extraites et de parvenir à plusieurs représentations. Pour illustrer la méthodologie, on donnera l'exemple du mélange modèle employé pour l'optimisation du simple quadripôle (Cf. Figure II-13).

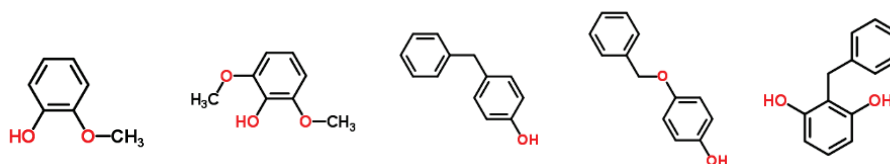


Figure II-13 : Formule développée des composés modèles choisis : guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzone, benzylresorcinol

La première représentation correspond au chromatogramme acquis par spectrométrie de masse (via le logiciel LabSolution, Shimadzu). En fonction du temps de rétention, l'intensité de l'ion le plus intense est retracée. Ce type de chromatogramme, désigné BPC (Base Peak Chromatogram), permet de s'affranchir des dérives de ligne de base dues à la somme des impuretés détectées. A noter que ce chromatogramme ne donne pas d'informations sur les masses détectées.

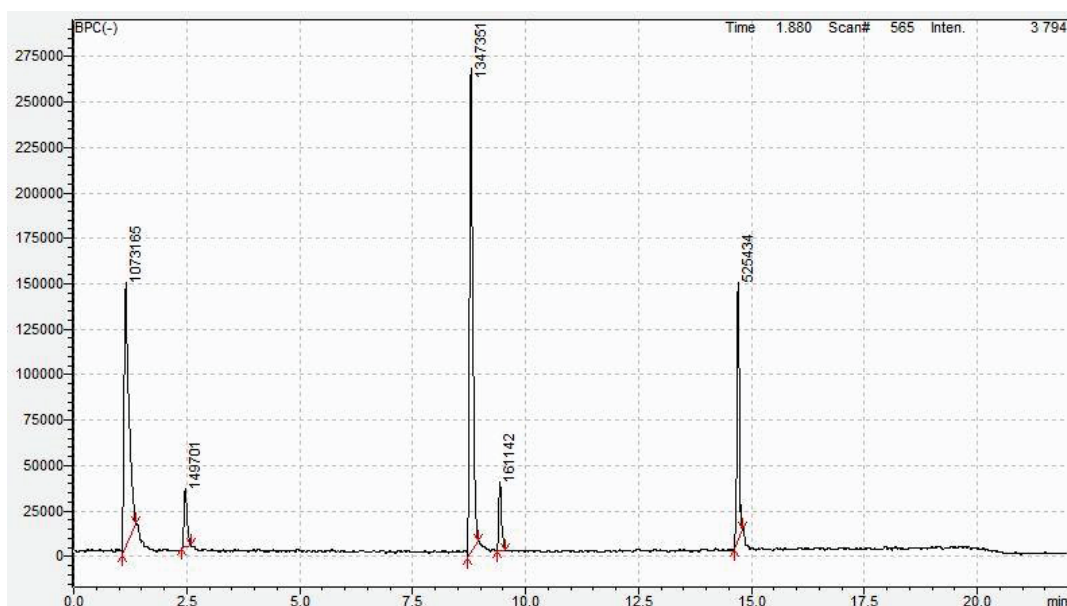


Figure II-14 : Chromatogramme BPC du mélange de guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzone, benzylresorcinol (de gauche à droite) en SFC/ESI(-)-MS

Dans chaque mode d'ionisation, il a été possible d'extraire un spectre de masse pour chacun des pics intégrés en BPC (via les logiciels Excel et Rstudio). Comme il est difficile de discuter des observations sur une représentation 3D et afin d'obtenir une empreinte de l'échantillon contenant toutes les informations générées par une analyse SFC-UV/MS, le choix a été fait de réaliser des cartographies avec en abscisses le temps de rétention, en ordonnées la masse de l'ion détecté et à l'aide d'une échelle de couleur rendre compte de l'intensité de l'ion (Figure II-15). L'intensité sur ces représentations n'est pas comparable d'un composé à un autre. Chaque molécule va voir son propre coefficient de réponse en fonction du mode d'ionisation. Pour une même concentration, deux composés peuvent donc avoir une réponse totalement différente (facteur 10 voire plus). On nommera dans la suite du rapport ces représentations « *mass map* ».

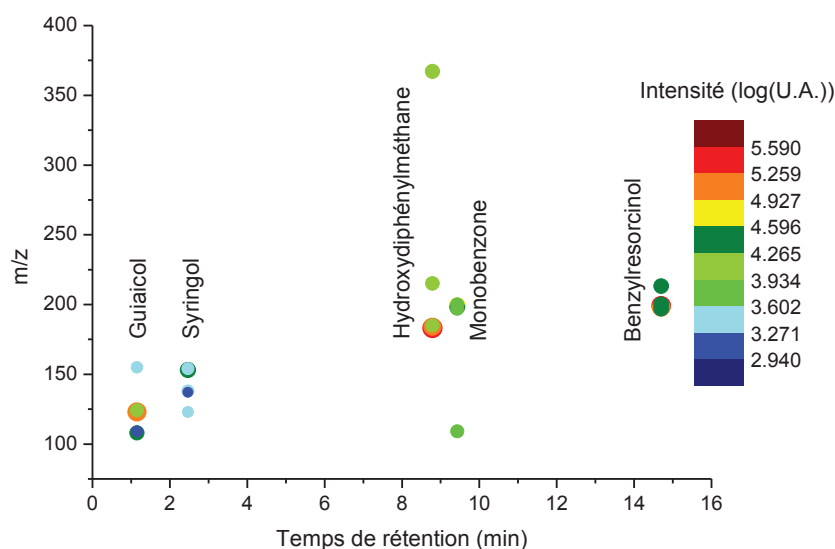


Figure II-15 : Mass map du mélange de guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzone, benzylrésorcinol (de gauche à droite) en SFC/ESI(-)-MS

Ces représentations préliminaires ont permis d'exploiter les résultats générés par le couplage entre la SFC et le simple quadripôle (LCMS 2020). Comme expliqué auparavant, l'utilisation de ce spectromètre de masse n'étant pas suffisante pour atteindre une caractérisation moléculaire, la même méthodologie de retraitement a été testée pour les données issues de l'IT-ToF/MS. L'appareil étant bien plus résolutif et les données brutes intégrant également les spectres de fragmentation, l'ensemble du travail d'automatisation sous Excel, présenté ci-dessus, montre rapidement ses limites.

Un logiciel a donc été mis au point durant la thèse en collaboration avec la Direction Mécatronique et Numérique de IFPEN pour répondre au besoin de retraitement des données acquises via les méthodes SFC-UV/HRMS. Ce logiciel a été développé selon trois axes principaux :

1) Exportation des données après acquisition

Afin de déployer ce logiciel à d'autres méthodologies et d'autres couplages au sein d'IFPEN, le choix a été fait de travailler sur une extension pour les données brutes la plus universelle possible. Le format .mzXML a été sélectionné comme étant le plus populaire et le plus répandu aujourd'hui [3].

2) Visualisation des données

La représentation sous forme de « mass map » a été conservée. Afin de ne pas surcharger cette représentation, un seuil d'intensité minimum a été ajouté pour supprimer les signaux provenant du bruit de fond et des isotopes. Enfin, un pic est défini par plusieurs scans MS au cours du temps qui correspondent à la largeur du pic chromatographique. Toujours pour épurer la cartographie mais également pour obtenir le spectre moyen correspondant à un composé, le logiciel va regrouper les scans possédant le même signal en masse (plus ou moins une tolérance de 20 ppm) et avec un temps de rétention identique, plus ou moins 5 secondes qui correspondent en pratique à une largeur de pics assez large pour englober tous les cas possibles. A partir de ces regroupements, il est ensuite possible d'exporter les spectres moyens en MS¹ et MS² sous format texte afin de les utiliser dans d'autres programmes ou via des plateformes comparatives disponibles sur internet. Les données MS¹ seront traitées avec le module « Kendrick Inside » et les données MS² via l'utilisation de base de données.

3) Identification de formules brutes

Une fois les données visualisées à l'aide de « mass map », l'étape suivante est d'associer à chacun des points présents sur ces cartographies une formule brute. Pour cela, le travail déjà réalisé dans le module « Kendrick Inside » également employé pour retraiter les données de FT-ICR/MS, a été repris dans le logiciel.

Développé initialement pour traiter des données issues d'analyses pétroliques, le logiciel « Kendrick Inside » permet d'assigner des formules brutes aux différents pics obtenus par mesure de spectrométrie de masse haute résolution (FT-ICR/MS et IT-ToF/MS). Plusieurs règles de calcul entrent en compte pour éliminer les isotopes, choisir les éléments à inclure dans le calcul des formules brutes, éliminer les adduits formés, déterminer l'erreur en masse entre acquisition et masse théorique. Après retraitement par ce logiciel, les données se trouvent donc sous forme d'une liste de formules brutes. Pour cela, dans notre cas et avec la connaissance des produits que nous avons, le choix des atomes à inclure s'est limité à C, H, O et N (et Na et K pour le mode d'ionisation ESI+). Pour chacun des éléments, une gamme a également été définie de nouveau à l'aide de nos connaissances et de la littérature. Ainsi, le Tableau II-12 récapitule ces paramètres.

Tableau II-12 : Eléments et gammes utilisés pour l'attribution des formules brutes à chaque pic détecté par spectrométrie de masse haute résolution

<i>Elément</i>	<i>Nombre minimum</i>	<i>Nombre maximum</i>
Carbone	1	50
Hydrogène	1	100
Oxygène	0	20
Azote	0	1
Na* et K *	0	1

* Elément ajouté en ESI(+)

Une fois le choix des éléments fait, la tolérance en termes d'écart en masse doit être définie. Cette valeur dépend de la précision et de la résolution du spectromètre employé. Pour les expériences réalisées via l'IT-ToF la tolérance est fixée à 20 ppm. Pour les analyses acquises avec le FT-ICR/MS, avec une erreur de masse plus faible, la tolérance est de 5 ppm. Une fois ces paramètres fixés, le logiciel propose les combinaisons d'éléments avec l'écart entre masse théorique et masse mesurée inférieur à la tolérance choisie. Il est possible de rajouter également d'autres critères comme un ratio entre les éléments choisis en fonction de la connaissance que l'on a sur l'échantillon analysé. Pour les huiles de pyrolyse rapide, les différents ratios utilisés sont répertoriés dans le Tableau II-13.

Tableau II-13 : Ratios entre éléments utilisés pour l'identification via Kendrick Inside

Ratio	Nombre minimum	Nombre maximum
H/C	0.2	3.1
O/C	0	1.8
N/C	0	1.3

Pour chaque combinaison d'éléments répondant aux différents critères, le logiciel va ensuite vérifier la présence des signaux de masse correspondant aux isotopes majoritaires de chaque élément (^{15}N , ^{18}O et ^{13}C) et leurs abondances relatives théoriques. Un score est alors calculé pour chaque formule brute prenant en compte à la fois et de manière équivalente l'écart avec la masse théorique de l'ion mono-isotopique et la différence entre l'intensité des isotopes mesurée et théorique. Le score le plus élevé est alors défini comme l'identification la plus probable. A noter que l'utilisateur a la possibilité de changer cette identification si le résultat du calcul semble incohérent. Ce logiciel permet également de tracer rapidement des diagrammes de Kendrick qui donnent une classification des formules brutes par nombre d'atomes de carbone sur l'axe des abscisses et en fonction du DBE (Double Bond Equivalent) sur l'axe des ordonnées.

4) Comparaison de données

Enfin, le dernier axe de développement du logiciel concerne la comparaison de données brutes. Deux possibilités ont été envisagées : d'une part, pour un même échantillon, le logiciel peut comparer en termes de temps de rétention et de formule brute les points communs et les différences entre les 4 modes d'ionisation (APCI +/- et ESI +/-). D'autre part, l'outil peut également comparer des échantillons entre eux afin, par exemple, d'extraire les points communs et les différences en fonction des conditions du procédé de conversion ou de la source de la biomasse choisie pour produire les huiles de pyrolyse rapide.

2.2 Identification structurale via MetFrag

Une fois l'identification des formules brutes réalisées, chacune d'entre elles correspond encore à un grand nombre de structures. Et ce nombre de structures augmente exponentiellement avec la masse moléculaire. Les données de fragmentation de chacun des pics détectés entrent alors en jeu afin de diminuer le nombre de candidats correspondant à une formule brute. A l'aide du logiciel développé, il est possible d'obtenir les spectres de fragmentation de chaque précurseur d'intérêt détecté lors de l'analyse SFC-UV/MS et d'exporter ces derniers sous format de fichiers .txt. Ensuite, ils sont comparés via des plateformes de base de données ou des outils de fragmentation *in silico* ou une combinaison des deux disponibles gratuitement sur internet. Dans notre cas, le choix a été fait de travailler avec le programme MetFrag qui a l'avantage de combiner à la fois l'approche comparative avec une base de données de spectres existants et l'approche théorique *in silico*.

A partir de la formule brute, la plateforme va rechercher tous les candidats possibles au sein d'une base de données à choisir dans les paramètres. Notre choix a été fait d'interroger

« ChemSpider » qui est parmi les propositions de base de données la plus exhaustive à notre connaissance. Une fois la liste de structures candidates extraites, certains paramètres sont à définir, ils sont résumés dans le Tableau II-14.

Tableau II-14 : Liste des paramètres disponibles sur MetFrag et leur signification

<i>Paramètres</i>	<i>Valeur choisie pour l'application en SFC-UV/MS</i>	<i>Signification</i>
Data base	Chemspider	Définit la base de recherche des candidats
Formula	C _x H _y O _z	Indique la formule brute du précurseur défini par le logiciel SFC/MS
MetFrag Scoring Item	Spectral similarity Exact spectral similarity	En cochant ces deux cases, on réalise une comparaison avec la base de données MoNA
Mzppm	20 ppm	Tolérance de la mesure de masse des fragments
Mode	[M-H] ⁻	Définit la forme sous laquelle se trouve les fragments
MS/MS peak list	...	On insère ici la liste des fragments avec leur intensité respective

Pour notre application, trois scores sont calculés afin de classer les candidats. Le premier, propre à MetFrag, utilise la fragmentation *in silico* pour calculer un spectre de fragmentation théorique pour chaque candidat et le comparer à celui importé par nos soins (exporté via notre logiciel) sur la plateforme. Ce score est à considérer indépendamment des deux autres car c'est le seul issu de la fragmentation *in silico*. Les deux autres scores sont calculés en comparant notre spectre de fragmentation expérimental à la base de données « MoNa » (Mass Bank of North america). L'un des scores mesure la similarité entre expérimental et référence en prenant en compte la perte de molécules neutres et le second vérifie l'exactitude entre le spectre expérimental et celui de la base de données. Ces deux derniers scores peuvent apporter de la confiance supplémentaire mais ne sont pas un critère car si la molécule recherchée n'est pas dans MoNA elle aura un mauvais score sur ces deux paramètres. Une fois les trois calculs réalisés, la plateforme normalise chacun (par le maximum et le minimum rencontré sur chaque score) et additionne les résultats. Un classement des candidats trouvés dans ChemSpider est réalisé en fonction de cette somme. A noter qu'il est possible de changer le poids de chacun des scores dans le calcul de la somme pour favoriser l'une ou l'autre des approches. L'avantage de cet outil est la possibilité d'identifier des molécules qui ne sont pas tabulées dans les bases de spectres MS/MS. Par contre l'approche *in silico* peut dans certains cas donner une fausse identification. La validation de cette approche sera réalisée dans le chapitre 4.

Conclusion

Au cours de cette thèse, plusieurs techniques analytiques ont été employées afin d'accroître nos connaissances à la fois sur les huiles de pyrolyse rapide mais également sur le potentiel d'une nouvelle technique : la SFC-UV/MS. Pour cela, des méthodes déjà développées et éprouvées, ont été utilisées : des analyses par GCxGC/MS et FT-ICR/MS. A contrario, plusieurs étapes d'optimisation ont été nécessaires afin de parvenir à une méthode d'analyse en SFC-UV/MS. Ces différentes étapes ainsi que les paramètres optimisés pour chacune sont résumés dans la Figure II-16. Trois étapes d'optimisation ont été menées afin de maximiser la capacité de pics (optimisation des conditions de séparation par SFC), améliorer au maximum le transfert entre les deux dimensions (optimisation de l'interface entre SFC et MS) et enfin maximiser la détection (optimisation des conditions d'ionisation et de détection au sein de la MS). Une fois les données acquises dans les meilleures conditions, des outils appropriés pour le retraitement ont été utilisés. Deux logiciels internes ont ainsi pu être valorisés (Indigo et Kendrick Inside) et un nouveau module a pu être développé (SFC/MS) afin de répondre au mieux aux problématiques issues du retraitement des données SFC-UV/MS.

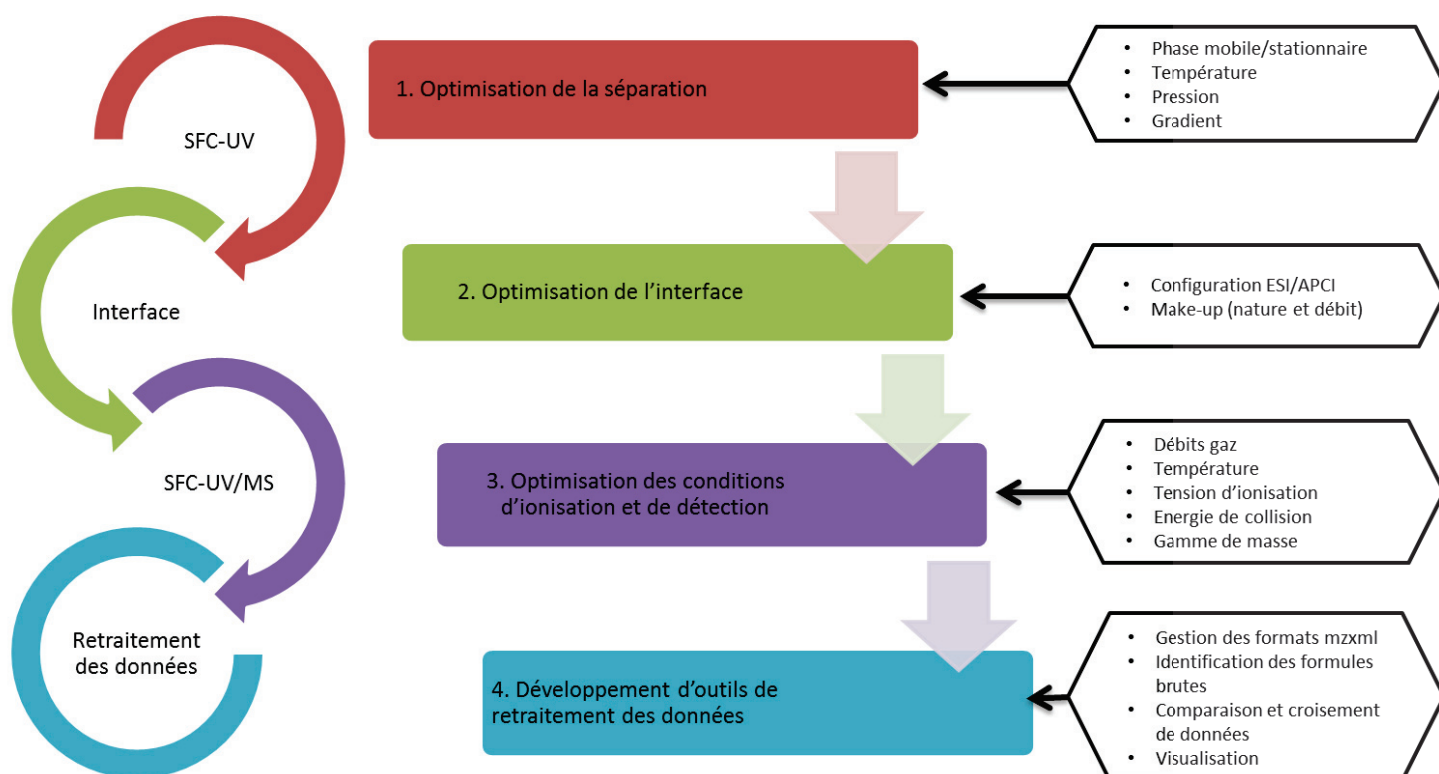

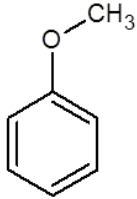
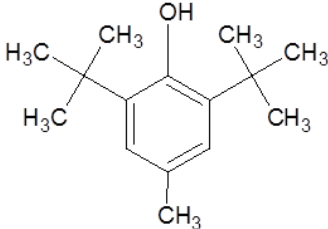
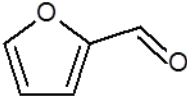
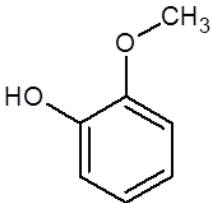


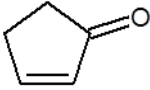
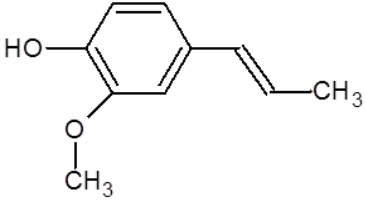
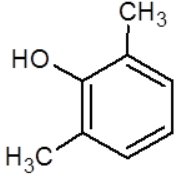
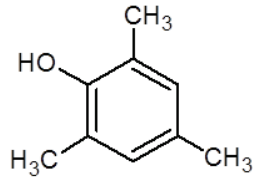
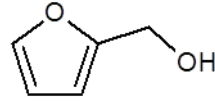
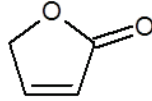
Figure II-16 : Développement de l'analyse SFC-UV/MS

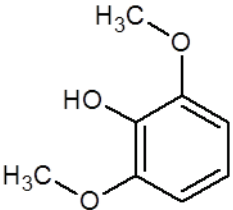
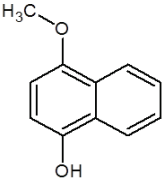
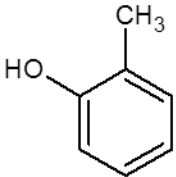
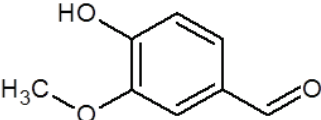
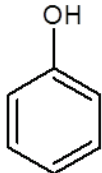
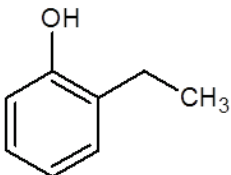
Références

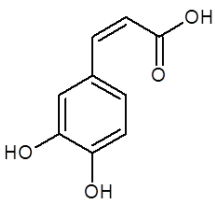
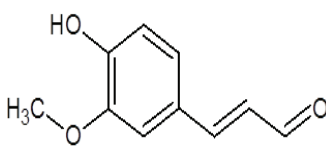
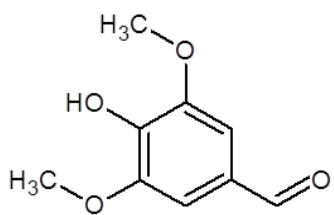
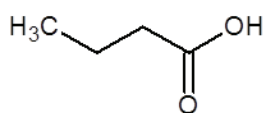
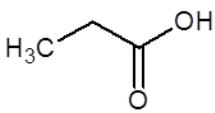
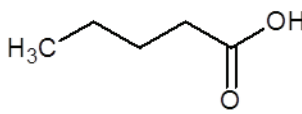
- [1] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1191 (1-2) (2008) 21–39.
- [2] V. Desfontaine, A. Tarafder, J. Hill, J. Fairchild, A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, A systematic investigation of sample diluents in modern supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1511 (2017) 122–131.
- [3] P.G.A. Pedrioli, J.K. Eng, R. Hubley, M. Vogelzang, E.W. Deutsch, B. Raught, B. Pratt, E. Nilsson, R.H. Angeletti, R. Apweiler, K. Cheung, C.E. Costello, H. Hermjakob, S. Huang, R.K. Julian, E. Kapp, M.E. McComb, S.G. Oliver, G. Omenn, N.W. Paton, R. Simpson, R. Smith, C.F. Taylor, W. Zhu, R. Aebersold, A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research, *Nature biotechnology* 22 (11) (2004) 1459–1466.

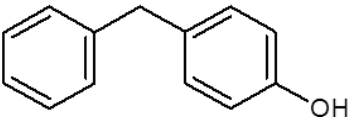
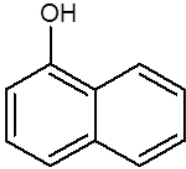
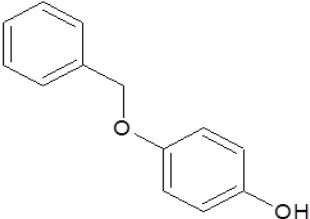
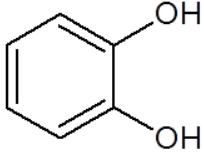
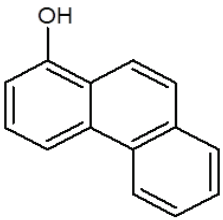
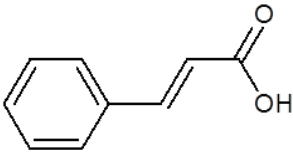
Annexe 1: Molécules modèles

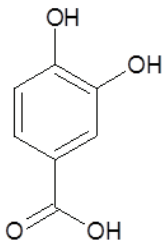
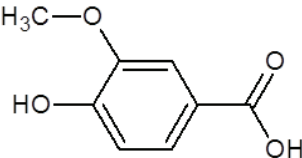
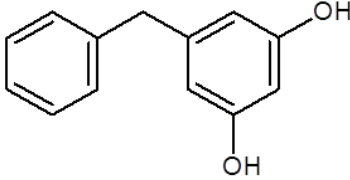
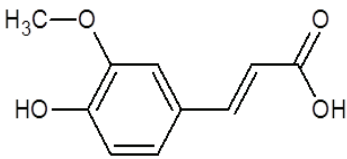
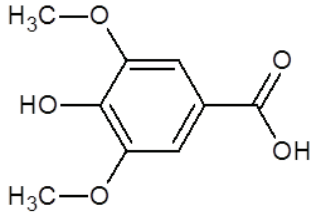
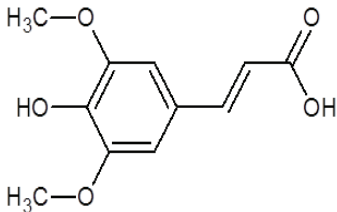
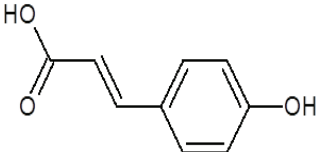
Nom IUPAC	Nom usuel	Structure	C	H	O	Masse précise (uma)
Furan	Furan		4	4	1	68.0262
Anisol	Anisol		7	8	1	108.0575
2,6-ditertbutyl-4-methylphenol	2,6-ditertbutyl-4-methylphenol		15	24	1	220.1827
2-Furaldehyde	Furfural		5	4	2	96.0211
2-Methoxyphenol	Guaiacol		7	8	2	124.0524

2-Cyclopenten-1-one	Cyclopentenone		5	6	1	82.0419
2-methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]phenol	Isoeugenol		10	12	2	164.0837
2,6-Dimethylphenol	Xylenol		8	9	1	121.0653
2,4,6-trimethylphenol	Trimethylphenol		9	12	1	136.0888
2-Furylmethanol	Furfural alcool		5	6	2	98.0368
2(3H)-Furanone	Furanone		4	4	2	84.0211

1,3-Dimethoxy-2-hydroxybenzene	Syringol		8	10	3	154.0630
2-Methoxy-1-naphthol	Methoxynaphthol		11	10	2	174.0681
(4-Methylphenyl) methanol	Cresol		7	8	1	108.0575
4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyde	Vanillin		8	8	3	152.0473
Phenol	Phenol		6	6	1	94.0419
2-Ethylphenol	Ethylphenol		8	10	1	122.0732

(E) 3-(3,4-dihydroxyphenyl) prop-2-enoic acid	Caffeic acid		9	8	4	180.0423
(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) prop-2-enal	Coniferaldehyde		10	10	3	178.0630
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	Syringaldehyde		9	10	4	182.0579
Butanoic acid	Butanoic acid		4	8	2	88.0524
Propanoic acid	Propanoic acid		3	6	2	74.0368
Pentanoic acid	Valeric acid		5	10	2	102.0681

4-Benzylphenol	Hydroxydiphenylmethan		13	12	1	184.0888
Naphtalen-1-ol	Naphtol		10	8	1	144.0575
4-(benzyloxy)phenol	Monobenzone		13	12	2	200.0837
Benzene-1,2-diol	Catechol		6	6	2	110.0368
9-Phenantrol	Phenantrol		14	10	1	194.0732
(2E)-3-Phenylprop-2-enoic acid	Trans-cinnamic acid		9	8	2	148.0524

3,4-dihydroxy benzoic acid	3,4-dihydroxy benzoic acid		7	6	4	154.0266
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	Vannilic acid		8	8	4	168.0423
4-benzylbenzene-1,3-diol	Benzylresorcinol		13	12	2	200.0837
(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid	Ferulic acid		10	10	4	194.0579
4-Hydroxy-3,5-dimethoxy benzoic acid	Syringic acid		9	10	5	198.0528
3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	Sinapic acid		11	12	5	224.0685
3-(4-hydroxyphényl)-prop-2-enoic acid	para-coumaric acid		9	8	3	164.0473

Chapitre 3 : Développement de la méthode SFC-UV

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

« Development of a supercritical fluid chromatography method with ultraviolet and mass spectrometry detection for the characterization of biomass fast pyrolysis bio oils »

Julien Crepier, Agnès Le Masle*, Nadège Charon, Florian Albrieux, Sabine Heinisch, J. Chrom. A 1510 (2017) 73-81.

Doi :10.1016/j.chroma.2017.06.003

Sommaire du chapitre

Sommaire du chapitre	122
Liste des figures et tableaux	123
Introduction	124
1 Echantillons et appareillage	125
2 Méthodologie d'optimisation	125
2.1 Screening des phases stationnaires et mobiles	130
2.2 Optimisation de la composition de la phase mobile	133
2.3 Optimisation de la température et de la BPR	135
2.4 Méthode finale en SFC-UV	136
3 Application à d'autres échantillons	137
4 Simplification de l'échantillon	139
5 Compréhension des mécanismes de rétention	141
Conclusion	144
Références	146

Liste des figures et tableaux

Figure III-1 : Comparaison de chromatogrammes (a) simulé et (b) expérimental d'une séparation d'huile de pyrolyse rapide avec une pente de gradient $s = 0.005$	127
Figure III-2 : Corrélation entre les paramètres du modèle LSS (cf. Eq.6)	128
Figure III-3 : Exemple d'exploitation d'un chromatogramme avec les critères A, B et C	129
Figure III-4 : Corrélation des critères (a) A et B et (b) B et C pour les systèmes chromatographiques identifiés par le numéro de la colonne (cf. Tableau III-1) et la lettre du co-solvant (A : ACN, B : ACN/MeOH, C : MeOH)	130
Figure III-5 : Méthodologie employée pour l'optimisation des paramètres clés en SFC-UV	130
Figure III-6 : Fonction de réponse pour les différents systèmes chromatographiques testés. Voir Tableau III-1 pour la référence des phases stationnaires	131
Figure III-7 : Evolution des critères A, B et C pour la colonne Acquity BEH-2EP en fonction du co-solvant. acétonitrile, méthanol, acétonitrile / méthanol (50/50; v/v), acétonitrile/eau (98/2; v/v)	132
Figure III-8 : Augmentation du nombre de pics détecté à 210 nm en fonction de la composition initiale de la phase mobile. (Référence 5 %). Partie isocratique () et partie gradient (■)	133
Figure III-9 : Nombre de pics (en bleu) et intensité d'un pic de référence (en rouge) observé à 210 nm en fonction du temps de gradient. Conditions: Acquity BEH 2-EP (3x100 mm; 1.7 μ m), A: CO ₂ ; B: ACN/H ₂ O (98/2 v/v); de 99:1 (A:B) à 60:40 (A:B); Température: 30°C; BPR: 150 bars; 1.4 mL/min.	134
Figure III-10 : Variation du nombre de pics en fonction de la BPR et de la température à 20°C (), 30°C (■) et 60°C () (référence 30 °C et 150 bars)	135
Figure III-11 : Chromatogrammes SFC-UV d'une huile de pyrolyse rapide sans optimisation (a) (phase stationnaire : Acquity Fluorophenyl, co-solvant : MeOH, température: 30°C, BPR : 150 bars) et (b) après optimisation (phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, co-solvant : ACN/H ₂ O (98/2), température: 30°C, BPR : 150 bars)	136
Figure III-12 : Représentation de 11 échantillons (Huiles A-K) et l'huile de référence (Réf en rouge) sur 3 plans bidimensionnels : CP1-CP2 (a), CP3-CP4 (b) et CP5-CP6 (c)	138
Figure III-13 : « Loading » de la composante principale 2.	139
Figure III-14 : Chromatogramme SEC-RID de l'huile de pyrolyse rapide	140
Figure III-15 : Chromatogrammes des fractions obtenues par SEC et analysées par SFC-UV	141
Figure III-16 : « Mass map » des molécules modèles classées par famille : furanique (en bleu), phénolique (en rouge), méthoxyphénolique (en vert), acide carboxylique (en jaune) et sucre (en violet)	143
Tableau III-1 : Caractéristiques des colonnes employées pour le screening de phase stationnaire	128
Tableau III-2 : RSD sur les temps de rétention en fonction de la composition initiale (T : 30°C et BPR : 150 bars)	134
Tableau III-3 : Temps de rétention des molécules modèles avec un atome d'oxygène	142
	123
Chapitre III : Développement SFC-UV	

Introduction

Avec la nécessité de trouver de nouvelles sources d'énergie pour le futur, le développement de bio-carburants de seconde génération (2G) issus de la conversion de la biomasse prend tout son sens. Il existe plusieurs voies de conversion de cette biomasse et l'une d'elle consiste en un procédé thermochimique (pyrolyse rapide) entre 400 et 450°C produisant des huiles de pyrolyse rapide. Ces liquides sont constitués de composés richement oxygénés, corrosifs et thermiquement instables pour certains. De par leurs propriétés, la caractérisation complète de ces échantillons complexes reste encore un challenge à l'heure actuelle. En effet, plusieurs techniques analytiques ont déjà contribué à la caractérisation d'une partie de ces mélanges. La chromatographie en phase gazeuse (GC) a notamment permis l'identification et la quantification d'environ 40 % de la matrice mais reste limitée pour les composés les plus polaires et de hautes masses moléculaires. La chromatographie en phase liquide (LC) est envisagée aujourd'hui comme une approche complémentaire en utilisant entre autre la chromatographie liquide bidimensionnelle (LCxLC). En parallèle de ces développements, il apparaît pertinent d'évaluer l'intérêt d'employer un fluide supercritique pour séparer les composés présents dans ces matrices complexes.

Avec l'émergence des nouvelles générations d'appareillages, la chromatographie en phase supercritique (SFC) connaît un véritable regain d'intérêt et son utilisation pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide n'est à notre connaissance pas encore reportée. L'étude décrite dans ce chapitre présente le développement de l'ensemble des paramètres clés de la méthode de séparation qui conduiront à maximiser la capacité de pics. L'originalité de l'étude proposée repose sur le fait que le développement de méthode est mené directement sur l'échantillon de biomasse et non sur un mélange de molécules modèles. Ce chapitre présente la méthodologie appliquée pour parvenir à une méthode SFC adaptée à la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide comme exemple de matrice complexe. La mise en place de la méthodologie ainsi que les résultats obtenus pour les différents paramètres clés (phases mobiles et stationnaires, les conditions de gradient, la température et la pression régulée (BPR)) sont ainsi décrits.

Cette méthode SFC-UV est développée à partir d'un échantillon de référence. L'analyse de différentes huiles de pyrolyse, permet de valider la pertinence des conditions retenues. Une analyse ACP est proposée pour exploiter les chromatogrammes obtenus pour un panel d'huiles différentes.

La complexité de la matrice amène également à vouloir simplifier l'échantillon de départ pour mieux l'analyser. L'analyse de différentes fractions obtenues par SEC avec la méthode développée a pour but d'investiguer cette possibilité.

Enfin, la compréhension et l'explication des mécanismes de rétention de la méthode développée à l'aide d'injection de molécules modèles ont été testées afin d'apporter plus d'informations lors d'une étape future d'identification.

1 Echantillons et appareillage

L'échantillon est une huile de pyrolyse rapide diluée dans le THF (1g d'huile pour 4g de THF) et toutes les expériences ont été réalisées à l'aide d'un équipement SFC de type UPC² commercialisé par la société Waters.

Pour plus de détails concernant les échantillons utilisés ainsi que les caractéristiques de l'appareillage employé pour l'acquisition de ces résultats, le lecteur pourra se référer au chapitre 2.

2 Méthodologie d'optimisation

L'objectif du travail concerne le développement d'une méthode de séparation par chromatographie en fluide supercritique adaptée à l'analyse d'huiles de pyrolyse rapide. Il est difficile de réaliser un mélange entièrement représentatif des huiles de pyrolyse du fait de notre connaissance partielle mais également de la disponibilité commerciale limitée des molécules modèles. C'est pourquoi l'approche proposée consiste à réaliser une optimisation des différents paramètres influençant la rétention en exploitant directement les chromatogrammes issus de l'analyse d'une bio-huile prise pour référence. Les paramètres clés d'une séparation SFC doivent donc être optimisés : la nature des phases, stationnaire et mobile, les conditions de gradient, géométrie de la colonne, la température de la colonne, la BPR. Le débit quant à lui a été fixé de manière à atteindre la pression maximale supportée par l'appareillage et ainsi accomplir l'analyse en un minimum de temps.

Pour qualifier les chromatogrammes obtenus durant les différentes expériences, un choix de différents critères a été fait afin de maximiser la capacité de pics. Cette grandeur est un descripteur pertinent pour qualifier la qualité de la séparation, pour un échantillon donné et un système chromatographique donné et ainsi être en mesure de comparer entre eux différents systèmes. La capacité de pics en mode gradient d'élution est définie par Dolan et al. [2] comme

$$n_{grad} = \frac{t_n - t_1}{w} \quad (1)$$

où t_n et t_1 représentent les temps de rétention des composés le plus retenu et le moins retenu durant l'analyse et w la largeur de pics moyenne à 4σ . Cette équation peut être utilisée pour comparer des systèmes chromatographiques où le nombre de pics élués est limité. Cependant, dans le cas d'échantillons complexes tels que les huiles de pyrolyse rapide, de multiples coélutions peuvent subsister. Cela complique grandement la détermination de la largeur des pics et donc par définition empêche l'utilisation de l'équation 1. De plus, pour calculer la capacité de pic total il faut également prendre en compte une capacité de pics supplémentaire provenant de la partie isocratique de l'analyse. Pour cette partie isocratique (qui correspond au palier initial), la capacité de pics peut être définie selon l'équation 2

$$n_{iso} = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \ln \frac{1+k_{n,iso}}{1+k_{1,iso}} \quad (2)$$

avec N le nombre de plateaux de la colonne, $k_{1,iso}$ et $k_{n,iso}$ représentent les facteurs de rétention du premier et du dernier pic observé sur la partie isocratique. Le nombre de plateaux N est relié à la longueur de la colonne L_c , au diamètre des particules remplissant la colonne d_p et à la hauteur de plateaux réduite de la colonne h , à travers l'équation 3.

$$N = \frac{L_c}{h \times d_p} \quad (3)$$

Snyder et al. ont mis au point il y a 35 ans, la relation semi-empirique LSST (Linear Solvent Strength Theory) entre le logarithme du facteur de rétention d'un composé et le temps de rétention :

$$\log(k) = \log(k_i) - b \frac{(t - t_{delay})}{t_0} \quad (4)$$

avec k_i le facteur de rétention dans les conditions de gradient initiales, t_0 le temps mort de la colonne, t_{delay} le temps de délai composé du temps extra-colonne (t_d) et d'un possible temps de palier isocratique (t_{ini}) ($t_{delay} = t_d + t_{ini}$), b représente la pente du gradient donné par

$$b = S \times s \quad (5)$$

s est la pente normalisée du gradient ($s = \frac{\Delta\varphi}{t_G} \times t_0$, $\Delta\varphi$ est la plage de gradient exprimé en fraction volumique de solvant ajouté et t_G est le temps de gradient) et S est la pente de la relation entre le logarithme du facteur de rétention et la fraction volumique de solvant ajouté :

$$\log(k) = \log(k_0) - S\varphi \quad (6)$$

avec k_0 le facteur de rétention dans le solvant initial et φ , la fraction volumique de solvant ajouté.

Suivant la théorie LSST, et considérant à la fois une valeur moyenne de S ainsi qu'une valeur de k_i grande pour tous les composés, on peut transformer l'équation 1 [2] en :

$$n_{grad} = 2.303S \left(\varphi_{n,grad} - \varphi_{1,grad} \right) \times \frac{1}{1+2.303b} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (7)$$

où $\varphi_{n,grad}$ et $\varphi_{1,grad}$ représente la composition à l'élution des composés respectivement le moins et le plus retenu durant la phase de gradient.

Dans le cas d'échantillons complexes, comme les huiles de pyrolyse rapide, il peut être admis que le composé le moins retenu est élué au volume de délai ($k_{1,iso}=0$) alors que le dernier composé élué durant le palier isocratique est élué au départ de l'étape de gradient, ce qui se traduit par $\varphi_{1,grad} = \varphi_{ini}$. Ainsi,

$$k_{n,iso} = \frac{t_{delay}}{t_0} \quad (8)$$

A l'aide des équations 2, 3, 7 et 8, on peut alors exprimer la capacité de pic comme :

$$n = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{hd_p}} \left(\ln \left(1 + \frac{t_{delay}}{t_0} \right) + 2.303S \left(\varphi_{n,grad} - \varphi_{ini} \right) \times \frac{1}{1+2.303b} \right) \quad (9)$$

Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier que l'équation 7 peut s'appliquer, ce qui signifierait alors que la théorie LSS du gradient d'élution est valable dans le cas d'une analyse SFC avec un gradient d'élution linéaire comme cela est le cas en RPLC (chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée). Les paramètres LSS, k_0 et S (Eq.6), peuvent être calculés à l'aide de deux analyses préliminaires[3,4] dans le but de pouvoir prédire avec précision les temps de rétention d'un système où la théorie LSS est applicable. Ainsi, deux analyses ont été réalisées avec une colonne Acquity BEH-2EP (cf. Tableau III-1) en appliquant un gradient linéaire entre 1 % et 40 % de co-

solvant (ACN) et deux pentes différentes de gradient ($s = 0.01$ et $s = 0.03$). A partir de ces deux acquisitions, les paramètres k_0 et S ont pu être calculés à l'aide du logiciel OSIRIS V4.1 (Datalys, Grenoble, France). Ce calcul a été réalisé pour 6 pics couvrant une large plage de rétention et étant facilement repérables dans les chromatogrammes. Une fois les paramètres déterminés pour chacun de ces pics à l'aide des deux acquisitions préliminaires, un chromatogramme simulé a été calculé à l'aide du logiciel pour une valeur de $s = 0.005$ (cf. Figure III-1a).

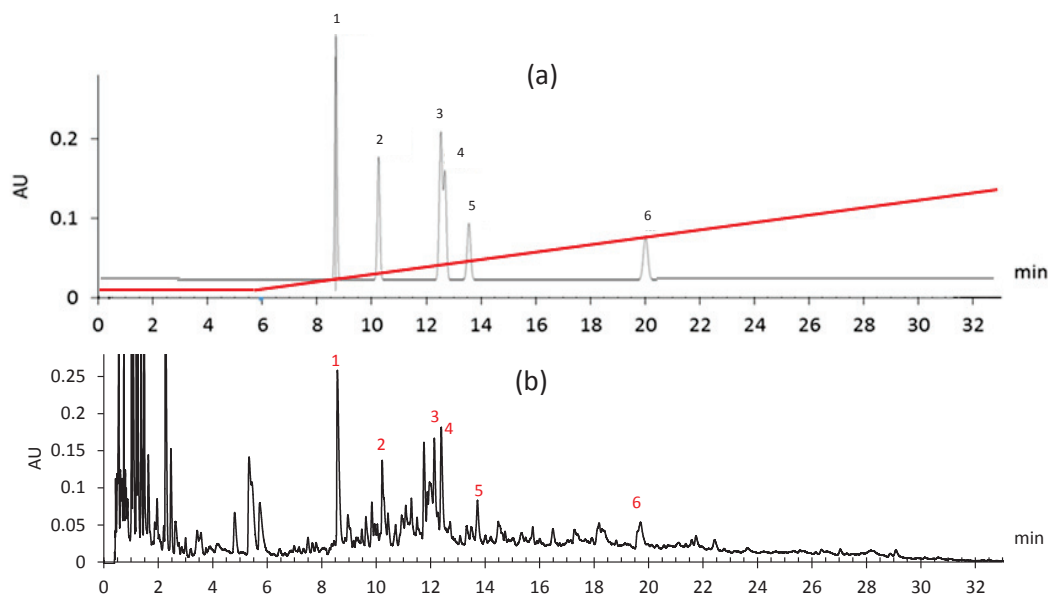


Figure III-1 : Comparaison de chromatogrammes (a) simulé et (b) expérimental d'une séparation d'huile de pyrolyse rapide avec une pente de gradient $s = 0.005$
(Phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, Co-solvant : ACN/H₂O (98/2), Température : 30°C, BPR : 150 bars)

Ce chromatogramme théorique est alors comparé à un chromatogramme expérimental de l'huile de pyrolyse réalisé avec la même pente de gradient (cf. Figure III-1b). Comme illustré sur la Figure III-1, les temps de rétention des pics simulés correspondent parfaitement à ceux observés expérimentalement, ce qui valide l'utilisation de LSST pour des gradients d'élution linéaires en SFC. Les valeurs résultantes de S et k_0 sont reportées sur la Figure III-2. Il est intéressant de noter que contrairement à des séparations en RPLC employant du méthanol ou du THF comme solvant éluant, la corrélation entre S et k_0 est illustré par une droite avec une pente négative. Cette observation peut donc amener à la conclusion qu'un gradient convexe pourrait être plus adapté à cette séparation qu'un gradient linéaire. Cependant, bien que des expériences aient été réalisées en programmant un gradient de type convexe, les chromatogrammes qui en résultaient ne présentaient pas une capacité de pics supérieure à ceux employant un gradient linéaire. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la pente de la corrélation observée sur la Figure III-2 est faible (environ 5) et ne favorisera pas l'utilisation de gradient convexe. Les conclusions de cette étude nous ont donc conduits à conserver un gradient linéaire pour la suite des expérimentations.

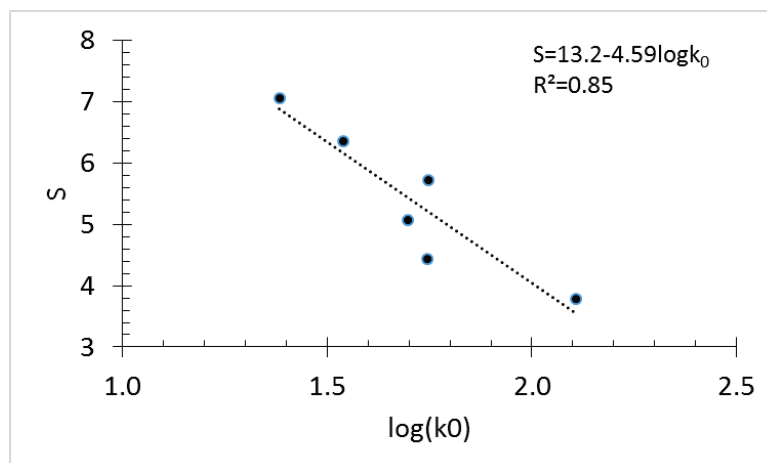


Figure III-2 : Corrélation entre les paramètres du modèle LSS (cf. Eq.6)

Dans un premier temps, certains paramètres ont été fixés. Ces paramètres incluent : ϕ_i (5%), $t_{\text{délai}}/t_0$ (15), la pente de gradient b (avec une valeur de s de 0.01 cf. Eq. (5)), température (30°C) et la BPR (150 bars). Afin d’être en mesure de choisir le système chromatographique (phase stationnaire et mobile), un screening de 7 phases stationnaires, et 3 co-solvants (acétonitrile, méthanol, mélange acétonitrile et méthanol (50/50, v/v)) a été réalisé. Les phases stationnaires ont été sélectionnées en accord avec la classification de West et al. [5], décrite dans le chapitre 1, afin de couvrir les principales interactions possibles en SFC. On retrouvera les caractéristiques de ces colonnes dans le Tableau III-1.

Tableau III-1 : Caractéristiques des colonnes employées pour le screening de phase stationnaire

Numéro	Nom commercial	Fabricant	Chimie de phase stationnaire	d_c (mm)	L_c (cm)	d_p (μm)	L_c/d_p
1	Acquity UPC ² BEH	Waters	Silice	3.0	10	1.7	5.88
2	Acquity UPC ² HSS C ₁₈ SB	Waters	C ₁₈	3.0	10	1.8	5.55
3	Acquity UPC ² BEH 2-EP	Waters	Ethyl Pyridine	3.0	10	1.7	5.88
4	Luna Cyano	Phenomenex	Cyanopropyl	4.6	15	3.0	5.00
5	Acquity UPC ² BEH RP18 Shield	Waters	C ₁₈ avec groupement polaire	3.0	10	1.7	5.88
6	Nucleodur Polartech	Macherey-Nagel	C ₁₈ avec groupement polaire	3.0	10	2.5	4.00
7	Acquity UPC ² CSH Fluorophényl	Waters	Fluorophényl	3.0	10	1.7	5.88

Pour parvenir à discuter de la qualité des séparations réalisées par chacun des systèmes au travers de chromatogrammes contenant jusqu’à une centaine de pics, la capacité de pics a été évaluée à l’aide de trois critères pertinents.

Le critère A rend compte du nombre de pics élués sur l'ensemble du chromatogramme à 210 nm. Le choix de ce critère a été motivé par l'hypothèse que dans le cas d'échantillon complexe, les pics sont répartis de manière aléatoire sur l'ensemble du chromatogramme. Dans ce cas-là, l'approche statistique de répartition des pics développés par Giddings et Davis [6] peut s'appliquer. En accord avec cette théorie, la capacité de pics d'un système chromatographique se trouve directement liée au nombre de pics observés sur le chromatogramme.

Le critère B mesure la largeur de la fenêtre d'éluion à 210 nm. Il correspond à la composition à l'éluion du dernier pic élué, $\varphi_{n,grad}$, qui est un paramètre clé dans l'équation 9.

Le critère C rend compte du nombre de pics dans la seconde partie du chromatogramme à 210 nm. Ce critère permet ainsi la mise en évidence de cluster de pic et vise donc à obtenir une bonne distribution des pics dans l'espace chromatographique.

Les pics sont détectés et dénombrés à l'aide du logiciel interne INDIGO, décrit dans le chapitre 2. Il permet le retraitement et l'intégration des pics d'un chromatogramme. Le seuil de détection de ce logiciel, mesurée en hauteur de pic minimale après lissage de la ligne de base, a été fixé de notre part à une valeur basse (trois fois la valeur du bruit) afin de comptabiliser l'ensemble des pics.

L'objectif est donc de maximiser chacun de ces trois critères afin d'avoir le maximum de pics (**A**) le plus uniformément répartis (**C**) sur la fenêtre de rétention la plus large possible (**B**) (Cf. Figure III-3).

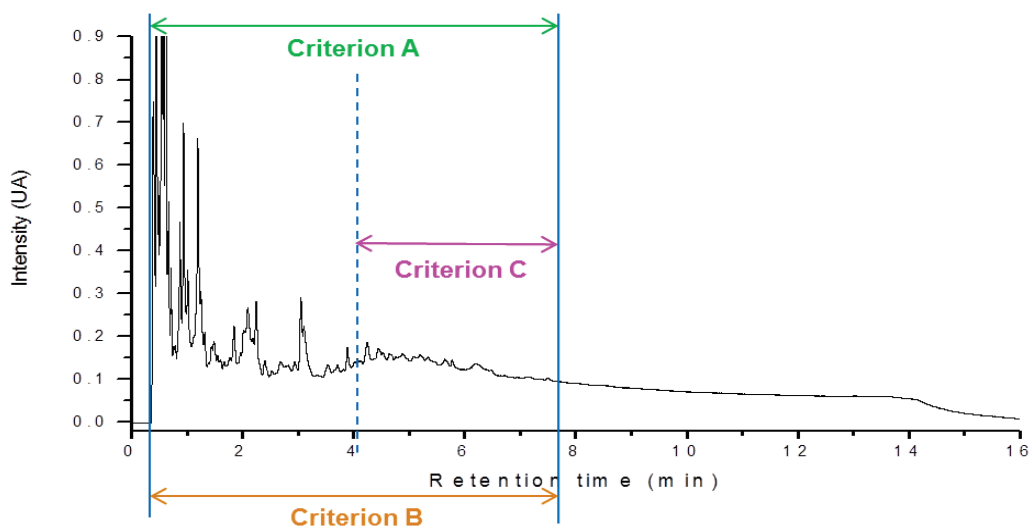


Figure III-3 : Exemple d'exploitation d'un chromatogramme avec les critères A, B et C

Afin de pouvoir employer au mieux ces critères, chacun a été normalisé par le maximum et le minimum rencontrés durant l'ensemble des expériences constituant cette étape d'optimisation. Afin de vérifier la pertinence de ces critères, la corrélation entre chacun a été vérifiée et se trouve illustrée dans la Figure III-4. La non-dépendance des critères A et B (Figure III-4a) et des critères B et C (Figure III-4b) est bien prouvée de par la dispersion des différents points et le faible coefficient de corrélation de chaque droite. Enfin, une fonction de réponse correspondant à la moyenne géométrique des trois critères a été calculée pour qualifier chacun des systèmes chromatographiques testés.

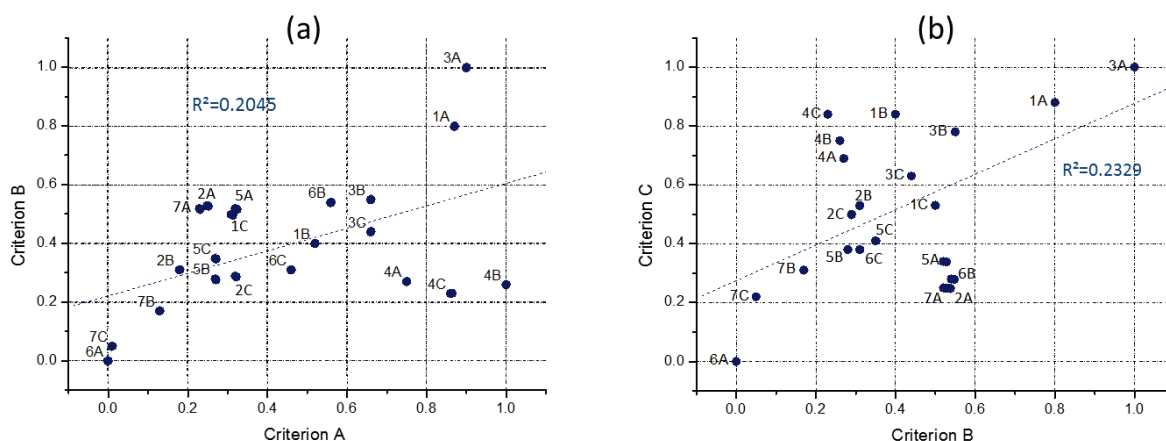


Figure III-4 : Corrélation des critères (a) A et B et (b) B et C pour les systèmes chromatographiques identifiés par le numéro de la colonne (cf. Tableau III-1) et la lettre du co-solvant (A : ACN, B : ACN/MeOH, C : MeOH)

Les différentes étapes de la méthodologie suivie sont résumées dans la Figure III-5.

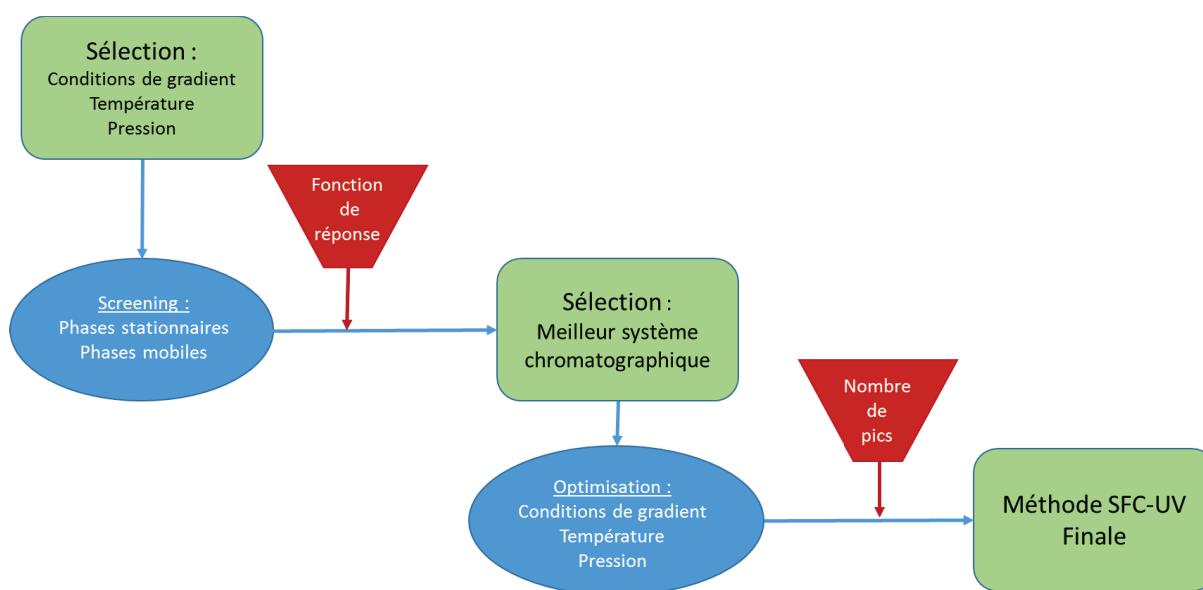


Figure III-5 : Méthodologie employée pour l'optimisation des paramètres clés en SFC-UV

2.1 Screening des phases stationnaires et mobiles

La première étape de l'optimisation de la méthode de séparation consiste donc en un screening de phases stationnaires et mobiles. Comme évoqué auparavant, les propriétés de la phase mobile SFC (composée de CO₂ sous pression et de co-solvant organique) permettent d'utiliser une large gamme de phases stationnaires. Comme décrit dans les travaux de West et al. [7], un set de cinq phases stationnaires permet de balayer les différentes interactions envisageables : interactions dipôle-dipôle, interactions dues aux électrons n et π , interactions acide/basique et les interactions stériques. Dans l'étude menée, 5 colonnes à base de silice ont donc été choisies : une silice vierge, et 4 silices greffées (C₁₈, C₁₈ avec groupements polaires insérés, éthylpyridine et cyanopropyle). Les dimensions de ces

cinq colonnes sont celles typiquement utilisées lors d'une analyse SFC (3 mm x 100 mm) et la taille des particules est également usuelle (1.7 ou 1.8 μm). Deux autres phases stationnaires ont été ajoutées à ce set : Luna CN (#4) et Nucleodur Polartech (#6). D'après la classification de West et al. [8], ces deux phases stationnaires se rapprochent respectivement de la BEH-2EP (pour la Luna) et BEH RP18 (pour la Nucleodur). Elles permettront alors d'observer les différences entre deux phases stationnaires proches dans la classification. Toutes les caractéristiques des colonnes sont recensées dans le Tableau III-1. A ces phases stationnaires ont été associés trois co-solvants différents. En effet, la nature de ce co-solvant, ajouté au CO_2 sous pression, va influencer la polarité et donc la force d'éluion de la phase mobile. Les co-solvants sélectionnés pour cette phase d'optimisation sont le méthanol (MeOH), co-solvant employé dans la majorité des travaux SFC à cause de sa haute polarité, l'acétonitrile (ACN), solvant moins polaire et un mélange 50/50 en volume de ces deux solvants.

Avec ces choix de phases stationnaires et de co-solvants, on obtient donc 21 systèmes chromatographiques possibles. Chacun a été employé pour analyser l'huile de pyrolyse rapide et les chromatogrammes résultant ont été qualifiés grâce aux critères présentés précédemment. Les fonctions de réponse qui en découlent pour chaque couple colonne/co-solvant sont regroupées dans la Figure III-6.

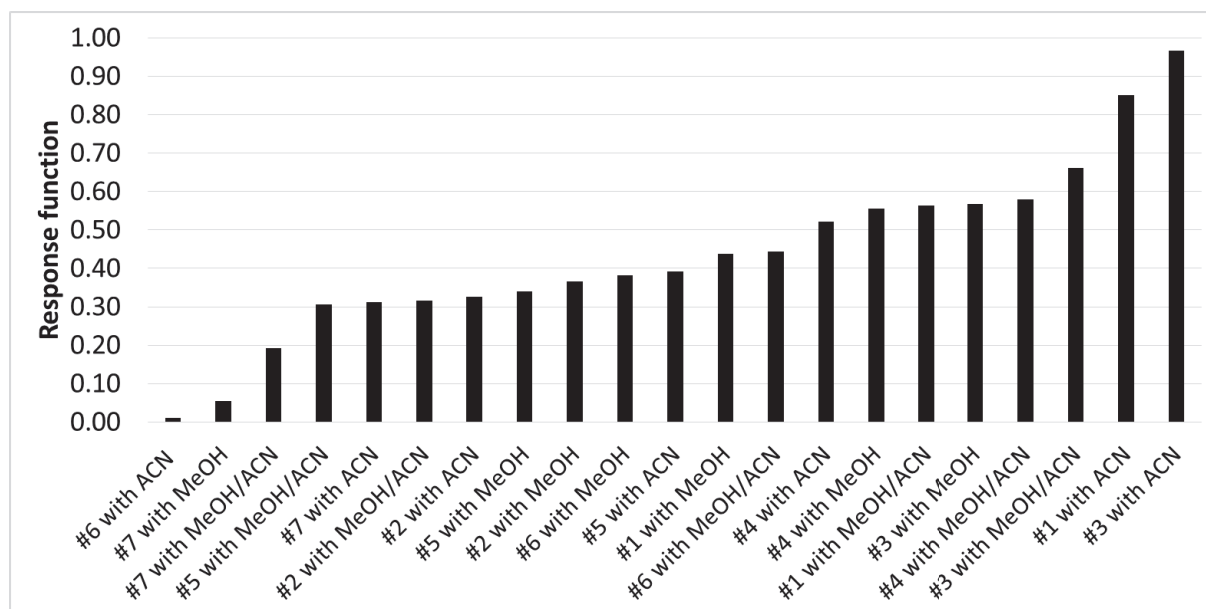


Figure III-6 : Fonction de réponse pour les différents systèmes chromatographiques testés. Voir Tableau III-1 pour la référence des phases stationnaires.

Avec cette représentation, les meilleures configurations possibles apparaissent très clairement. Ainsi les colonnes #1, #3 et #4 sont celles qui induisent la meilleure réponse. Il s'agit de phases stationnaires à base de silice soit non greffée (#1) soit greffées avec des groupements polaires (#3 EthylPyridine et #4 Cyanopropyl). Ces phases vont essentiellement avoir des interactions dipôle-dipôle et H donneur-accepteur selon la classification LSER [9]. Comme on suspecte un grand nombre de composés polaires (alcools, phénols, acides organiques, furanes, cétones) [10] au sein des huiles de pyrolyse rapide, cette observation semble logique. La présence de ces fonctions oxygénées semble appropriée pour ce type d'interactions.

A partir de ces observations, nous avons choisi de nous intéresser à la colonne donnant les meilleurs résultats. En se focalisant sur la BEH-2EP, on remarque que la fonction de réponse est plus

faible avec du méthanol qu'avec le mélange MeOH/ACN, elle-même plus faible qu'avec l'acétonitrile pur. De façon plus détaillée, la Figure III-7 présente pour cette colonne, la mesure des trois critères en fonction du co-solvant employé. Ainsi, il apparaît clairement que la diminution du pourcentage de méthanol au profit de celui de l'acétonitrile permet d'élargir la largeur de la fenêtre d'élution. Cela s'explique simplement par le fait que l'acétonitrile est beaucoup moins polaire que le méthanol et a donc une force éluante moindre. De plus, l'acétonitrile est un solvant qui ne permet pas d'interaction H-donneur/accepteur et aura donc moins d'affinité avec les composés oxygénés fortement sensibles à ce type d'interaction. D'autre part, les composés oxygénés présents peuvent interagir fortement avec les groupements silanols présents sur la phase stationnaire. Il en résulte une déformation des pics non souhaitable lors de l'analyse. Pour contrer cet effet, l'utilisation d'eau en tant qu'additif (seulement 2 %) dans le co-solvant a été investiguée. Les molécules d'eau vont alors interagir avec les groupements silanols et empêcher les interactions entre les analytes oxygénés et les silanols. Sur la Figure III-7, l'effet de l'ajout d'eau n'est pas significatif pour les critères B et C alors que le nombre de pics détectés (Critère A) se trouve augmenté. Comme le critère C n'est pas affecté par cet ajout d'eau, on peut supposer que l'effet sera d'autant plus fort que les molécules seront moins retenues. En conclusion, ce faible ajout d'eau (2 % dans le co-solvant) va donc permettre d'augmenter la capacité de pics dans la partie isocratique de l'analyse en réduisant l'élargissement des pics les moins retenus.

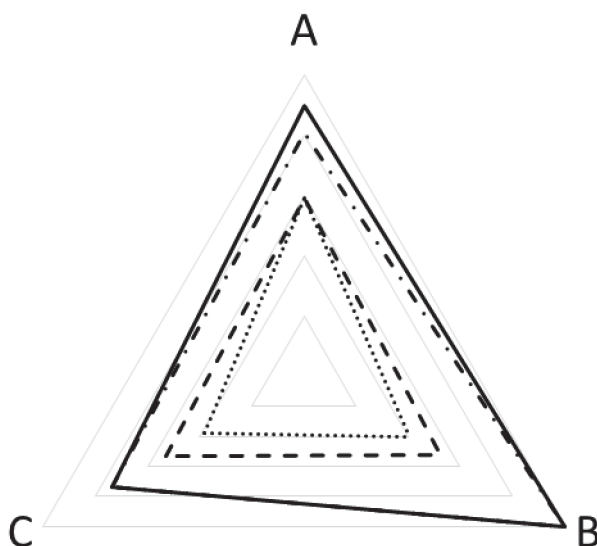


Figure III-7 : Evolution des critères A, B et C pour la colonne Acquity BEH-2EP en fonction du co-solvant. acétonitrile (— . . .), méthanol (.....), acétonitrile / méthanol (50/50; v/v) (— - -), acétonitrile/eau (98/2; v/v) (—)

De la même manière, d'autres additifs ont été testés comme l'acide trifluoroacétique, l'acétate d'ammonium, la diéthanolamine ou l'acide formique, mais aucun d'eux n'a eu d'impact sur la fonction de réponse de nos systèmes chromatographiques.

Après cette première étape de screening, nous avons pu déterminer le meilleur système chromatographique possible pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide. Il se composera d'une colonne Acquity BEH-2EP (3 x 100 mm ; 1.7 μ m) associée à un co-solvant acétonitrile/eau (98/2 : v/v). Cette configuration sera celle conservée pour la suite des optimisations concernant les autres paramètres de SFC.

2.2 Optimisation de la composition de la phase mobile

Comme illustré sur la Figure III-5, une fois le meilleur système chromatographique choisi, la seconde étape de l'optimisation consiste à déterminer les paramètres clés fixés pour réaliser le screening de systèmes. Comme vu dans le chapitre 2, la méthode utilisée se sépare en deux parties : un palier isocratique suivi d'une étape de gradient.

Dans le screening précédent, la composition de la phase mobile le long de ce palier isocratique a été fixée à 5 % de co-solvant en accord avec la plupart des informations trouvées dans la littérature. Si l'on reprend l'équation 9, la réduction de cette valeur de composition correspondant à une diminution de ϕ_{ini} , induira nécessairement une augmentation de la capacité de pics. Nous avons donc fait varier cette composition initiale entre 5 % et 0 %, tout en maintenant le même ratio $t_{délai}/t_0$ et en adaptant le temps de gradient afin de conserver la même pente de gradient normalisée ($s = 0.01$).

Afin de mesurer l'impact de cette modification, on ne considèrera que le critère A (nombre de pics dénombrés). En effet, en modifiant la composition initiale, la composition à l'élution du dernier pic élué ainsi que le nombre de pics dans la seconde partie du chromatogramme ne s'en trouveront pas changés. Les critères B et C resteront donc les mêmes. La Figure III-8, présente les résultats obtenus, en prenant comme référence le nombre de pics dénombrés pour une composition initiale de 5 %. La variation du nombre de pics est alors exprimée en pourcentage par rapport à cette référence. On distingue également les deux parties du chromatogramme (isocratique et gradient). Concernant la partie isocratique, l'impact de la composition initiale est faible (inférieur à 10 %) comme le suggère l'équation 9. A contrario, le nombre de pics détectés dans la partie gradient augmente (30 %) lorsque la composition initiale diminue, ce qui s'explique par l'élargissement de la gamme de composition. Ce nombre de pics est donc maximum pour une composition initiale de 0 % (106 pics détectés) et de 1 % (104 pics détectés). Cependant, dans le cas où la phase mobile initiale est seulement composée de CO_2 (i.e. $C_i = 0\%$), on observe une perturbation de la ligne de base au moment où le gradient débute. Cette perturbation est sûrement due à la mise en route des pompes assurant le débit de co-solvant et à l'à-coup de pression qui en résulte. Au vu du faible gain entre 0 et 1 %, le choix a été fait de travailler avec une composition initiale de 1 % afin d'éviter ce phénomène.

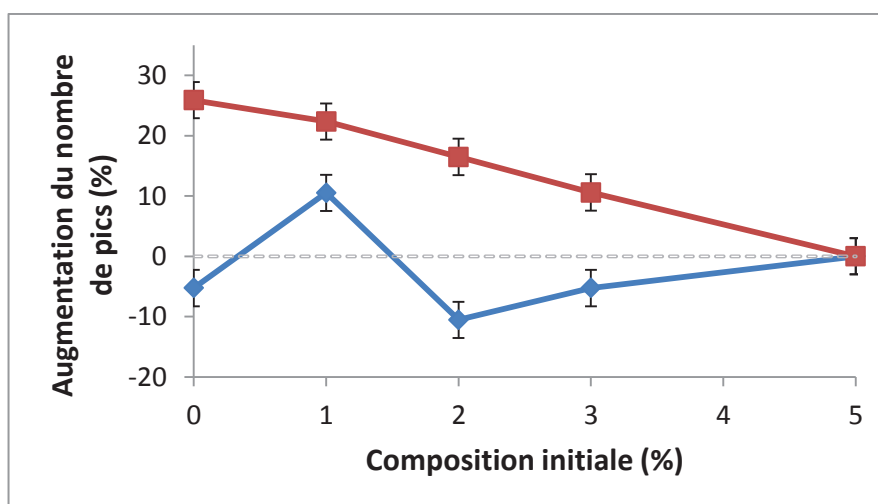


Figure III-8 : Augmentation du nombre de pics détecté à 210 nm en fonction de la composition initiale de la phase mobile. (Référence 5 %). Partie isocratique (◆) et partie gradient (■)

Avec un taux de co-solvant aussi faible, la question de la reproductibilité en termes de temps de rétention des analytes peut alors se poser car les pompes doivent gérer un débit de solvant faible. Cette problématique a été prise en compte en réalisant trois répétitions dans ces conditions (i.e. $C_i = 1\%$) à des jours différents. Le RSD (Relative Standard Deviation) de cinq pics, distribués tout au long du chromatogramme et facilement repérables, a été calculé. Comme on peut l'observer dans le Tableau III-2, le fait de diminuer la composition initiale n'impactera pas la reproductibilité de nos analyses. Avec un RSD inférieur à 0.6 %, l'appareillage gère parfaitement ces conditions.

Tableau III-2 : RSD sur les temps de rétention en fonction de la composition initiale ($T : 30^\circ\text{C}$ et $\text{BPR} : 150 \text{ bars}$)

Composition initiale (%)	Pic 1		Pic 2		Pic 3		Pic 4		Pic 5	
	RSD (%)	Tr (min)	RSD (%)	Tr (min)	RSD (%)	Tr (min)	RSD (%)	Tr (min)	RSD (%)	Tr (min)
5	0.27	0.70	0.16	0.92	0.48	3.08	0.41	5.61	0.53	9.47
1	0.29	1.08	0.52	2.57	0.19	5.52	0.27	7.89	0.15	12.48

Enfin, comme expliqué auparavant, un gradient linéaire constitue la meilleure des solutions pour l'analyse des huiles de pyrolyse rapide. Il faut cependant déterminer la pente normalisée optimale de ce gradient. Pour cela deux aspects sont pris en compte : le nombre de pics élués durant la partie gradient et en parallèle l'intensité d'un pic de référence facilement repérable dans le gradient. La Figure III-9 met en évidence l'augmentation du nombre de pics avec l'augmentation du temps de gradient. Cependant, cette augmentation du nombre de pics, s'accompagne d'une baisse de sensibilité du pic de référence. Un temps de gradient entre 10 et 15 minutes paraît être un bon compromis, le gain en nombre de pics étant moins significatif pour des temps de gradient plus prolongés. Une pente normalisée de 0.01 sera donc conservée (temps de gradient 14 min).

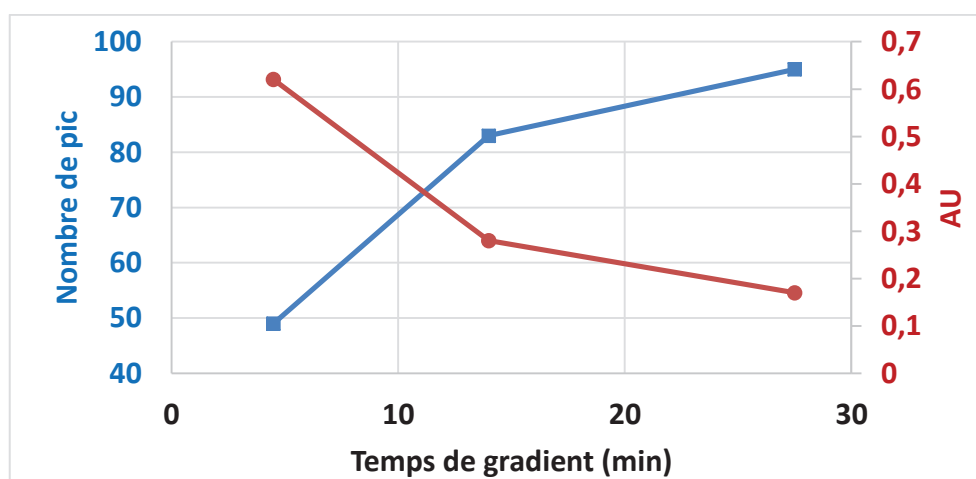


Figure III-9 : Nombre de pics (en bleu) et intensité d'un pic de référence (en rouge) observé à 210 nm en fonction du temps de gradient. Conditions: Acquity BEH 2-EP (3x100 mm; 1.7 μm), A: CO_2 ; B: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (98/2 v/v); de 99:1 (A:B) à 60:40 (A:B); Température: 30°C ; BPR: 150 bars; 1.4 mL/min.

Afin de déterminer la composition finale du gradient, certains tests ont été menés en fixant la limite haute du gradient à 40, 50 et 60 % de co-solvant et en conservant la même pente normalisée. Dans les trois cas, le dernier pic détecté lors du dénombrement à une composition à l'élution de 38 %.

On fixera donc la valeur haute de notre composition en gradient à 40 %. Une attention particulière sera portée aux chromatogrammes obtenus avec une détection par spectrométrie de masse afin de confirmer l'éluion de l'intégralité de l'échantillon et notamment les composés ne répondant pas en UV.

2.3 Optimisation de la température et de la BPR

Lors d'une analyse en SFC, la température et la BPR ont un potentiel effet sur la densité de la phase mobile et donc sur la rétention des composés. Dans le cadre de nos travaux, nous avons décidé de traiter ces paramètres comme un couple interdépendant. Ainsi, 9 couples de conditions opératoires ont été testés afin de mesurer l'impact sur l'analyse de l'huile. Les gammes de température et de BPR investiguées sont respectivement entre 20 et 60 °C et entre 105 et 150 bars.

Tout comme pour la détermination de la composition initiale, l'évaluation des chromatogrammes SFC-UV (à 210 nm) a été réalisée en observant la variation du nombre de pics détectés par rapport à une référence, ici 30°C et 150 bars. La Figure III-10 illustre les résultats obtenus lors de ces tests.

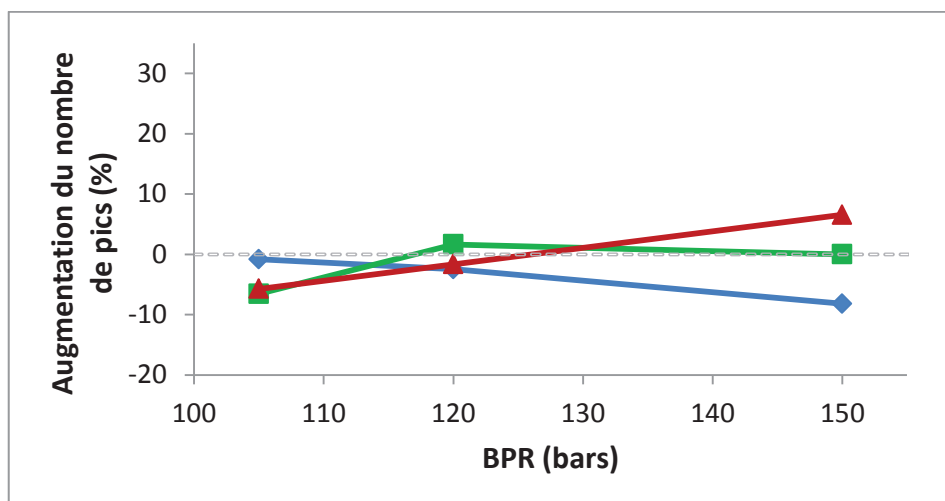


Figure III-10 : Variation du nombre de pics en fonction de la BPR et de la température à 20°C (◆), 30°C (■) et 60°C (▲) (référence 30 °C et 150 bars)

Au travers de ces courbes, on remarque que l'influence de la BPR et de la température n'est pas aussi significative que celle de la composition initiale sur le nombre de pics. En effet, lorsque l'on compare les différents résultats obtenus, la variation en nombre de pics n'excède jamais 10 % par rapport à la référence choisie (30°C et 150 bars, nombre de pics de référence : 120). En comparant ces variations par rapport aux conditions de référence, un gain est observé seulement avec le couple 60 °C et 150 bars. Or cette température correspond à la température maximale d'utilisation de la colonne. Au vu du gain peu important de telles conditions, il est donc préférable d'abaisser cette température à 30°C. Dans ces conditions, le nombre de pics dénombrés est du même ordre de grandeur et tout risque de dégradation thermique de la phase stationnaire est évité. L'intérêt de s'éloigner des conditions usuelles de la SFC n'est donc pas avéré. Une BPR de 150 bars associée à une température de 30°C sera conservée.

Ce faible impact de la BPR et de la température peut s'expliquer par la complexité de l'échantillon analysé. En effet, plusieurs études ont démontré l'impact de ces paramètres sur la

rétenion de composés, cependant, ces travaux mettaient en œuvre des séparations sur des mélanges simples sans coélution. Dans le cas d'échantillons complexes, Davis et Giddings [6] ont démontré que seulement 18 % de la capacité de pics théorique correspond à un composé seul. Dans notre cas, au vue du nombre de composés suspectés dans l'échantillon (plusieurs centaines), plusieurs coélutions sont encore présentes même sous les meilleures conditions de séparation. L'impact de la température et de la BPR est donc réel mais se trouve certainement moyenné tout au long de l'analyse de telle sorte que le nombre de pics total ne varie pas.

En conclusion, pour la suite des travaux les conditions opératoires usuelles en SFC, à savoir 30°C et 150 bars, seront appliquées.

2.4 Méthode finale en SFC-UV

En suivant les différentes étapes présentées dans la Figure III-5, nous avons pu déterminer les conditions permettant de détecter un large nombre de pics (122 pics détectés) pour une matrice complexe telle que les huiles de pyrolyse rapide avec un temps d'analyse assez court (22 minutes). L'intérêt de cette méthodologie est illustré au travers de la Figure III-11 en comparant deux chromatogrammes de l'huile de pyrolyse rapide. Dans le premier cas, des conditions non optimisées notamment en termes de phase stationnaire et de co-solvant conduisent à une séparation de 15 pics seulement. Dans des conditions optimisées (cf. Figure III-11b), en suivant la méthodologie décrite dans ce chapitre, un couple phase stationnaire et phase mobile approprié (Acquity BEH-2EP et ACN/H₂O (98/2 : v/v)), une faible composition initiale (1 %), une pente normalisée de 1% et des conditions de température et de BPR usuelles (30 °C et 150 bars) permettent d'obtenir une séparation avec plus de 120 pics dénombrés (à 210 nm).

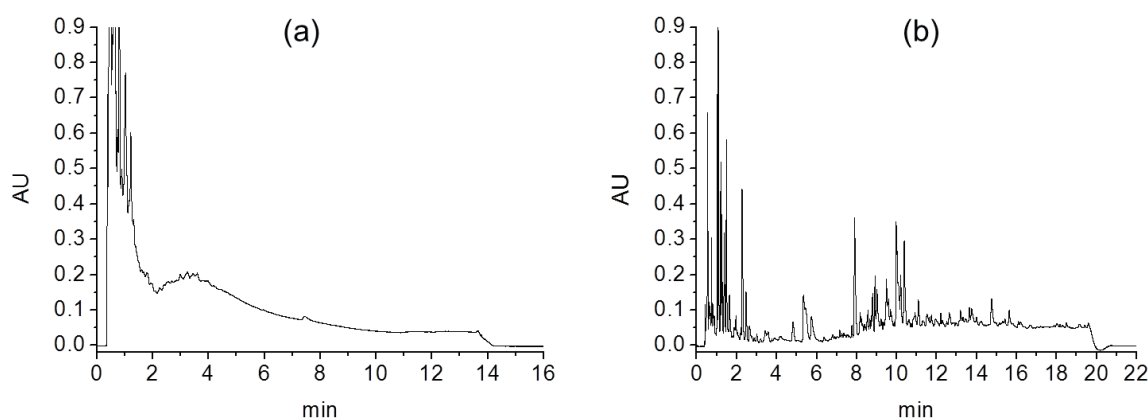


Figure III-11 : Chromatogrammes SFC-UV d'une huile de pyrolyse rapide sans optimisation (a) (phase stationnaire : Acquity Fluorophenyl, co-solvant : MeOH, température: 30°C, BPR : 150 bars) et (b) après optimisation (phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, co-solvant : ACN/H₂O (98/2), température: 30°C, BPR : 150 bars).

3 Application à d'autres échantillons

Notre méthodologie a été développée en utilisant une seule bio-huile. Afin de vérifier que cette méthode n'est pas spécifique à cet échantillon, plusieurs huiles de pyrolyse rapide ont été analysées en employant la méthode finale décrite ci-dessus. Ces 11 huiles de pyrolyse rapide disponibles en interne à IFPEN sont des échantillons analysés « en aveugle » où aucune connaissance précise n'est disponible. Le but ici est de voir si l'analyse SFC-UV permet de différencier ces différentes huiles sans autres informations que le chromatogramme obtenu à 210 nm.

Une fois les analyses réalisées, chaque chromatogramme a été retraité avec le logiciel Indigo de la même manière que celle décrite au cours de ce chapitre. Afin de pouvoir comparer chaque analyse, le choix a été fait de sélectionner les pics principaux de chaque chromatogramme. Pour chaque cas, les pics sélectionnés représentent 70 % de l'aire totale des pics détectés à 210 nm. On obtient alors entre 20 et 30 pics pour chaque analyse. Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a alors été menée à partir de ces données en prenant comme variables d'entrée les aires des pics détectés pour chaque temps de rétention pour les 11 échantillons. L'ACP est une méthode non supervisée, ne nécessitant aucune connaissance des données préalable, ni de données de référence. Elle a pour objectif de réduire la dimensionnalité d'une matrice en supprimant la corrélation entre les variables. Les données sont projetées dans un nouvel espace de composantes principales (CP). Les CP sont des combinaisons linéaires des variables d'origine et sont calculées de manière itérative : la première CP est construite pour expliquer la variance maximale des données, la seconde est contrainte orthogonalement à la première (pour éviter l'information redondante) et explique la variance résiduelle, et ainsi de suite pour les autres CP. L'espace des variables est alors réduit à quelques composantes principales. Dans le cadre de cette étude, l'espace initial comprend 89 variables, i.e. les temps de rétention représentant 70 % de chaque échantillon. En amont de l'ACP, les données ont été centrées en retirant à chaque observation la moyenne de la variable correspondante. Ainsi, 97 % de la variance totale est expliquée par les 6 premières composantes principales, dont 74 % par les 2 premières. Chaque échantillon d'huile sera alors représenté par un point dans un espace à 6 dimensions. La projection des données dans les plans des composantes principales est appelée « score ». La Figure III-12 représente les projections sur les plans CP1-CP2, CP3-CP4 et CP5-CP6. Les composantes principales ont été calculées à l'aide des 11 échantillons d'huile inconnus et une projection de l'huile de référence, employée tout au long de la thèse, a été réalisée sur cette ACP.

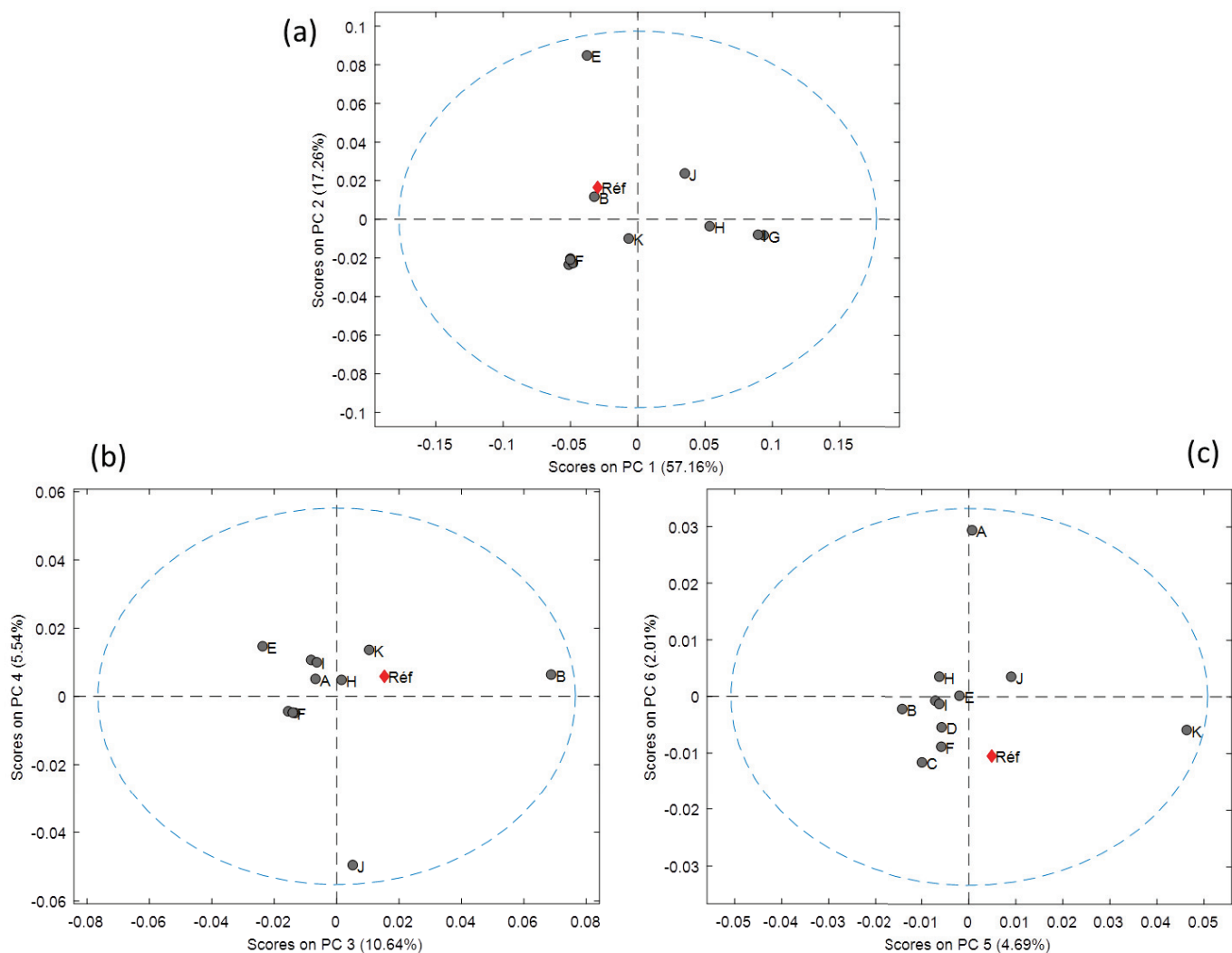


Figure III-12 : Représentation de 11 échantillons (Huiles A-K) et l'huile de référence (Réf en rouge) sur 3 plans bidimensionnels : CP1-CP2 (a), CP3-CP4 (b) et CP5-CP6 (c)

A l'aide de la projection sur les axes CP1 et CP2 regroupant 74 % de la variabilité, plusieurs groupes d'huiles semblent émerger. Les huiles A, C, D et F sont donc très proches en considérant nos 89 variables. De même, les huiles I et G sont aussi très proches sur ce plan bidimensionnel. Cette proximité symbolise donc une similarité de ces huiles en termes de pics détectés, et donc de composition chimique. Au contraire, certaines huiles semblent s'isoler selon certaines directions, comme par exemple l'huile E selon CP2 sur le plan CP1-CP2 ou encore les huiles B et J respectivement selon les axes CP3 et CP4 sur le plan CP3-CP4. Il est alors intéressant de regarder l'espace des variables.

Les composantes principales sont des combinaisons linéaires des 89 variables. Le « poids » de chacune de ces variables dans chacune des 6 composantes principales, et donc dans la variance totale, se nomme « loading » de l'ACP. La Figure III-13 illustre un exemple, dans ce cas-là pour la composante principale 2. L'étude de ces loadings permet de mettre en évidence les zones du chromatogramme ayant le plus de poids dans la variabilité totale des données. Dans cet exemple, les variables ayant le plus de poids sont ceux référencés n°61 et 62 qui correspondent à des pics présents à des temps de rétention de l'ordre de 9 min.

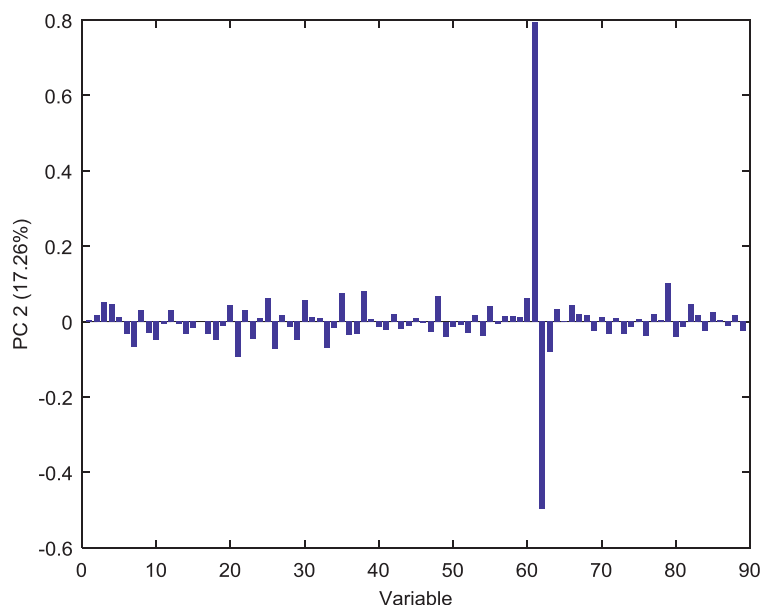


Figure III-13 : « Loading » de la composante principale 2.

Si cette étude indique que cette approche est exploitable et valorisable pour les chromatogrammes SFC-UV d'huiles de pyrolyse rapide, elle nécessite cependant des améliorations, en particulier pour mieux discriminer les différentes huiles. En effet, dans le cadre de cette étude, aucune connaissance précise n'est disponible pour les différentes huiles et peu de prétraitement des données a été réalisé. Une des perspectives serait d'augmenter soit le nombre d'échantillons (plus d'huiles), soit le nombre de variables (plus de temps de rétention) afin de décrire au mieux la variabilité. La seconde perspective serait d'employer la totalité des informations acquises en UV. Pour rappel, l'ensemble de l'étude est basé sur les chromatogrammes extraits à 210 nm (car longueur d'onde la plus « universelle »). Or en ajoutant la matrice entière d'acquisition en UV (entre 210 et 400 nm), il serait possible d'ajouter les longueurs d'onde d'absorbance comme variable d'entrée de l'ACP et ainsi déterminer si l'une d'entre elles est discriminante pour ces échantillons.

Bien que cette approche semble apporter des informations macroscopiques sur les échantillons, il faut noter qu'aucune connaissance moléculaire ne peut en être tirée. Il faudra donc coupler ces résultats à ceux obtenus grâce au couplage avec la spectrométrie de masse afin de les valoriser au mieux.

4 Simplification de l'échantillon

Sur la Figure III-11, on remarque que le chromatogramme final bien qu'obtenu à partir des conditions optimisées demeure très complexe avec plus de 120 pics dont certains symbolisent des coélutions entre différentes espèces. Afin de faciliter la caractérisation de cet échantillon, une des possibilités est d'ajouter une dimension de séparation en amont de la SFC. On peut alors fractionner la matrice complète de l'huile de pyrolyse rapide par différents moyens avant d'analyser chacune des fractions à l'aide de la méthode SFC-UV développée dans ce chapitre.

Dans cette optique, un fractionnement à l'échelle semi-préparative par chromatographie d'exclusion stérique a été réalisé sur l'huile de pyrolyse rapide dans le cadre d'une autre étude interne

à l'IFPEN [11]. La Figure III-14 présente les chromatogrammes obtenus lors de ce fractionnement ainsi que les trois fractions qui ont été produites.

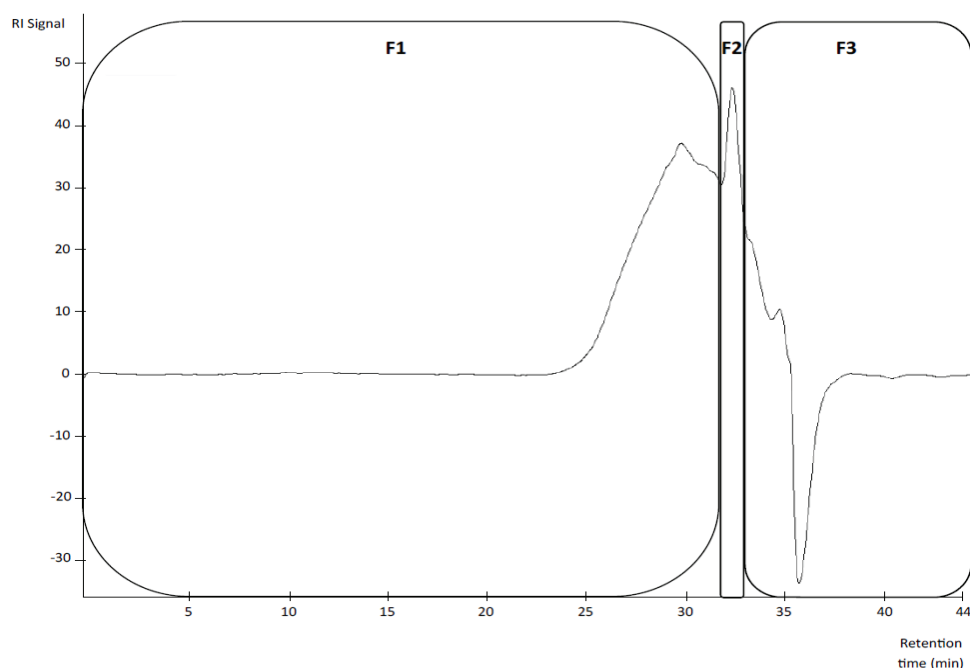


Figure III-14 : Chromatogramme SEC-RID de l'huile de pyrolyse rapide (500 μ L injecté à 200 g/L ; trois colonne en série 25x300 mm, granulométrie 10 μ m, 50 ; débit 8mL/min ; T° 30°C)

La fraction F1 est censée regrouper les molécules de plus grosses tailles, la fraction F2 est intermédiaire enfin, la dernière fraction F3 rassemble les molécules de plus petites tailles. La Figure III-15 illustre les différents chromatogrammes obtenus en SFC-UV à 210 nm pour chacune des fractions ainsi que le profil de l'huile complète. Ainsi, même si peu de pics sont détectés dans la première partie du chromatogramme pour la fraction la plus lourde, la taille des molécules ne va pas à elle seule diriger la rétention dans notre système. En effet dans les trois fractions, on distingue des pics sur une large fenêtre d'élution. A noter également que certains composés présents dans l'huile, ne se retrouvent dans aucune fraction. Ces pics localisés au début de l'analyse peuvent être attribués aux molécules qui ont été perdues lors de l'évaporation à sec des fractions avant analyse (étape réalisée afin d'éliminer le solvant des fractions et de déterminer un bilan matière sur l'ensemble du fractionnement de l'huile à partir des pesées des fractions évaporées). Si cela constitue une perte d'information, on peut supposer que ces molécules (comme l'acide acétique par exemple) sont déjà parfaitement caractérisées par GCxGC/MS et l'apport de la SFC sur ce type de molécule n'est pas critique. A contrario, la fraction F1 est constituée de molécules avec une taille importante. Cette gamme de masses représente les molécules difficiles à éluer et à analyser en GCxGC. Or notre chromatogramme nous indique que ces molécules parviennent à être éluées et séparées à l'aide de la méthodologie développée dans ce chapitre. On pourra donc apporter des informations complémentaires sur cette partie de l'huile de pyrolyse rapide.

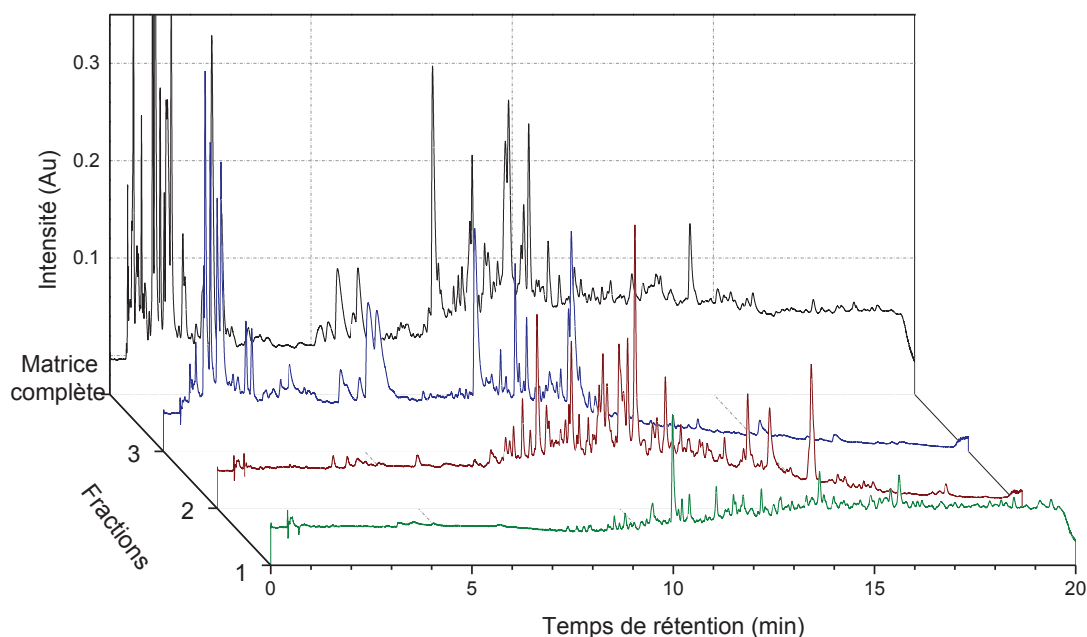


Figure III-15 : Chromatogrammes des fractions obtenues par SEC et analysées par SFC-UV

Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser ce fractionnement avec une période d'échantillonnage constante en SEC dans l'objectif de réaliser une analyse comprehensive SECxSFC hors-ligne afin d'évaluer plus facilement l'orthogonalité des deux dimensions de séparation et de maximiser la capacité de pics.

5 Compréhension des mécanismes de rétention

Une fois les conditions de séparation en SFC-UV figées, un chromatogramme maximisant la capacité de pics est obtenu pour l'huile de pyrolyse de référence. Avant de réaliser un couplage avec un détecteur plus informatif que ne peut l'être l'UV dans l'objectif d'obtenir une identification détaillée, il nous a semblé pertinent d'essayer d'évaluer dans quelle mesure l'information du temps de rétention pourrait nous aider à apporter des éléments d'informations pertinents pour l'identification des produits détectés.

Ainsi, 36 molécules modèles ont été injectées dans les conditions finales optimisées. Afin d'essayer de dégager des tendances expliquant la rétention observée, un lien a été cherché entre masse molaire et rétention comme le présente la Figure III-16. Si une tendance semble quelque peu apparaître, plusieurs cas vont démontrer que la rétention n'est pas juste régie par la masse des composés élués. En effet, à des temps de rétention identiques, des molécules de faible masse moléculaire (60 g/mol) coéluent avec des molécules bien plus lourdes (200 g/mol) (par exemple au départ de l'analyse). Comme le montre le Tableau III-3, des composés avec un seul atome d'oxygène peuvent avoir des temps de rétention très différents. Il est possible d'une part qu'ils soient élués à faible taux de co-solvant si le OH est « encombré » (exemple du 2,6-ditertbutyl-4-méthylphénol élué à moins d'une minute). Et d'autre part nécessiter un fort taux de co-solvant si le OH est plus « libre » (exemple du 9-Phénanthrenol élué à 10 min). De plus, la substitution au sein d'une même famille de

composé n'induit pas une augmentation de la rétention. Par exemple, les différents acides carboxyliques (points jaunes sur la Figure III-16) diffèrent les uns des autres par la longueur de la chaîne carbonée (4, 5 ou 6 carbones) mais présentent une rétention pratiquement équivalente.

Tableau III-3 : Temps de rétention des molécules modèles avec un atome d'oxygène

Nom IUPAC	C	H	O	Temps de rétention (min)
Furan	4	4	1	0.41
Anisole	7	8	1	0.49
2,6-ditertbutyl-4méthylphénol	15	24	1	0.56
2-Cyclopentèn-1-one	5	6	1	1.27
2,6-Diméthylphénol	8	9	1	1.43
2,4,6-triméthylphénol	9	12	1	1.53
(4-Méthylphényl) méthanol	7	8	1	3.56
Phénol	6	6	1	5.71
2-Ethylphénol	8	10	1	5.81
4-Benzylphénol	13	12	1	8.60
Naphtalèn-1-ol	10	8	1	8.75
9-Phénanthrèol	14	10	1	10.44

Le nombre d'atomes de carbone n'explique pas non plus la rétention, puisque un composé comme le lévoglucosane avec seulement 6 atomes de carbone va nécessiter un fort taux de co-solvant pour être élué (environ 30 %). Le nombre d'atomes d'oxygène, nombre d'insaturations ou encore le log P ont également été investigués mais aucun ne parvient à expliquer la rétention dans ce système.

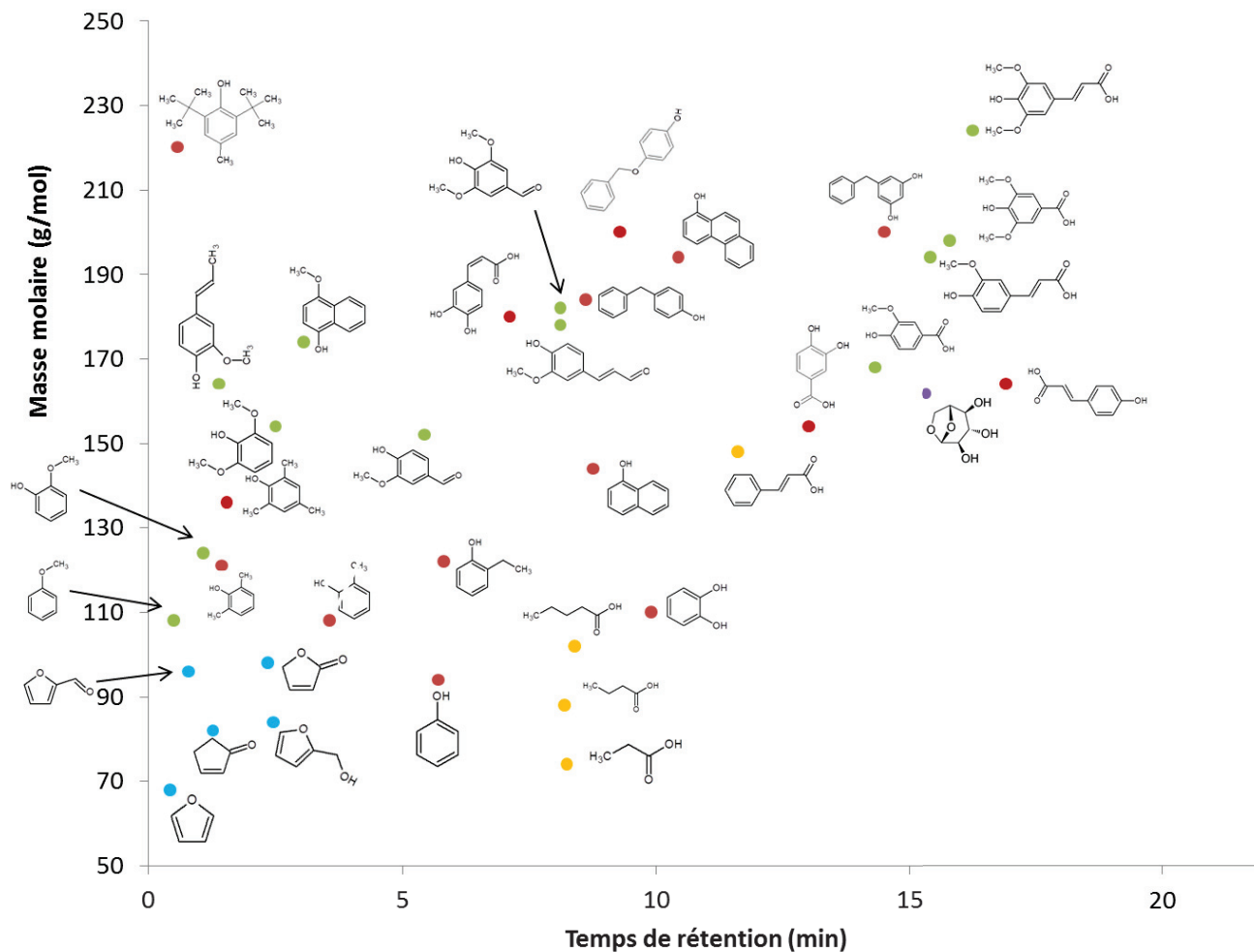


Figure III-16 : « Mass map » des molécules modèles classées par famille : furanique (en bleu), phénolique (en rouge), méthoxyphénolique (en vert), acide carboxylique (en jaune) et sucre (en violet)

Bien que cette étude n'a pas permis de facilement dégager des tendances claires pour modéliser la rétention, elle a malgré tout mis en évidence l'élution de certaines familles chimiques (comme les furanes qui sont tous élués très tôt dans le chromatogramme). Ces informations pourront être utiles lors d'une étape d'identification décrite par la suite.

Conclusion

Au travers de ce chapitre, une méthodologie a pu être mise en place et vérifiée pour parvenir à l'obtention d'une méthode analytique en SFC-UV optimale pour des mélanges complexes. Cette méthodologie se base sur une caractérisation des chromatogrammes d'un échantillon complexe tel qu'une huile de pyrolyse rapide de biomasse à l'aide de critères pertinents et directement reliés à la capacité de pics du système : ainsi on a cherché à maximiser le nombre de pics détectés sur la plus grande fenêtre d'élution possible et répartis le plus uniformément possible sur cette fenêtre.

Ces critères couplés à un screening des différentes possibilités en termes de phases stationnaire et mobile ont permis de déterminer un couple alliant phase stationnaire polaire (BEH 2EP) et co-solvant composé d'acétonitrile avec 2 % d'eau comme étant le plus adapté à l'analyse de cette matrice.

L'utilisation de l'échantillon dans sa totalité a permis de mettre en avant, l'impact de la complexité de la matrice sur le choix des autres paramètres de la méthode SFC. En effet, que ce soit pour la température ou bien la BPR, la littérature a déjà démontré leur effet sur la rétention d'un composé. Dans ce chapitre, il est mis en lumière que si ces paramètres impactent un à un les analytes composant la matrice, sur la totalité de l'échantillon, les effets se trouvent moyennés et la capacité de pics qui en résulte ne varie que de très peu lors des différentes expériences (moins de 10%). Le meilleur compromis trouvé pour chacun des paramètres se rapproche des conditions employées le plus souvent dans la littérature traitant de SFC.

Les huiles de pyrolyse ont été utilisées pour mettre en place cette approche. Cependant, il est important de noter que la démarche employée avec choix des critères, screening de phase et optimisation des paramètres peut être appliquée à n'importe quel type de matrices complexes.

L'étude menée nous permet de proposer une méthode SFC adaptée à la séparation des composants des huiles de pyrolyse rapide. Des huiles de pyrolyse différentes ont été analysées dans ces conditions afin d'appuyer le choix des conditions retenues et une approche par ACP a permis de mettre en avant l'utilisation des données UV pour discriminer de façon macroscopique différentes huiles de pyrolyse. Plusieurs perspectives (prétraitement des données, utilisation de la matrice complète de données UV à la place d'une extraction à une longueur d'onde) pourraient permettre d'employer cette approche pour une analyse rapide d'huiles d'origines différentes.

Bien qu'optimisée la méthode SFC-UV produit un chromatogramme extrêmement complexe et une étape de fractionnement de l'échantillon de départ semble être une approche à envisager. Le fractionnement par SEC démontre un premier intérêt même si un échantillonnage plus important devrait être envisagé afin de profiter pleinement du potentiel d'une analyse bidimensionnelle.

La compréhension des mécanismes de rétention à l'aide de molécules modèles a été abordée. Malheureusement les règles s'appliquant au sein de ce système chromatographique sont complexes et aucune tendance évidente n'a pu être mise en avant facilement. Cette complexité pour les interactions entre phase stationnaire et phase mobile supercritique nécessite plus d'investigations afin de trouver les bons descripteurs.

Enfin pour parvenir à une caractérisation, il est nécessaire d'utiliser une source de détection plus informative que le détecteur UV. Le couplage avec la spectrométrie de masse est une des possibilités à envisager. Le couplage entre ces deux techniques analytiques fera donc l'objet du chapitre suivant.

Références

- [1] A. Le Masle, D. Angot, C. Gouin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of chromatography. A* 1340 (2014) 90–98.
- [2] J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, T.J. Waeghe, Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time: I. Peak capacity limitations, *Journal of Chromatography A* 857 (1–2) (1999) 1–20.
- [3] M.A. Quarry, R.L. Grob, L.R. Snyder, Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors, *Anal. Chem.* 58 (4) (1986) 907–917.
- [4] S. Heinisch, J.-L. Rocca, M. Feinberg, Optimization of a chromatographic analysis in reversed phase liquid chromatography, *J. Chemometrics* 3 (S1) (1989) 127–137.
- [5] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1191 (1-2) (2008) 21–39.
- [6] J.M. Davis, J.C. Giddings, Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms, *Anal. Chem.* 55 (3) (1983) 418–424.
- [7] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1319 (2013) 148–159.
- [8] C. West, E. Lesellier, Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon, *Journal of Chromatography A* 1087 (1-2) (2005) 64–76.
- [9] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model. III. Polar stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1110 (1-2) (2006) 200–213.
- [10] M. Stas, D. Kubic, J. Chudoba, M. Pospíš, Overview of Analytical Methods Used for Chemical Characterization of Pyrolysis Bio-oil, *Energy Fuels* (28) (2014) 385–402.
- [11] Le Masle A., Gauduchon G., Marlot L., Sivault S., Crepier J., Charon N., Une approche multi techniques pour la caractérisation des produits de biomasse, communication orale, SEP2015, Paris, 02/04/2015

Chapitre 4 : Couplage SFC-UV/MS

Sommaire du chapitre

Introduction	153
Partie A : Couplage avec un analyseur simple quadripôle	154
1 Caractérisation du couplage	154
2 Optimisation des paramètres d'ionisation	157
2.1 Méthodologie d'optimisation	157
2.1.1 Position de la source.....	159
2.1.2 Débit de gaz nébulisant	159
2.1.3 Débit de gaz séchant.....	160
2.1.4 Tension de l'interface.....	160
2.1.5 Température de la source	161
2.1.6 Capillaire de transfert (température et tension)	161
2.1.7 Conclusion.....	161
2.1.8 Mode d'ionisation APCI	162
2.2 Conclusion	162
3 Analyse d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse.....	163
3.1 Analyse par SFC/ESI (-)-MS	163
3.2 Analyse SFC/ESI (+)-MS.....	165
3.3 Analyse en SFC/APCI (-)-MS.....	165
3.4 Analyse en SFC/APCI (+)-MS.....	165
4 Conclusion	166
Partie B : Couplage avec un spectromètre de masse IT-ToF/MS.....	167
1 Optimisation du couplage SFC/IT-ToF.....	167
1.1 Paramètres communs ESI et APCI.....	167
1.2 Paramètres spécifique à l'APCI	168
1.2.1 Méthodologie d'optimisation	169
1.2.2 Résultats en APCI (-)	170
1.3 Application à l'analyse d'un composé : le Coniféraldéhyde	174
2 Méthodologie d'identification.....	175
2.1 Gestion des données IT-ToF/MS et logiciel SFC/MS.....	176
2.2 Traitement des données SFC/HRMS	176
2.3 Traitement des données de fragmentation	179
3 Application de la méthodologie à une huile de pyrolyse rapide de biomasse	181
3.1 « Mass map » de l'huile de pyrolyse	181
3.2 Recherche de molécules modèles dans l'huile de pyrolyse.....	182
3.3 Méthodologie d'identification appliquée à l'huile	185
3.4 Analyse quantitative d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse	188
Conclusion	191
Références.....	193
	150
Chapitre IV : Couplage SFC/MS	

Liste des figures et tableaux

Figure IV-1 : Schéma du montage SFC- « make-up »/MS (avec LCMS 2020).....	154
Figure IV-2 : Débit de solvant mesuré à l'entrée de la source MS en fonction de la composition en co-solvant de la phase mobile (1 ou 40 %), de la nature du solvant considéré (MeOH ou ACN) et du débit « make-up », (débit SFC : 1.4 mL/min, T°C : 30°C, BPR : 150 bars)	157
Figure IV-3 : Chromatogramme de mélange modèle à 210 nm. Phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, Co-solvant : ACN/H ₂ O (98/2), T° : 30 °C, P : 150 bars, Gradient linéaire : de 1 à 40 % en 14 min, débit : 1.4 mL/min)	158
Figure IV-4 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction de la position de la source.....	159
Figure IV-5 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction du débit de gaz nébulisant.....	160
Figure IV-6 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction du débit de gaz séchant.....	160
Figure IV-7 : Chromatogrammes BPC et « Mass map » de l'huile de pyrolyse rapide par SFC/MS obtenus avec les quatre modes d'ionisation.....	164
Figure IV-8 : Radar plot du rapport signal/bruit normalisé pour les molécules modèles détectées en APCI négatif avec 100 µL/min de MeOH/H ₂ O (35/65, v/v) pour le make-up #2.....	170
Figure IV-9 : Pourcentage de recouvrement du radar plot en fonction de la composition du solvant de make-up MeOH/H ₂ O et du débit.....	171
Figure IV-10 : Radar plot du ratio signal/bruit pour les molécules modèles détectées en APCI négatif avec 100 µL/min de MeOH/H ₂ O (35/65, v/v) (en vert) (65/35, v/v) (en violet) pour le make-up #2	172
Figure IV-11 : Pourcentage de recouvrement du radar plot en fonction de la température du four APCI (250°C, 350°C, 450°C) avec (en rouge) ou sans (en bleu) additif (NH ₄ OH) en SFC-APCI (-)/MS	173
Figure IV-12 : Spectres de masses du Coniféraldéhyde obtenus dans les 4 modes d'ionisations en SFC-UV/MS	175
Figure IV-13 : Méthodologie appliquée pour le retraitement des données SFC/HRMS ²	176
Figure IV-14 : Chromatogramme BPC (a) et mass map (b) du mélange de molécules modèles détectées en SFC-APCI(-)-IT-TOF/MS.....	177
Figure IV-15 : Chromatogramme (a) et mass map (b) en SFC-APCI (-)-IT-ToF/MS de l'huile de pyrolyse rapide dopée avec le mélange de molécules modèles (200 mg/kg par composé)	180
Figure IV-16 : Comparaison des spectres de fragmentations de trois composés différents pics dans le mélange modèle (en bleu) et dopés dans l'huile (en rouge)	181
Figure IV-17 : Mass map d'une huile de pyrolyse rapide en SFC/HRMS	182
Figure IV-18 : Comparaison de spectres de fragmentation en mode ciblé (en bleu) et non ciblé (en rouge). (a) t _r = 5.82 min, (b) t _r = 8.06 min, (c) t _r = 1.58 min, (d) t _r = 12.28 min et (e) t _r = 9.96 min	187
Figure IV-19 : Courbes d'étalonnage de la Vanilline en UV à 210 nm (en gris), à 254 nm (en orange), à 280 nm (en bleu) et en MS (APCI (-)) pour l'ion 151.04 (en jaune) par étalonnage externe (à gauche) et ajouts dosés (à droite).....	188

Figure IV-20 : Courbes d'étalonnage du Coniféraldéhyde en UV à 210 nm (en gris), à 254 nm (en orange), à 280 nm (en bleu) et en MS (APCI (-)) pour l'ion 177.06 (en jaune).....	188
Figure IV-21 : Droite d'étalonnage de la vanilline(en rouge) et du coniféraldéhyde (en bleu) par étalonnage externe et ajout dosé.....	190
Tableau IV-1 : Conditions opératoires en SFC/ESI-MS	161
Tableau IV-2: Conditions opératoires en SFC/APCI-MS	162
Tableau IV-3: Paramètres transposés de simple quadripôle à l'IT-ToF sans optimisation nécessaire	168
Tableau IV-4: Conditions finales de MS avec IT-ToF/MS	174
Tableau IV-5: Identification de formules brutes des molécules modèles détectées en APCI négatif à l'aide du logiciel SFC/MS	178
Tableau IV-6: Molécules modèles détectées dans l'huile de pyrolyse rapide grâce à leur masse et leur temps de rétention	183
Tableau IV-7: Identification des pics principaux de l'huile de pyrolyse rapide en SFC/APCI (-)-IT-ToF/MS	186
Tableau IV-8: Teneurs par étalonnage externe et ajouts dosés pour le dosage par SFC-UV de la vanilline et du coniféraldéhyde contenus dans une huile de pyrolyse rapide de biomasse	189

Introduction

De par la complexité de sa matrice, la caractérisation d'huiles de pyrolyse rapide nécessite l'emploi de techniques analytiques avec un grand pouvoir informatif. Ainsi la plupart des informations déjà acquises sur ces échantillons l'ont été à l'aide d'un couplage entre une technique analytique optimisée possédant un fort pouvoir séparatif, la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC) et un détecteur hautement informatif comme la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). L'identification de centaines de composés dans les huiles de pyrolyse rapide a en effet été réalisée grâce à la comparaison entre les spectres de masses acquis expérimentalement et des bases de données telles que la base NIST. On pourra donc essayer d'adapter cette méthodologie au couplage SFC/MS.

A la fin du chapitre précédent, la méthode optimisée en SFC-UV a permis d'obtenir plus d'une centaine de pics élués tout au long du chromatogramme pour l'analyse de notre huile de pyrolyse rapide de biomasse. Cependant, l'utilisation d'une détection UV ne permet pas l'identification des constituants de la matrice. Un couplage avec la spectrométrie de masse a donc été envisagé au cours de cette thèse pour accéder à une caractérisation moléculaire de cette matrice.

Deux spectromètres de masse différents ont été employés dans nos travaux conduisant ainsi à deux parties différentes dans ce chapitre. La première partie concerne l'utilisation d'un spectromètre masse équipé d'un simple quadripôle comme analyseur. Ce premier spectromètre de masse a permis de s'assurer de la faisabilité du couplage entre SFC et MS tout en montrant ce que la MS pouvait apporter à la caractérisation des huiles de pyrolyse. Une étape d'optimisation des différents paramètres du couplage a été nécessaire. Elle a été réalisée à partir de molécules modèles qui ont permis d'optimiser le signal des ions d'intérêt (ions pseudo-moléculaires). Un retraitement spécifique des données a également été mis en place à l'aide d'un logiciel créé à façon et de plateforme de comparaison sur internet afin de valoriser au mieux les résultats obtenus.

A cause de la faible résolution massique du simple quadripôle, une caractérisation complète des composés est impossible. La seconde partie de ce chapitre est donc consacrée à la mise en œuvre du couplage avec un spectromètre de masse beaucoup plus résolutif : le spectromètre à temps de vol équipé d'un piège à ions (IT-ToF/MS). Grâce aux observations préalablement acquises avec le simple quadripôle, certains paramètres du couplage ont pu être conservés. D'autres ont été ré-optimisés.

Enfin une méthodologie propre aux données de fragmentation a été mise en place afin de parvenir à l'élucidation de structures moléculaires au sein de l'huile. La validation de cette approche ainsi que les premiers résultats concernant les huiles de pyrolyse rapide sont abordées dans la dernière partie ce chapitre.

Partie A : Couplage avec un analyseur simple quadripôle

Afin de comprendre et de maîtriser les particularités du couplage entre la SFC et la MS, un premier couplage a été réalisé entre un instrument UPC² (Waters) et un spectromètre de masse de type simple quadripôle LCMS 2020 (Shimadzu). Les caractéristiques des appareillages sont détaillées dans le chapitre 2.

1 Caractérisation du couplage

Les sources d'ionisation disponibles pour un couplage avec la SFC sont des sources travaillant à pression atmosphérique (ESI et APCI essentiellement). Cette caractéristique entraîne une décompression de la phase mobile qui, en sortie de la cellule UV, est à 150 bars et, à l'entrée du détecteur MS, à pression atmosphérique. Cette décompression entraîne une concentration des espèces dans la partie liquide de la phase mobile (co-solvant) qui représente un faible volume. Il existe donc un risque de précipitation de l'échantillon dans les tubes situés avant la source d'ionisation. Pour remédier à cela, un module supplémentaire est ajouté. Dans la suite du rapport, on nommera ce module ISM (Isocratic Solvent Manager). Il s'agit d'une pompe qui vient ajouter un débit de solvant (« make-up ») au débit de phase mobile en sortie de cellule UV. La Figure IV-1 schématise ce montage. Cet ajout de solvant aide aussi à l'ionisation en apportant un solvant protique permettant les échanges de charges entre les différentes espèces.

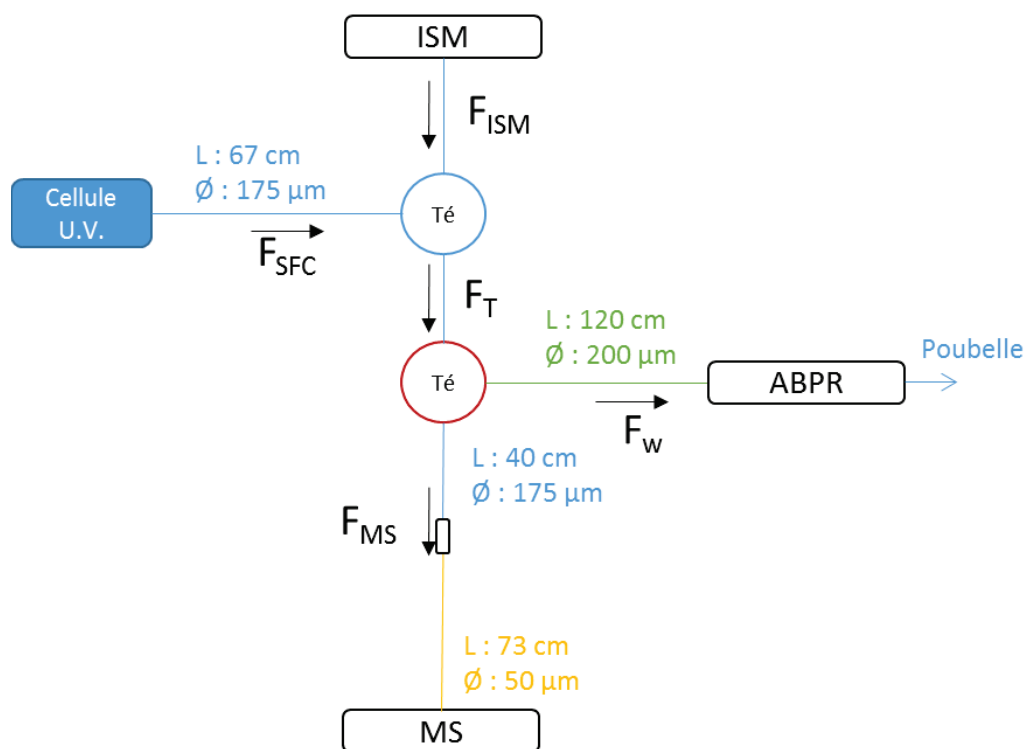


Figure IV-1 : Schéma du montage SFC- « make-up »/MS (avec LCMS 2020)

Le débit d'entrée dans la source d'ionisation est un paramètre important qui doit pouvoir être modulé. Il est théoriquement possible, à partir de l'équation de Poiseuille, de prévoir ce débit en fonction des débits respectifs de chacune des pompes, de la BPR, des géométries des tubes et de la teneur en modificateur de la phase mobile. D'après l'équation de Poiseuille, la perte de charge dans un tube parcouru par un fluide est donné par

$$\Delta P = \frac{128 \eta}{\pi} \times R \times F \quad (1)$$

Avec F, le débit du fluide, R, un terme prenant en compte la géométrie du tube ($R = L/d^4$, L et d étant respectivement la longueur et le diamètre du tube) et η , la viscosité du fluide.

Le débit total avant le split, F_T , est la somme des débits arrivant dans la source d'ionisation, F_{MS} et arrivant à la poubelle, F_W selon

$$F_T = F_{MS} + F_W \quad (2)$$

C'est également la somme des débits de phase mobile, F_{SFC} et de make-up, F_{ISM} :

$$F_T = F_{SFC} + F_{ISM} \quad (3)$$

L'équation (1) s'applique pour chacun des tubes présents dans le montage (Fig. IV-1). La voie entre le split et la source d'ionisation est constituée de deux tubes (bleu et jaune). Le tube bleu ayant un diamètre très important par rapport à celui du tube jaune (175 μ m vs 50 μ m), sa perte de charge est très faible par rapport à celle engendrée par le tube jaune. Elle sera négligée lors de nos calculs. Selon l'équation (1), la perte de charge dans chacune des deux voies situées après le split est donnée par:

$$\Delta P_{MS} = \frac{128 \eta}{\pi} \times R_{MS} \times F_{MS} \quad (4)$$

$$\Delta P_W = \left(\frac{128 \eta}{\pi} \times R_W \times F_W \right) + \Delta P_{BPR} \quad (5)$$

ΔP_{BPR} étant la perte de charge générée par le BPR (« back pressure regulator »). Les équations (4) et (5) sont établies en supposant que la viscosité est la même dans les deux voies et constante tout le long du tube. Il est donc important de noter que cette approximation néglige le changement de viscosité au moment de la décompression et de l'évaporation du CO₂. Les pertes de charges étant identiques dans les deux voies, en conjuguant les équations 2, 4 et 5, on obtient le débit, F_{MS} , qui entre dans la source:

$$F_{MS} = \frac{\frac{BPR \times \pi}{128 \eta} + R_W \times F_T}{(R_W + R_{MS})} \quad (6)$$

Ce débit est le débit total du fluide juste avant d'entrer dans la source (CO₂ + solvant). Le débit de liquide (solvant) peut être calculé à partir de la teneur en solvant dans le fluide, c'est-à-dire, à partir du débit de la phase mobile SFC, du débit de « make-up » et de la composition de la phase mobile SFC. La fraction volumique de solvant dans le fluide, X_s , est ainsi donnée par

$$X_s = \frac{X_{s,SFC} \times F_{SFC} + F_{ISM}}{F_T} \quad (7)$$

Où $X_{s,SFC}$ est la fraction volumique de solvant dans la phase mobile SFC.

En combinant les équations 6 et 7, on peut donc prédire le débit de solvant entrant dans la source d'ionisation selon

$$F_{S,MS} = X_S F_{MS} \quad (8)$$

Dans le chapitre 3, la pression BPR optimum a été fixée à 150 bars. Les tubes du montage sont fournis par Waters avec des dimensions fixes, indiquées sur la Figure IV-1. Les travaux de Grand-guillaume Perrenoud et al. [1] permettent d'avoir une estimation empirique de la viscosité d'un mélange binaire CO₂ supercritique et méthanol. Pour des raisons chromatographiques évoquées au chapitre 3, le meilleur co-solvant n'est pas le méthanol mais l'acétonitrile. A faible teneur (1 %), au début du gradient, la majorité du liquide est apporté par le « make-up » de méthanol. Cependant à la fin du gradient, la teneur en acétonitrile (40 %) n'est plus négligeable. Le fluide devient ainsi un mélange ternaire (CO₂/MeOH/ACN) et le calcul de la viscosité selon [1] ne peut plus être juste.

Les valeurs théoriques (selon les équations précédentes) des débits de liquide à l'entrée de la source ont été comparées aux valeurs mesurées pour différents débits de make-up. Les débits ont été mesurés à l'aide d'un piège à façon pour contrer les effets de la décompression selon la méthode décrite en [1]. La Figure IV-2 montre la variation théorique du débit de liquide entrant dans la source d'ionisation en fonction du débit de make-up ajouté pour différentes teneurs en co-solvant dans la phase mobile SFC (1 % MeOH ; 40 % MeOH ; 40 % ACN). Les mesures expérimentales réalisées avec 1 % ACN et 40 % ACN dans la phase mobile ont été rajoutées sur la figure. On remarque que la composition de la phase mobile a beaucoup plus d'impact sur la quantité de liquide acheminé vers la MS que le débit du module ISM. En effet, en triplant la quantité de solvant « make-up », on n'augmente que d'un facteur 1.3 (soit une dizaine de microlitres par minute) la quantité de matière arrivant à l'entrée de la source d'ionisation. A contrario lorsque l'on compare les deux compositions extrêmes de phase mobile (ratio CO₂/co-solvant de 99/1 ou 60/40), l'impact est plus significatif (facteur de 1.3 minimum). Cet écart est d'autant plus grand que la quantité de liquide ajoutée par l'ISM est faible. En effet, lorsque le débit du « make-up » est élevé, le solvant MeOH constitue l'essentiel de la phase liquide recueillie dans le piège et la contribution du co-solvant de la phase mobile est moindre.

Si l'on compare ces mesures aux valeurs théoriques, on remarque une bonne correspondance pour une composition de 1 % ACN (début de gradient). Dans ce cas-là, la phase liquide est constituée majoritairement de méthanol provenant du « make-up » et les valeurs théoriques concordent avec les valeurs expérimentales. Cependant pour une composition de 40 % ACN (fin de gradient), les valeurs mesurées sont contenues entre les deux courbes théoriques calculées pour un mélange binaire CO₂/MeOH (courbe verte) et CO₂/ACN (courbe jaune). Pour les faibles débits de make-up, les points expérimentaux correspondent à la courbe jaune (mélange plus proche d'un binaire CO₂/ACN) alors que pour les débits de make-up élevés, les points expérimentaux correspondent à la courbe verte (mélange plus proche d'un binaire CO₂/MeOH). Pour les débits intermédiaires, la viscosité est celle d'un mélange ternaire et les points expérimentaux se situent entre ces deux courbes théoriques.

Pour limiter l'écart de débit entrant dans la source d'ionisation entre le début et la fin du gradient mais également pour ne pas trop diluer notre échantillon dans un surplus de « make-up », le débit de l'ISM a été fixé à 0.5 mL/min pour la suite des travaux. Par conséquent, le débit de liquide entrant dans la source peut varier de 0.2 à 0.3 mL/min selon l'élution des composés.

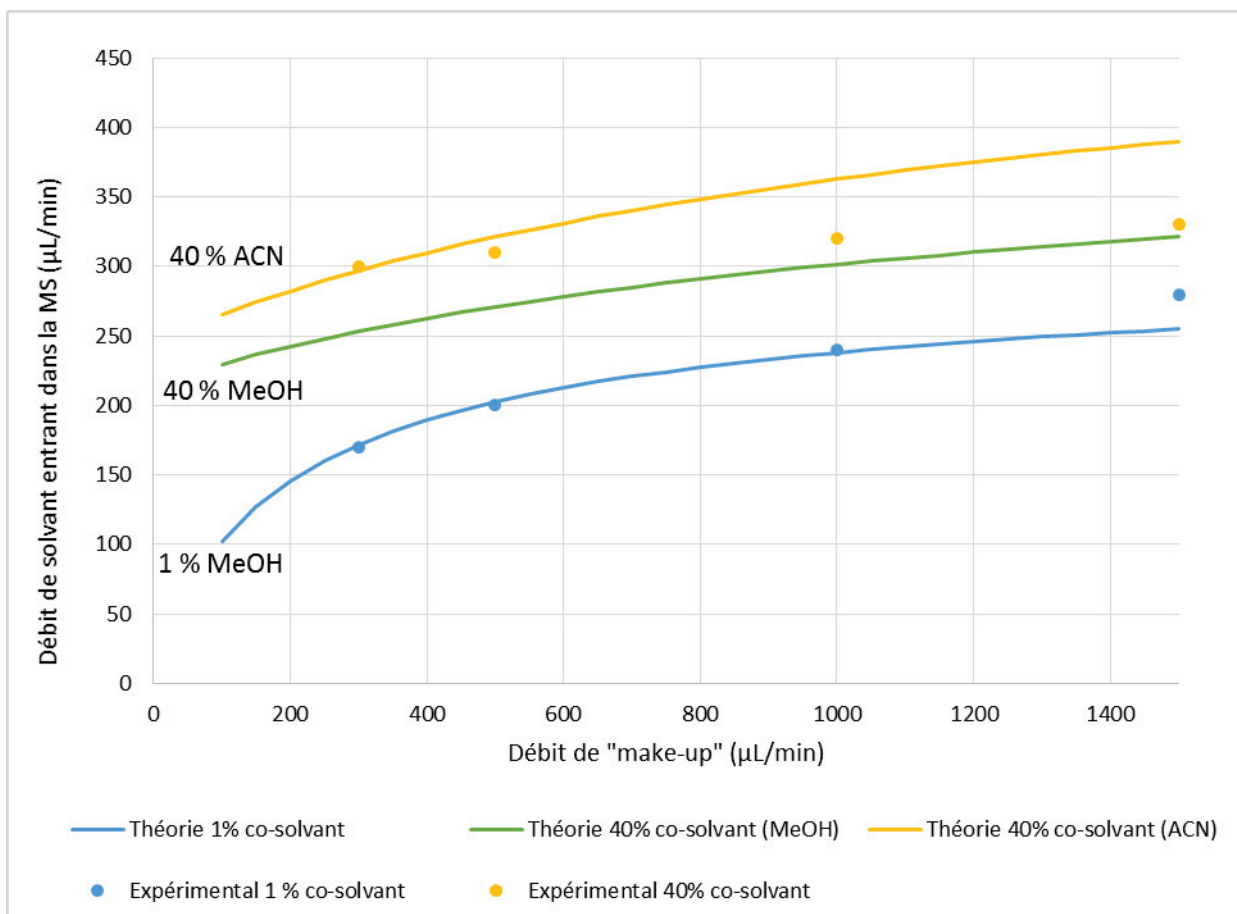


Figure IV-2 : Débit de solvant mesuré à l'entrée de la source MS en fonction de la composition en co-solvant de la phase mobile (1 ou 40 %), de la nature du solvant considéré (MeOH ou ACN) et du débit « make-up », (débit SFC : 1.4 mL/min, T°C : 30°C, BPR : 150 bars)

2 Optimisation des paramètres d'ionisation

A partir de l'étude bibliographique, il a été déterminé que deux sources d'ionisation semblent les plus appropriées dans le cadre de notre étude : l'ESI (ElectroSpray Ionization) et l'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Comme ces deux sources possèdent deux modes de polarité (positif et négatif), il existe donc dans le cadre de notre étude quatre modes d'ionisation à optimiser. Pour ces optimisations, cinq molécules modèles oxygénées ont été sélectionnées pour les modes négatifs (Cf. Figure IV-3). En mode positif, ces cinq molécules modèles n'étant pas facilement protonables, la caféine qui donne une forte réponse en mode positif a été choisie. La méthodologie d'optimisation est présentée en détails pour le mode ESI négatif, la méthodologie étant similaire pour les trois autres modes d'ionisation. Des tableaux résumés les résultats obtenus dans les quatre modes.

2.1 Méthodologie d'optimisation

Le but est ici de maximiser le signal obtenu en employant la méthode SFC déterminée dans le chapitre 3 et en l'appliquant à des molécules modèles. Elles ont été choisies en accord avec la littérature [2] : guaiacol, syringol, hydroxydiphénylméthane, monobenzène et benzylresorcinol.

L'élution de ces cinq composés étant répartie sur toute la gamme de composition de phase mobile, on pourra donc vérifier que les paramètres MS ont un impact identique sur tout le chromatogramme (Figure IV-3).

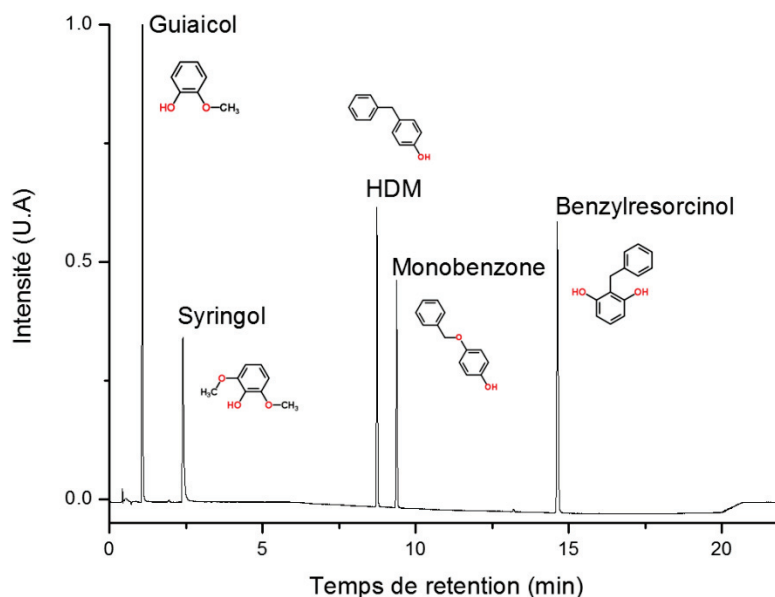


Figure IV-3 : Chromatogramme de mélange modèle à 210 nm. Phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, Co-solvant : ACN/H₂O (98/2), T° : 30 °C, P : 150 bars, Gradient linéaire : de 1 à 40 % en 14 min, débit : 1.4 mL/min)

L'optimisation des différents paramètres a été réalisée de façon séquentielle. Le détail de fonctionnement du spectromètre de masse ainsi que la signification de ces paramètres se trouve dans le chapitre 2. Pour chaque paramètre, une valeur par défaut a été fixée pour débiter l'optimisation. Ces valeurs sont indiquées ci-dessous :

- Position de la source (position 0 par défaut)
- Débit du gaz nébulisant (1 L/min par défaut)
- Débit du gaz séchant (10 L/min par défaut)
- Tension de l'interface (-4 kV par défaut)
- Température de la source (250 °C par défaut)
- Température du capillaire de transfert (250 °C par défaut)
- Tension du capillaire de transfert (0 V par défaut)

En gardant les autres paramètres constants, un seul paramètre varie sur toute la gamme disponible. Pour chacune des mesures, l'intensité des pics est relevée sur le signal BPC (Base Peak Chromatogram). Les courbes d'évolution de l'intensité des pics en fonction des paramètres sont alors exploitées afin de déterminer la meilleure configuration possible. Une fois l'optimum trouvé pour un paramètre, cette valeur est conservée pour l'optimisation des paramètres suivants.

L'optimisation des différents paramètres a montré la même tendance pour chacune des molécules modèles. Les résultats présentés se focalisent donc sur l'évolution du signal du Syringol pour illustrer l'ensemble de la méthodologie.

2.1.1 Position de la source

Une des possibilités de cet appareillage est d'éloigner plus ou moins le spray de l'entrée du capillaire de transfert afin de permettre une meilleure désolvatation et d'éliminer au mieux le solvant en fonction du débit. La distance maximale est 12 mm. La Figure IV-4 illustre le signal obtenu en fonction de la position du spray. Le point 0 correspond à la position la plus proche possible.

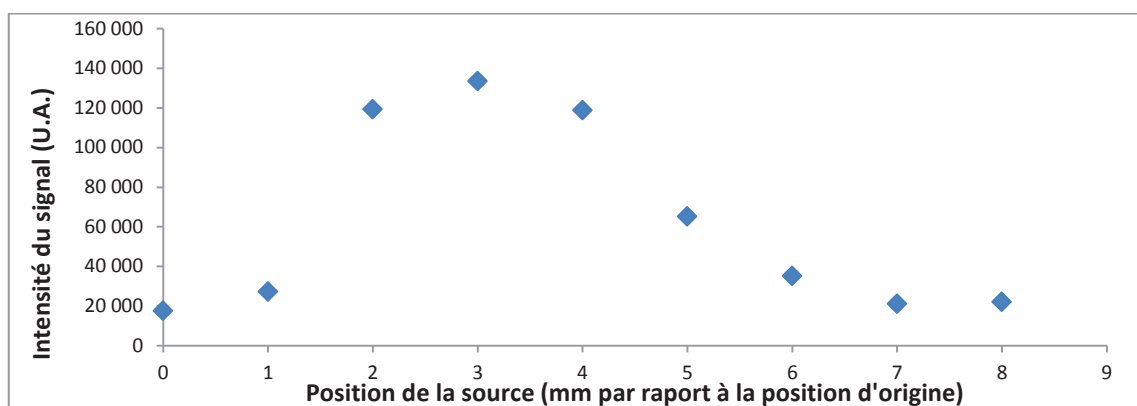


Figure IV-4 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction de la position de la source

L'analyse de cette courbe montre bien que si le spray est placé trop près de l'entrée de l'analyseur, le signal est faible car peu de molécules parviennent à être isolées du reste de la matrice et un risque de décharge apparaît car le champ électrique devient très intense. De même si l'entrée du capillaire de transfert est trop éloignée, peu de molécules parviennent à entrer dans le capillaire de transfert vers l'analyseur (spray divergeant) et le champ électrique n'est plus suffisant.

En conclusion pour la suite des travaux en ESI, la source sera placée sur la position 3.

2.1.2 Débit de gaz nébulisant

Dans les sources atmosphériques, l'effluent arrive sous forme liquide. A l'aide d'un gaz nébulisant il est transformé en spray de fines gouttelettes. Dans notre cas, ce phénomène est assuré par la décompression du CO₂ lors du transfert entre la chaîne SFC et la source d'ionisation. Sur le spectromètre LCMS 2020, il est impossible d'appliquer une valeur nulle au débit de gaz nébulisant. Plusieurs tests ont été menés entre 0.5 L/min (valeur minimum possible) et 1.5 L/min. Il apparaît sur la Figure IV-5 que plus ce débit de gaz nébulisant augmente et plus l'intensité diminue, le spray créé devenant trop large. Cette diffusion va entraîner des pertes de molécules sur les parois de la source par exemple. Le débit minimum de 0.5 L/min a donc été conservé. Cependant la variation de signal avec le débit de gaz nébulisant est assez faible en comparaison avec le paramètre position de la source.

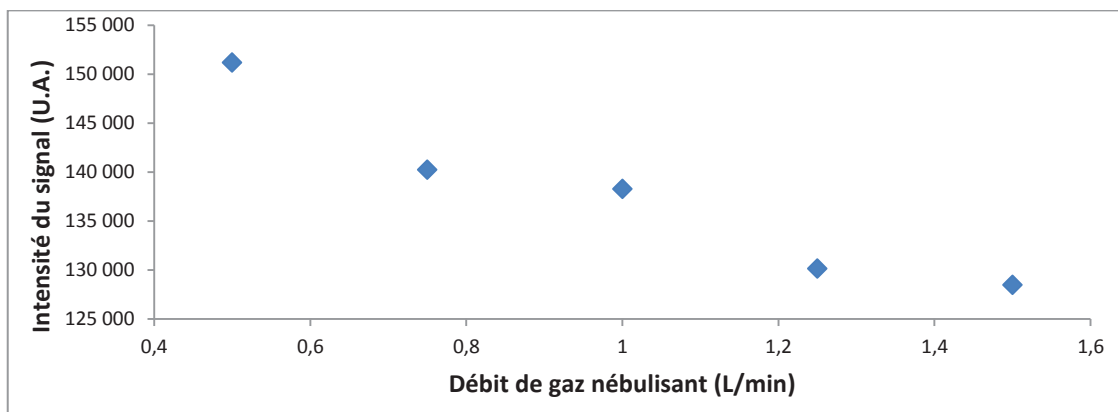


Figure IV-5 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction du débit de gaz nébulisant

2.1.3 Débit de gaz séchant

Selon la géométrie de notre appareil, ce gaz séchant vient à contre-courant du chemin des ions entrant dans le capillaire de transfert. Il est utilisé afin d'éliminer le surplus de solvant dans le spray et ainsi limiter le bruit dans l'analyseur. Ce débit peut varier de 5 à 20 L/min.

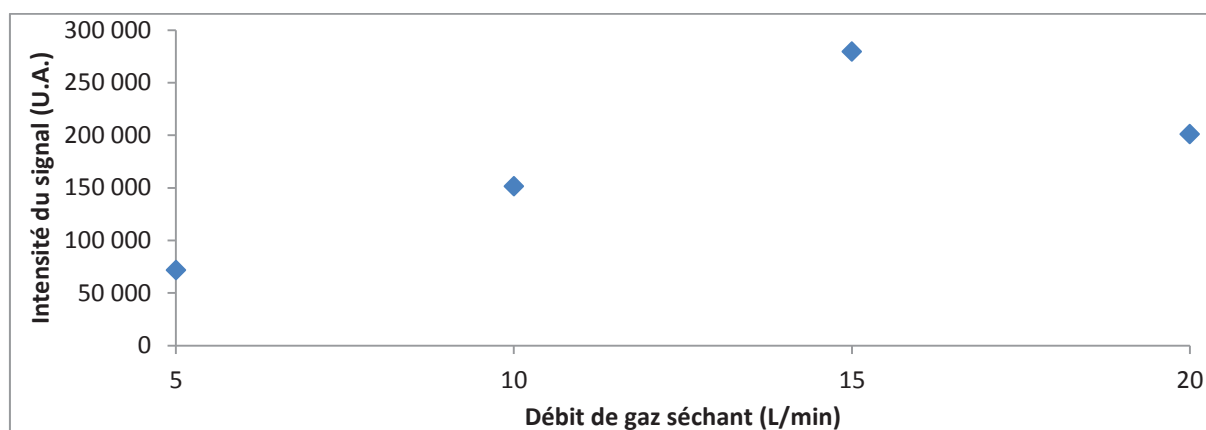


Figure IV-6 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction du débit de gaz séchant

Un débit trop faible de gaz séchant va empêcher la désolvatation correcte de l'échantillon alors qu'à contrario un trop grand débit entraîne une perte d'intensité du signal car le gaz séchant empêche les molécules d'entrer dans le capillaire de transfert. Le débit a été fixé à 15 L/min pour la suite des analyses.

2.1.4 Tension de l'interface

Afin d'ioniser les molécules, une tension est appliquée entre l'entrée du capillaire de transfert et la sortie du capillaire permettant la création du spray. Elle peut varier entre 0 et 5 en valeur absolue. Si cette valeur est trop basse, l'échantillon a du mal à s'ioniser. Cependant deux problèmes peuvent survenir avec une tension trop haute (en valeur absolue) : si l'échantillon est mieux ionisé, il en est de même pour les pollutions possibles et les composés composant le bruit de fond. Le second problème survient si les charges sont trop concentrées. Une décharge est alors possible et les molécules se retrouvent sans charge et donc impossibles à analyser. Les résultats obtenus sur la gamme de travail (0 - 5 kV) sont sensiblement identiques avec logiquement une augmentation du signal lorsqu'on augmente le voltage. Le voltage a été fixé à -5 kV pour la suite des expériences.

2.1.5 Température de la source

Comme évoqué auparavant, la décompression du CO₂ est un phénomène qui peut être bénéfique pour l'ionisation de nos composés (création d'un spray). Cependant ce phénomène physique est endothermique et donne lieu à un spray très froid (environ – 70 °C). Cette contrainte peut entraîner deux types de complications. Premièrement avec un spray aussi froid, certains liquides (comme l'eau par exemple) peuvent geler et occasionner des bouchages des différents tubings ou capillaires de transfert. Le second problème se situe au niveau de l'ionisation. En effet, un spray froid comme celui qui est produit par la décompression du CO₂ peut créer des clusters contenant une molécule couplée à un adduit. Les adduits peuvent être les molécules de solvant, les pollutions présentes dans la source, des sels présents dans les solvants par exemple. L'ion moléculaire est donc moins intense au profit d'un ion correspondant au cluster [molécule + adduit].

Pour contrer ces deux effets dus au spray froid, il est donc recommandé de chauffer l'arrivée dans la source. C'est pourquoi dans cette étude la température du bloc chauffant a été réglée à 50 °C en dessous du maximum afin de ne pas risquer d'endommager l'appareillage avec un chauffage à trop haute température durant une période prolongée. Une température de 400 °C a été appliquée à tous les tests suivants.

2.1.6 Capillaire de transfert (température et tension)

Le problème d'adduit abordé dans le paragraphe précédent peut également être solutionné en partie en jouant sur les paramètres du capillaire de transfert. Cette partie du spectromètre de masse permet de transférer les ions produits dans la source jusqu'à l'analyseur. Il peut également être chauffé afin d'éliminer les dernières traces de solvant et une tension peut être appliquée entre l'entrée et la sortie afin d'apporter de l'énergie dans le but de casser des adduits par exemple.

A partir des valeurs par défaut de l'appareil (250 °C et 0 V), plusieurs tests ont été menés en augmentant ces valeurs. Dans tous les cas, l'impact de ces changements s'est illustré par une légère baisse de l'intensité. Les valeurs par défaut ont été conservées pour l'analyse de l'huile.

2.1.7 Conclusion

A partir d'un mélange modèle, le paramétrage de l'ElectroSpray négatif a pu être optimisé afin de maximiser le signal enregistré. Les valeurs de ces paramètres sont présentées dans le Tableau IV-1 pour le mode positif et négatif. Seule la valeur de tension de l'interface diffère entre ces deux modes.

Tableau IV-1 : Conditions opératoires en SFC/ESI-MS

Paramètres	Gamme	Optimum en négatif	Optimum en positif
Source position	0 – 12 mm	3 mm	3 mm
Débit gaz nébulisant	0.5 – 1.5 L/min	0.5 L/min	0.5 L/min
Débit gaz séchant	5 – 20 L/min	15 L/min	15 L/min
Tension interface	5kV – -5 kV	-5 kV	4 kV
Bloc chauffant	50 – 450 °C	400 °C	400 °C
Température DL	50 – 300 °C	250 °C	250 °C
Tension DL	0 – 100 V	0 V	0 V
Débit "make-up"	0.1 – 3 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min

2.1.8 Mode d'ionisation APCI

Les conditions optimisées sont identiques à celles trouvées en ESI, à part la température du bloc chauffant de la source qui a une gamme de valeurs moins large en APCI. Cette gamme plus faible s'explique par l'ajout d'une autre température propre à l'APCI appliqué au capillaire chargé de créer le spray.

Tableau IV-2: Conditions opératoires en SFC/APCI-MS

Paramètre	Gamme	Optimum en positif	Optimum en négatif
Débit gaz nébulisant	0.5 – 1.5 L/min	0.5 L/min	0.5 L/min
Débit gaz séchant	5 – 20 L/min	15 L/min	15 L/min
Tension interface	5 kV– -5 kV	5 kV	-5 kV
Bloc chauffant	50 – 300 °C	250 °C	250 °C
Température DL	50 – 300 °C	250 °C	250 °C
Tension DL	0 – 100 V	0 V	0 V
Température APCI	50 – 500°C	450 °C	450 °C
Débit "make-up"	0.1 – 3 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min

2.2 Conclusion

Le couplage entre la SFC et la spectrométrie de masse a nécessité des adaptations du dispositif expérimental. Premièrement, la phase mobile utilisée en SFC n'est pas directement compatible avec les sources d'ionisation à pression atmosphérique. En effet, après décompression du CO₂ entre SFC et MS, l'échantillon se trouve concentré dans un faible débit de co-solvant. Ceci implique deux inconvénients majeurs : un débit insuffisant pour le bon fonctionnement des sources d'ionisation (associé à un risque de précipitation) et la nature du co-solvant qui n'est pas adaptée pour faciliter l'ionisation (l'acétonitrile est un solvant non protique).

L'ajout de méthanol comme solvant de « make-up » permet de répondre à ces deux contraintes. En augmentant ainsi le débit entrant dans la source et en apportant un solvant protique qui favorise les interactions électroniques.

De plus, la décompression du CO₂ étant un phénomène endothermique, il est nécessaire d'augmenter la température des sources d'ionisations afin de prévenir les problèmes de gel et la formation des clusters dans un spray trop froid. L'ajout d'une pompe de « make-up » va augmenter le débit entrant dans la source d'ionisation. Une fois ce débit fixé, il a été possible de s'intéresser aux différents paramètres ayant un impact sur l'ionisation. En se basant sur des molécules modèles facilitant la détection, les différents débits (gaz nébulisant, séchant), les températures (source et ligne de désolvation) et les tensions (interfaces et ligne de désolvation) ont été optimisées successivement.

Au terme de cette étude, un jeu de conditions optimales est ainsi disponible dans chacun des modes d'ionisation (ESI +/- et APCI +/-) afin de maximiser le signal lors de l'analyse de l'huile de

pyrolyse rapide. Étonnamment ces paramètres optimisés sont très proches pour tous les modes d'ionisation. La question peut se poser du choix des molécules modèles qui demeurent proche en termes de structure et de fonction chimique. Un choix de molécules plus important et plus varié pourrait permettre de vérifier cette similarité.

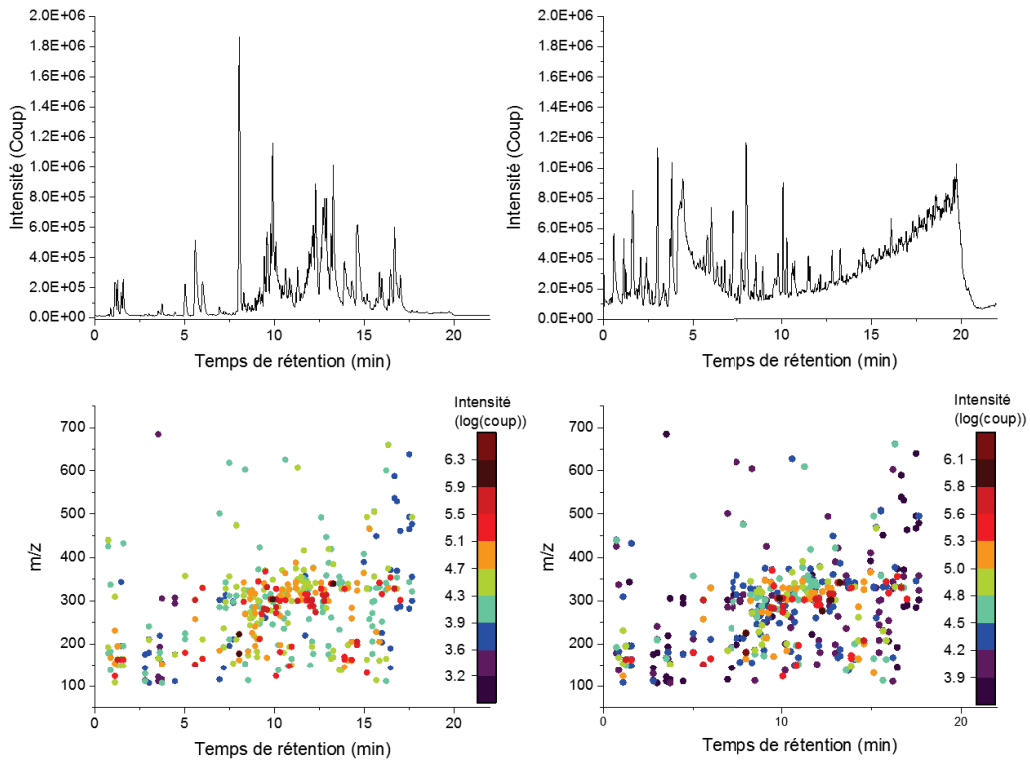
3 Analyse d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse

Dans ces travaux, quatre modes d'ionisation en spectrométrie de masse ont été testés pour un même échantillon d'huile de pyrolyse rapide. Pour chacun des modes, plusieurs représentations sont disponibles (chromatogramme BPC, « mass map ») comme décrites dans le chapitre 2. La Figure IV-7 illustre les différentes représentations pour les quatre modes. Les chromatogrammes BPC sont différents du chromatogramme UV présenté dans le chapitre 3, notamment avec certaines zones contenant très peu de pics. Cela peut s'expliquer par le fait que toutes les molécules n'ont pas le même coefficient de réponse en MS et les composés élués peuvent être détectés de façon spécifique par un mode d'ionisation ou plusieurs. Cependant, les représentations BPC ne donnent qu'une partie des informations obtenues via ces analyses, c'est pourquoi une autre représentation a été ajoutée en dessous de chaque chromatogramme BPC. Ces cartographies, appelées « mass map », présentent en 2D, pour chaque pic détecté sur le BPC, les cinq ions les plus intenses en fonction de leur temps de rétention et de leur masse. La couleur de chaque point indique l'intensité à laquelle l'ion a été détecté.

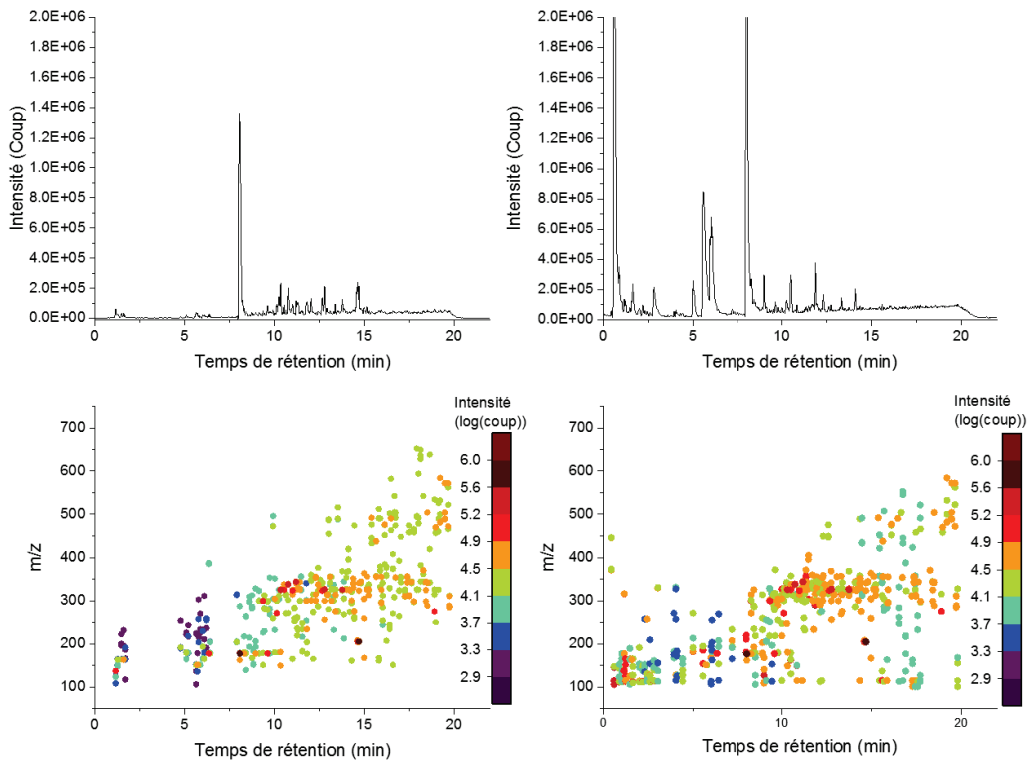
3.1 Analyse par SFC/ESI (-)-MS

Le chromatogramme BPC et la « mass map » en ESI (-) présente peu de pics intenses détectés au début de l'analyse (entre 0 et 6 min). Ces points correspondent à des ions de masses moléculaires faibles (entre 100 et 250 uma). La seconde partie (à partir de 7 min) du chromatogramme concentre la plupart des ions dans une gamme de masses moléculaires comprises entre 300 et 500 uma. L'essentiel des composés détectés par ce mode d'ionisation a une masse moléculaire comprise entre 100 et 400 uma.

ESI



APCI



Négatif

Positif

Figure IV-7 : Chromatogrammes BPC et « Mass map » de l'huile de pyrolyse rapide par SFC/MS obtenus avec les quatre modes d'ionisation

3.2 Analyse SFC/ESI (+)-MS

En comparaison avec le chromatogramme en ESI (-), l'ESI (+) présente un chromatogramme beaucoup plus fourni mais également plus bruité. En effet, l'intensité du signal est moins écrasée par un pic majoritaire et l'ensemble des pics en BPC a une intensité plus faible qu'en ESI (-). Il est possible de suivre l'évolution du gradient d'élution en observant la dérive de la ligne de base. Cela s'explique simplement par le fait que le co-solvant employé pour nos expériences, l'acétonitrile, s'ionise facilement en mode positif (doublet non liant de l'azote).

Sur la « mass map », deux parties se distinguent. Sur le palier isocratique initial (jusqu'à 6 min) où le taux d'acétonitrile est faible, pour chacun des pics, le spectre de masse est composé d'ions intenses pouvant donner des informations sur ce palier isocratique peu décrit par l'analyse en ESI (-). A contrario, pour les composés élués en gradient d'élution (à partir de 6 min), les spectres de masse sont essentiellement composés de nombreux ions peu intenses. On peut donc assimiler cela à du bruit provenant du gradient d'acétonitrile. L'exploitation de ce mode d'ionisation semble cependant complexe compte tenu du grand nombre d'espèces détectées.

3.3 Analyse en SFC/APCI (-)-MS

D'après la littérature, une gamme de molécules avec une masse plus faible qu'en ESI représente les molécules cibles de l'APCI. Le chromatogramme BPC obtenu est plus épuré que ceux issus de l'ESI. Une première explication est que la matrice est composée de molécules ayant majoritairement un meilleur facteur de réponse en ESI qu'en APCI. La seconde possibilité est que le pic majoritaire que l'on observe à 8.01 min sur le chromatogramme BPC masque les autres pics moins intenses sur le chromatogramme.

Sur la « mass map », la faible intensité du peu de pics détectés durant le palier isocratique (jusqu'à 6 min) laisse supposer que les conditions d'ionisation ne sont pas les plus adaptées pour les composés élués dans ces conditions. Cette observation est concordante également en ESI négatif. Les composés élués en début d'analyse sont plus facilement ionisables en mode positif qu'en mode négatif. Cela se trouve confirmé également par les premières observations tirées de l'injection des molécules modèles comme vu dans le chapitre 3. Par exemple, les composés furaniques sont élués au début de l'analyse et sont susceptibles d'avoir une meilleure réponse en ionisation positive qu'en négative.

3.4 Analyse en SFC/APCI (+)-MS

Ce mode d'ionisation présente un chromatogramme BPC et une « mass map » simple avec peu de pics détectés. Chacun des pics possède un spectre de masse pour lequel un ou deux ions ressortent majoritairement. De plus, le bruit de fond faible ne perturbe pas la représentation. En comparaison avec l'ESI (+), aucune dérive due à l'ajout de co-solvant (acétonitrile) n'est observée. En effet, l'intérêt de la source APCI ici se situe dans le fait que les clusters (ou adduits) ne sont pas détectés comme en ESI. L'augmentation du taux d'acétonitrile ne s'accompagne donc pas de l'augmentation du signal du à ces clusters de plus en plus intenses comme en ESI. En effet sur la « mass map », les lignes horizontales de bruits dans la dernière partie de l'analyse ne sont pas présentes.

4 Conclusion

Le but de cette première partie était d'appliquer la méthodologie d'analyse développée entre la SFC et le simple quadripôle pour la caractérisation d'une huile de pyrolyse rapide. La faisabilité d'obtenir expérimentalement des données exploitables dans quatre modes d'ionisation en spectrométrie de masse a été montrée. Ainsi, dans tous les modes, des molécules dont la masse dépasse les 200 g/mol sont détectées. Or, la GCxGC/MS ne permet la caractérisation que de peu de composés au-delà de cette limite pour les huiles de pyrolyse rapide [2]. Ceci montre l'intérêt de la SFC pour l'analyse de matrice de ce type.

Les différents modes d'ionisation utilisés ont permis de mettre en lumière leur complémentarité. L'utilisation de ces quatre modes permet d'obtenir des informations sur toutes les parties du chromatogramme. Les modes positifs donnant des informations sur le début de l'analyse, là où les deux sources en négatif ne détectent que peu d'ions. Ce qui s'accorde avec les premières conclusions issues de l'injection de molécules modèles dans le chapitre 3 (élution de composés furaniques en début d'analyse par exemple). En comparaison, l'utilisation de l'APCI donne accès à des spectres de masse plus simples (une ou deux masses majoritaires par pics) qu'en ESI mais moins de pics sont détectés (36 et 46 en APCI négatif et positif contre 61 et 59 en ESI négatif et positif). L'originalité de ces travaux réside donc sur l'utilisation de plusieurs modes d'ionisation afin de détecter toutes les molécules présentes au sein de l'huile.

Cette étude se trouve cependant confrontée aux limitations techniques liées au spectromètre de masse employé (simple quadripôle) qui n'offre pas la précision suffisante (résolution unitaire en masse) pour parvenir à proposer des formules brutes pour les composés détectés. L'utilisation d'un spectromètre plus résolutif (IT-ToF/MS) a permis d'améliorer la qualité des données acquises et apporter plus de précision sur la mesure de masse lors de l'identification.

Partie B : Couplage avec un spectromètre de masse IT-ToF/MS

La résolution unitaire du spectromètre simple quadripôle constitue une limite pour atteindre l'identification des composés présents dans les huiles de pyrolyse rapide. Un couplage avec un autre spectromètre de masse possédant une résolution plus grande a alors été envisagé. L'utilisation d'un spectromètre IT-ToF/MS (Shimadzu) permet une mesure plus précise de la masse (résolution de 10 000) mais également la fragmentation de molécules afin d'élucider la structure de chaque constituant contenu dans un mélange complexe. L'utilisation d'un tel couplage étant nouveau à IFP Energies nouvelles, une méthodologie comportant plusieurs étapes a dû être mise en place : i) optimisation des conditions d'ionisation en SFC/MS avec le spectromètre IT-ToF/MS en se basant sur les conclusions de l'étude SFC/MS avec un simple quadripôle, ii) mise en place d'une méthodologie pour exploiter la quantité importante de données acquises via cette méthode SFC-UV/MS ainsi que celles issues de fragmentations successives d'ions (MS^2). Dans un premier temps la pertinence de cette méthodologie sera démontrée à l'aide de molécules modèles puis appliquée aux analyses de l'huile de pyrolyse rapide de biomasse.

1 Optimisation du couplage SFC/IT-ToF

1.1 Paramètres communs ESI et APCI

A partir du couplage entre la SFC et le simple quadripôle, les points d'attention particulière à avoir lors du couplage de la chromatographie en phase supercritique et la spectrométrie de masse ont été identifiés (débit de gaz, température et make-up). Les deux appareillages (simple quadripôle et IT-ToF/MS) disposent d'une architecture différente, notamment au niveau de leur source d'ionisation. Le principe reste le même dans les deux cas car on emploie une source ESI ou une source APCI mais la géométrie de ces sources est complètement différente selon l'appareil. Il est donc difficile de reprendre les valeurs optimisées pour le simple quadripôle et de les appliquer au couplage avec l'IT-ToF. Dans le cadre de notre développement, la question de quelles conclusions acquises sur le simple quadripôle pouvaient être transposées à l'IT-ToF a été vérifiée. Certains paramètres sont apparus comme non spectromètre dépendant :

- Les différentes températures post-source (température du CDL : ligne de désolvatation et Heat block : bloc chauffant l'entrée de la ligne de désolvatation) sont maintenues légèrement en dessous de leur valeur maximale afin de ne pas endommager l'équipement lors d'une utilisation prolongée.
- Le débit de gaz nébulisant est maintenu à la valeur minimale afin de ne pas amplifier le spray déjà formé par la décompression du CO_2 et perdre ainsi en sensibilité car le spray n'est plus focalisé sur l'entrée de la source.
- Toujours pour garder le spray focalisé sur l'entrée du spectromètre de masse, la position du spray en ESI a été conservée sur sa position d'origine définie par le constructeur (position 0

en abscisse et en ordonnée sur le repère gravé sur la source). Dans le cas de l'IT-ToF/MS, il est possible de modifier la position de la source sur deux dimensions. Les repères pour situer le spray sur ce plan ne sont alors pas intuitifs et il est difficile d'estimer la position du spray dans l'espace à l'aide de ces repères lors des différents tests menés. Le choix a donc été fait de laisser la position centrale pour toutes les acquisitions.

- La gamme de masses sélectionnée lors des analyses avec le simple quadripôle convient pour l'IT-ToF/MS.

Les paramètres identiques au simple quadripôle sont listés Tableau IV-3.

Tableau IV-3: Paramètres transposés de simple quadripôle à l'IT-ToF sans optimisation nécessaire

<i>Gamme de masse</i>	<i>Débit gaz nébulisant</i>	<i>Température cdl</i>	<i>Température Heat block</i>	<i>Position de la source</i>
80-800 uma	0.5 L/min	250 °C	280°C	Position d'origine

A ces paramètres s'ajoutent d'autres dont les réglages ont été propres à l'IT-ToF/MS. Premièrement la quantité de gaz séchant est régulée par une pression entre 0 et 250 kPa. En réalisant la même approche qu'auparavant, il a été déterminé qu'une pression de 100 kPa permettait d'éliminer au mieux le solvant sans affecter de trop la sensibilité de la détection.

Le second paramètre est propre aux analyseurs employés sur cet appareil. En effet, avant d'être détectés, les analytes traversent deux analyseurs, le piège ionique et le temps de vol. Une analyse MS est constituée de différents scans au cours du temps. Un scan est lui décomposé en deux temps. Les analytes sont d'abord concentrés au sein du piège ionique avant que ce « paquet d'ions » ne soit injecté dans le temps de vol pour être séparé selon la masse des ions le composant et enfin détecté. Plus d'explications sur le fonctionnement de l'appareil se trouve dans le chapitre 2. Lors de la concentration des ions dans le piège ionique, il est possible de régler ce temps d'accumulation. En pratique plus ce temps est long et plus la sensibilité d'un ion sera grande. Cependant plus ce temps d'accumulation est grand et plus la possibilité d'avoir des coélutions est grande également car on accumule ce que l'on a séparé via la SFC. Il faut donc déterminé le meilleur compromis. Dans notre cas, une accumulation de 30 ms permet un bon compromis entre une sensibilité suffisante et un temps de scan correct.

Enfin concernant le «make-up» employé, les conclusions sur la nature du solvant employé (dans le cas des huiles de pyrolyse rapide, le méthanol) ont été conservées tout en adaptant le débit pour s'adapter à la géométrie de source. Un débit de 750 µL/min est dans ce cas-là préconisé afin de parvenir au meilleur rapport signal/bruit en ESI.

Avec ce jeu de paramètres, on parvient donc à générer un signal stable en ESI négatif et positif.

1.2 Paramètres spécifique à l'APCI

L'utilisation de la source APCI sur cet appareil a demandé plus d'optimisation. Avec la configuration décrite dans la partie A, l'obtention d'un signal stable et exploitable n'a pas pu être réalisée. En effet, le débit ne dépasse pas 350 µL/min de solvant dans la source d'ionisation. Or pour

un fonctionnement optimal de source APCI, le constructeur préconise un débit entre 500 et 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Deux solutions sont donc possibles afin de d'augmenter le débit entrant dans la source d'ionisation. La première consiste à agir sur le ratio de split s'opérant au niveau du té n°2 (en rouge sur la Figure IV-1) en modifiant la géométrie des tubes. Par exemple en remplaçant le tube emmenant les effluents de la SFC vers la MS (tube jaune) par un tubing de $65\mu\text{m}$ de diamètre interne et une longueur de 100 cm, un débit de $570\ \mu\text{L}/\text{min}$ de solvant (pour une composition de 1% et un débit de « make-up » de $750\ \mu\text{L}/\text{min}$) peut être obtenu en théorie. Cela permettrait de travailler dans des conditions correctes pour cette géométrie de source d'ionisation. Une autre solution retenue, a consisté à conserver le montage fourni par le constructeur (avec le tube de $50\ \mu\text{m}$ de diamètre interne) et les conditions optimisées en ESI mais en ajoutant une seconde source de « make-up » juste avant la source d'ionisation. Sur ce second « make-up » la totalité du débit issu de cette pompe est envoyé vers la source d'ionisation (pas de split). Une quantité constante de solvant est ajoutée limitant ainsi les changements dans les processus d'ionisation.

1.2.1 Méthodologie d'optimisation

- Choix des expériences :

Il a donc été nécessaire d'optimiser ce second « make-up » de la même manière que le premier lors du développement sur le simple quadripôle. Pour cette configuration APCI, une optimisation de la nature et du débit de ce make-up #2 mais également de la température du four entourant le capillaire de transfert dans la source APCI ont été réalisées. L'optimisation de ces trois paramètres a été réalisée en deux étapes. La nature et le débit du make-up, qui sont des paramètres interdépendants dans un premier temps. Puis ensuite la température du four APCI.

Bien que le make-up #2 soit employé principalement pour apporter un débit supplémentaire et ioniser dans les meilleures conditions, il est également nécessaire de prendre en compte la nature de ce solvant afin de faciliter encore plus les échanges de charges entre les analytes et le pseudo plasma d'azote formé autour de l'aiguille corona. Dans cette optique, deux solvants ont été initialement sélectionnés car usuellement employés lors des couplages entre LC et MS dans la littérature : le méthanol et l'eau. Cependant utiliser ces solvants purs n'a pas permis l'obtention d'un signal stable et exploitable. Cela peut s'expliquer par le fait que l'utilisation d'eau pure induit un spray plus stable de par sa constante diélectrique élevée ($78\ \text{C}^2.\text{J}.\text{m}^{-1}$; à 25°C) mais sa volatilité faible est un obstacle à la création d'un signal correct. A contrario, l'emploi de méthanol seul, avec sa volatilité importante n'est pas un frein à l'obtention d'un spray mais son affinité protonique plus faible induit moins d'échanges électroniques avec les analytes et la quantité d'ions produite est trop faible pour être exploitée. Puisque les propriétés de ces solvants semblent complémentaires, des mélanges des deux ont été étudiés afin de mixer leur caractéristiques et de trouver le meilleur compromis. A partir de tests préliminaires, trois compositions ont été sélectionnées, 35/65, 50/50 et 65/35 (méthanol/eau v/v) ainsi que trois débits, 100, 200, 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, ce qui représente 9 expériences.

- Choix des critères et de la fonction de réponse

Les meilleures conditions de composition et débit ont été déterminées à partir d'un mélange de 36 molécules modèles (voir annexe du Chapitre 2) qui permettent de mimer les comportements et interactions des composés de l'huile de pyrolyse rapide. Pour chacune des molécules détectées, le rapport signal sur bruit (S/N) pour l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ en négatif ou $[\text{M}+\text{H}]^+$ en positif a

été normalisé par le minimum et le maximum observés pour cette molécule dans les 9 conditions. Pour chacune des 9 conditions, le résultat peut être représenté sous forme de « diagramme radar » (Figure IV-8), chaque branche correspondant au rapport S/N normalisé d'une molécule.

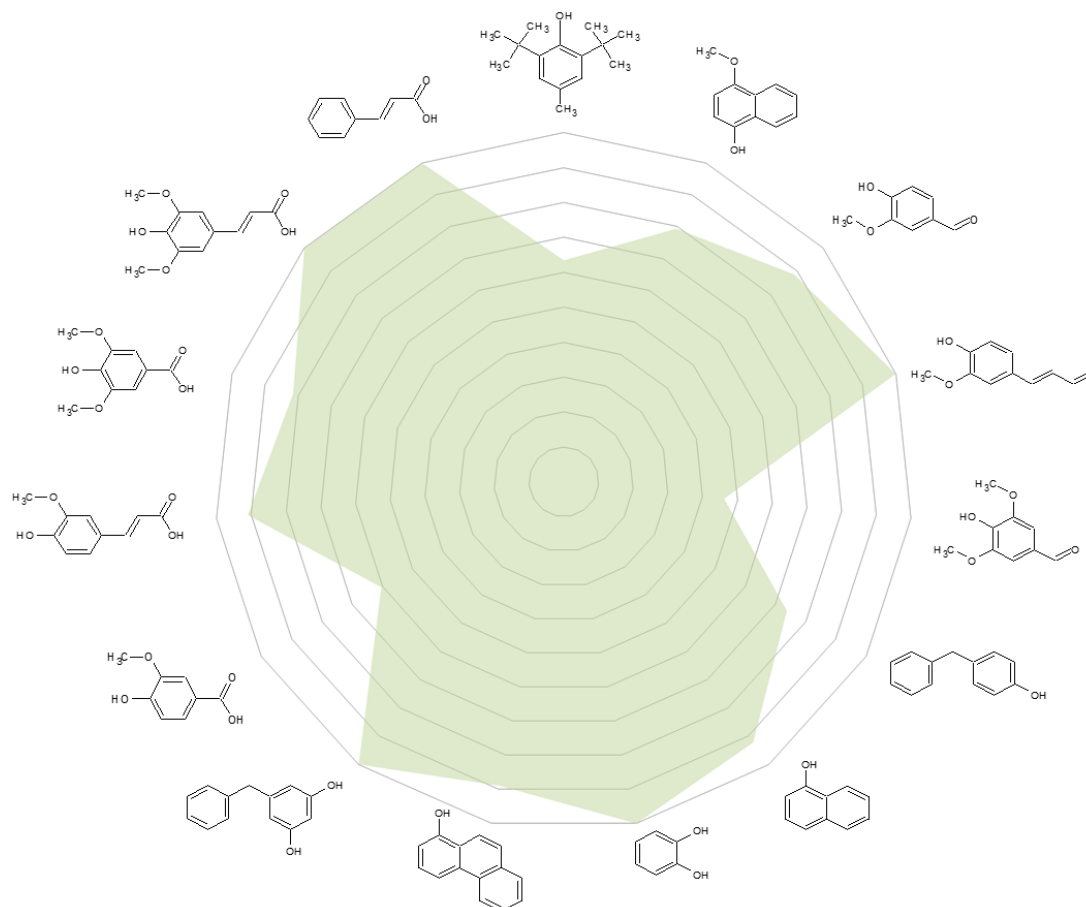


Figure IV-8 : Radar plot du rapport signal/bruit normalisé pour les molécules modèles détectées en APCI négatif avec 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (35/65, v/v) pour le make-up #2

L'ionisation de chacune des molécules modèles est plus ou moins impactée par la nature et le débit du solvant de « make-up ». L'importance de la surface occupée sur le radar plot (surface verte sur la Figure IV-8) peut être ainsi corrélée à la pertinence du jeu de conditions étudié. La fonction de réponse choisie représente le pourcentage d'occupation de cette surface colorée par rapport à la surface maximale possible (S/N normalisé = 1 pour toutes les molécules). Cette fonction de réponse peut ainsi être tracée en fonction du débit et/ou de la composition du make-up.

1.2.2 Résultats en APCI (-)

Dans un souci de clarté, on ne présentera que les optimisations réalisées en mode négatif car la plupart des molécules modèles répondent seulement en négatif. La même méthodologie a cependant été appliquée en mode positif avec moins de molécules détectées.

La Figure IV-9 montre la variation de la fonction de réponse en fonction de la composition du solvant de make-up pour 3 débits différents. Pour toutes les compositions, plus on augmente le débit de make-up #2, plus la fonction de réponse diminue car la formation du spray à l'extrémité du capillaire devient plus difficile. En effet, avec une quantité de liquide trop importante, le débit de gaz provenant à la fois de la décompression du CO_2 mais aussi du gaz nébulisant, n'est pas suffisant pour

parvenir pas à former des gouttelettes assez petites et le rendement d'ionisation diminue. Une diminution de ce débit de « make-up » semble induire une augmentation du signal. Il semble logique que diminuer encore ce débit sera bénéfique. Cependant, au-dessous de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, la quantité de solvant devient insuffisante et le signal instable. Un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ est donc le meilleur compromis.

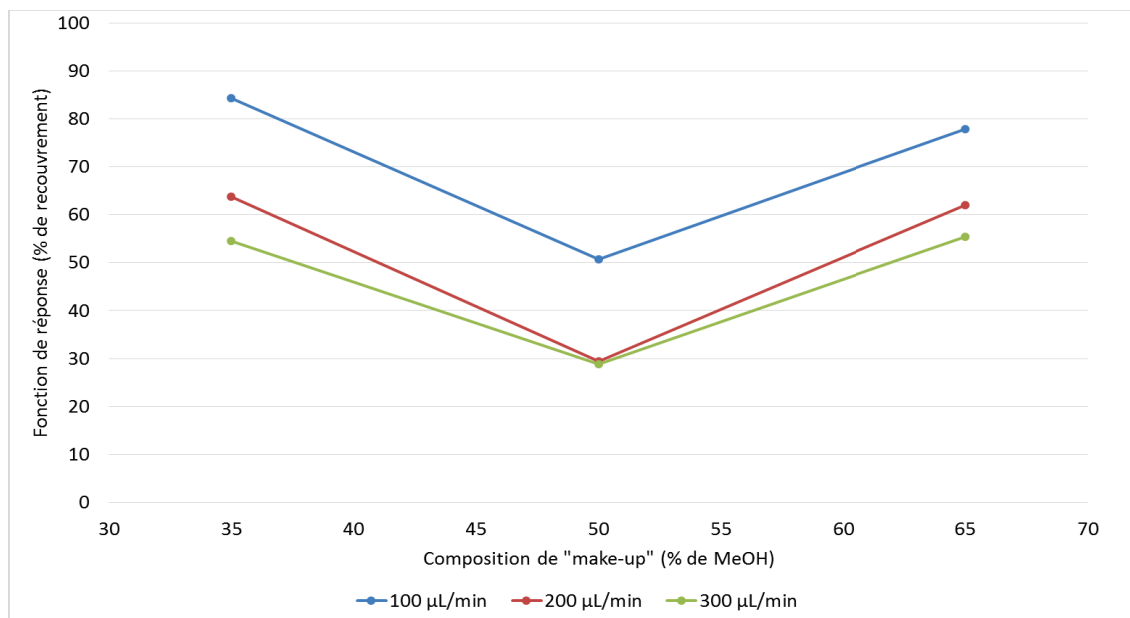


Figure IV-9 : Pourcentage de recouvrement du radar plot en fonction de la composition du solvant de make-up MeOH/H₂O et du débit

D'autre part, il semble que la fonction de réponse passe par un minimum pour une composition de 50 % MeOH, les compositions extrêmes (35 % MeOH et 65 % MeOH) donnant une réponse similaire. La Figure IV-10 montre la superposition des surfaces obtenues, à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, pour ces deux compositions (surface violette 65 % MeOH et surface verte 35 % MeOH). D'après la figure, il semble que la composition de 65 % MeOH soit très bien adaptée pour certaines molécules (S/N normalisé proche de 1) mais très mal adaptée pour d'autres (S/N normalisé proche de 0). Ce comportement est donc problématique dans le cadre des matrices complexes contenant un grand nombre de molécules très diverses. A contrario, la composition de 35 % MeOH n'est pas optimum pour la plupart des molécules mais conduit dans l'ensemble à un très bon rapport S/N normalisé. Elle est par conséquent préférable à 65 % MeOH bien que donnant la même fonction de réponse. Les conditions retenues pour le make-up #2 sont donc 35/65 MeOH/H₂O (v/v) à un débit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

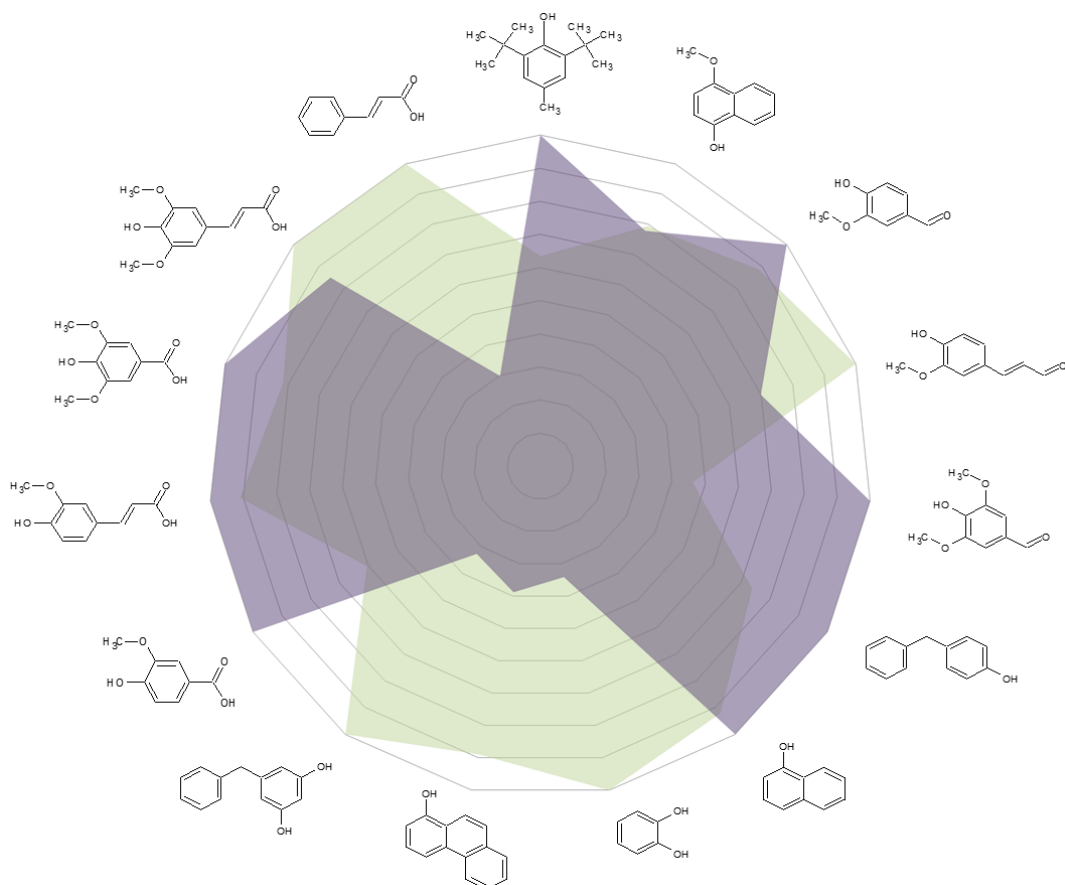


Figure IV-10 : Radar plot du ratio signal/bruit pour les molécules modèles détectées en APCI négatif avec 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de MeOH/H₂O (35/65, v/v) (en vert) (65/35, v/v) (en violet) pour le make-up #2

Dans la plupart des travaux portant sur le couplage avec la spectrométrie de masse, il a été montré que l'emploi d'additif (acide formique, acétate d'ammonium, TFA etc.) pouvait se traduire par une augmentation du signal et donc une meilleure sensibilité [3–6]. Il a donc été envisagé d'employer des additifs dans le make-up #2 afin d'améliorer les échanges électroniques lors du processus d'ionisation. De l'ammoniaque et de l'acide formique ont été respectivement testés pour les modes négatif et positif. Cependant, l'utilisation d'additifs peut réduire la volatilité des solvants. Une des solutions en APCI consiste à augmenter la température du four contenant le capillaire de transfert afin de faciliter l'évaporation des solvants et obtenir un spray permettant une bonne ionisation. Trois températures ont été testées (250, 350 et 450 °C) avec et sans d'additif (0.1 % volumique) dans le make-up #2 (35/65 MeOH/H₂O (v/v) à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$). La même démarche d'optimisation que précédemment a été appliquée. La Figure IV-11 montre les résultats obtenus avec l'ammoniaque en mode APCI négatif.

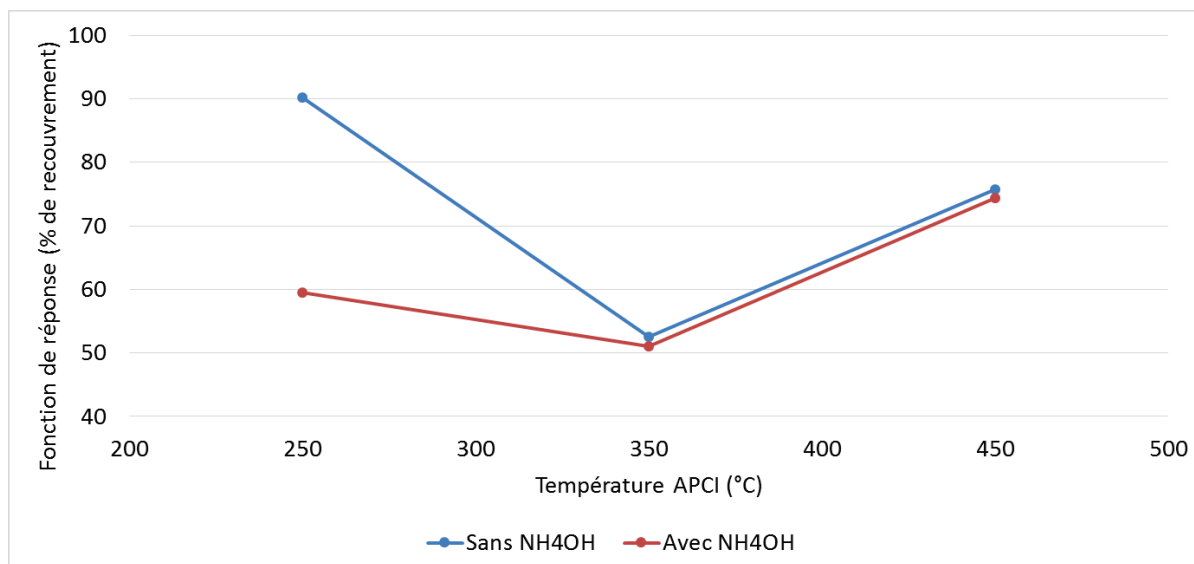


Figure IV-11 : Pourcentage de recouvrement du radar plot en fonction de la température du four APCI (250°C, 350°C, 450°C) avec (en rouge) ou sans (en bleu) additif (NH_4OH) en SFC-APCI (-)/MS

Contrairement à ce qui était attendu, l'ajout d'ammoniaque ne s'est pas traduit par une augmentation de la fonction de réponse. Cet ajout entraîne une modification du processus d'ionisation. La fonction de réponse est similaire (au-dessus de 350°C) ou plus faible (au-dessous de 350°C) en présence d'additif qui a pour effet de réduire la volatilité de la phase mobile. En particulier, à 250°C, la température est trop faible pour faciliter l'évaporation du solvant et donc permettre de créer plus facilement le spray nécessaire à l'ionisation. Les meilleurs résultats avec l'additif sont obtenus à 450°C mais même dans ces conditions, la fonction de réponse est plus faible que sans additif à 250 °C. Les résultats avec l'acide formique en positif montrent les mêmes tendances. C'est pourquoi, l'emploi d'additif n'a pas été retenu.

Grâce à l'expertise acquise avec le couplage de la SFC et d'un simple quadripôle et à la démarche d'optimisation présentée ici pour le couplage avec l'IT-TOF/MS, nous sommes parvenus à des conditions intéressantes de couplage entre deux appareils de marque différente : un instrument SFC (UPC² Waters) et un spectromètre de masse haute résolution (IT-ToF/MS Shimadzu). On dispose ainsi d'un jeu de conditions pour chaque mode d'ionisation (APCI +/- et ESI +/-) afin de réaliser des analyses SFC-UV/MS pour des échantillons complexes. Le Tableau IV-4 résume les différentes conditions retenues. A noter que la position de la source n'est modifiable qu'en ESI et la température APCI est propre à cette source.

Tableau IV-4: Conditions finales de MS avec IT-ToF/MS

<i>Gamme de masse</i>	<i>Temps d'accumulation</i>	<i>Débit gaz nébulisant</i>	<i>Pression gaz séchant</i>	<i>Température cdl</i>	<i>Position de la source en ESI</i>
80 - 800 uma	30 ms	0.5 L/min	100 kPa	250°C	Position d'origine
<i>Température Heat block</i>	<i>Tension d'interface (négatif et positif)</i>		<i>Energie collision</i>	<i>Gaz de collision</i>	<i>Température APCI</i>
280°C	-3.5 kV	4 kV	300 %	75 %	250°C

1.3 Application à l'analyse d'un composé : le Coniféraldéhyde

La Figure IV-12 montre les différents spectres de masse acquis avec les quatre modes d'ionisation pour l'analyse du coniféraldéhyde. En APCI, l'ion pseudo moléculaire est largement majoritaire dans les deux modes. Avec la précision en masse de l'IT-TOF/MS, il est possible de remonter à la formule brute du composé. Cependant, les spectres en ESI sont bien plus complexes. En effet, l'ion pseudo moléculaire n'est pas le seul présent, des adduits et également des dimères covalents $[M-2H+H]^+$ en positif et $[M-2H-H]^-$ en négatif composent le spectre. Une seule molécule donne plusieurs signaux de masse. Si la molécule éluée est seule, il est simple de comprendre le spectre de masse. Dans le cas d'une matrice complexe, comme les huiles de pyrolyse rapide, où de multiples coélutions peuvent intervenir, il est compliqué de déterminer à quelle formule brute et sous quelle forme correspond un rapport m/z donné. Il faudra donc prendre en compte cet aspect lors du retraitement des données ESI.

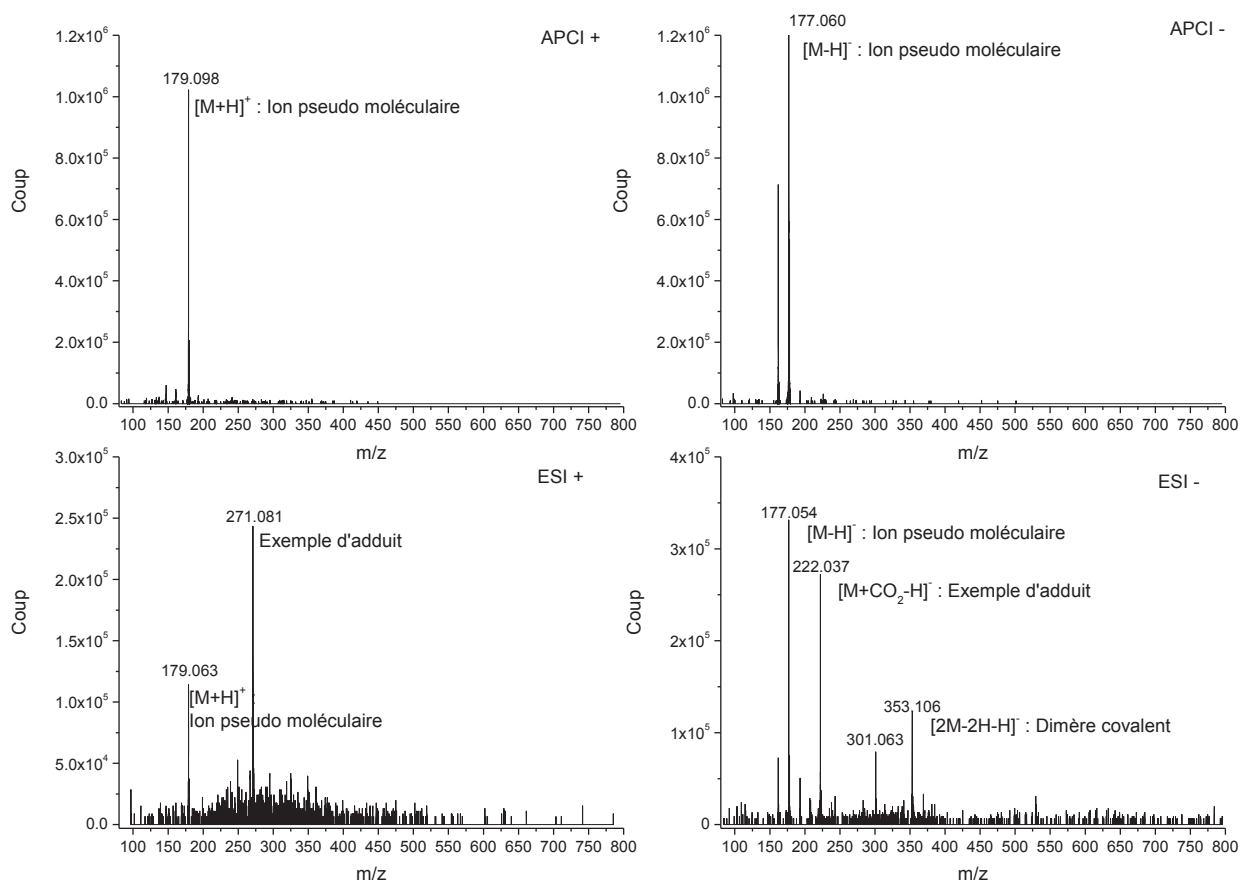


Figure IV-12 : Spectres de masses du Coniféraldéhyde obtenus dans les 4 modes d'ionisations en SFC-UV/MS

2 Méthodologie d'identification

Le chapitre 3 et les paragraphes précédents ont permis d'optimiser des méthodes d'analyse dans quatre modes d'ionisation différents. Les données correspondantes représentent une grande quantité d'informations et il est nécessaire de mettre en place une méthodologie de retraitement adaptée afin de parvenir à l'identification d'un maximum de composés. Plusieurs étapes ont été envisagées et sont résumées dans la Figure IV-13. En partant des données brutes comme on a pu le voir avec les acquisitions sur le simple quadripôle, une visualisation préliminaire des données soit sous forme de chromatogramme ou bien de « mass map » est possible. Pour chaque point des « mass map » des millions de possibilités, représenté par le cercle bleu sur la Figure IV-13, sont envisageables. En employant la HRMS, la mesure de masse précise va permettre en traitant les données à l'aide d'un logiciel développé au cours de cette thèse d'accéder à la formule brute de chacun des points présents sur la « mass map » mais une formule brute correspond encore à des centaines de molécules possibles (cercle orange de la Figure IV-13). L'identification structurale passe par l'exploitation des spectres de fragmentation en employant le logiciel développé ainsi qu'une plateforme disponible sur internet de comparaison de base de données. Chacune de ces étapes sera donc détaillée et validée dans la suite de ce chapitre.

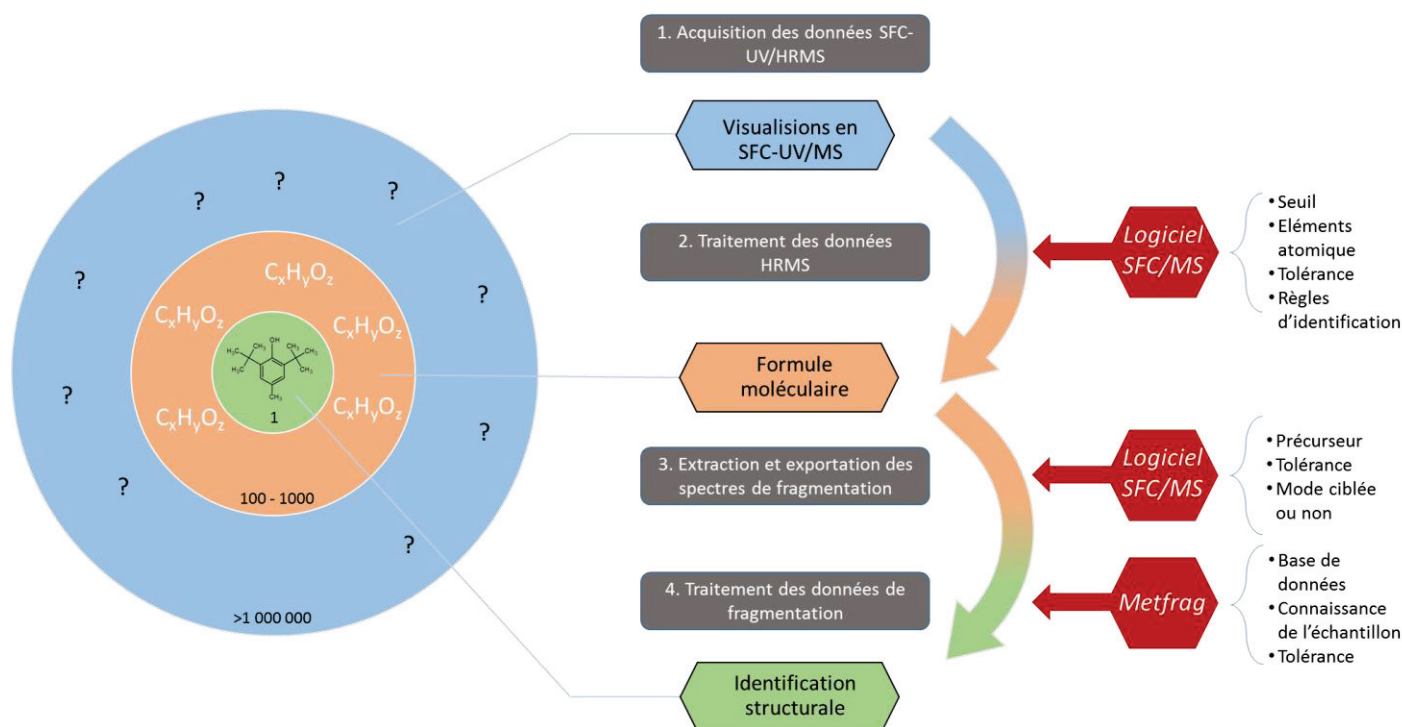


Figure IV-13 : Méthodologie appliquée pour le retraitement des données SFC/HRMS²

2.1 Gestion des données IT-ToF/MS et logiciel SFC/MS

En partant de la connaissance acquise lors du retraitement des acquisitions avec le simple quadripôle, le même type de visualisation (cartographie 2D avec échelle de couleur) a été envisagé. Malheureusement en désirant employer les outils développés (macro VBA Excel essentiellement), la quantité de données que représente une acquisition en SFC-UV/HRMS est devenue un obstacle à la bonne marche des processus de par la taille des fichiers et leur architecture. A la quantité de données s'ajoute également le fait que les fichiers de données sont structurés complètement différemment de par la présence des spectres de fragmentation intercalés tout au long de l'analyse. La solution a donc été de faire appel à des compétences de la Direction Mathématiques Appliqués de IFP Energies nouvelles (P. Duchene) afin de développer un logiciel employant des routines informatiques plus puissantes que celles disponibles avec Visual Basic d'Excel. Le choix a été fait de travailler à partir de formats de fichier exporté les plus utilisés actuellement (.mzxml et .cdf). En effet pour valoriser le travail effectué au cours de cette thèse, ce logiciel pourra être employé à IFP Energies nouvelles pour d'autres applications et d'autres couplages tels que la LC/MS par exemple. Plus de détails sur le logiciel nommé « logiciel SFC/MS » dans la suite du document, sont donnés dans le chapitre 2 où chacune des fonctionnalités principales du logiciel est décrite.

2.2 Traitement des données SFC/HRMS

La première étape de la méthodologie (Figure IV-13) que l'on veut mettre en place pour la caractérisation d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse consiste à visualiser les données sous forme de « mass map » puis d'attribuer une formule brute à chacun des points apparaissant sur cette cartographie. Afin de vérifier que cette méthodologie est performante et fiable, nous avons fait le choix de travailler dans un premier temps sur un mélange modèle déjà employé contenant 36

molécules modèles (chapitre 2). Dans un souci de concision, on ne présentera ici que le processus de validation réalisé pour le mode APCI négatif qui permet de détecter un grand nombre de molécules et semble a priori adapté à nos échantillons. Il illustrera la méthodologie qui a été appliquée de la même manière aux autres modes d'ionisation.

La Figure IV-14 illustre de deux manières différentes l'analyse du mélange modèle par SFC/APCI(-)-IT-ToF/MS. Sur le chromatogramme on remarque que seulement 15 pics émergent de la ligne de base. En parallèle sur la cartographie, la visualisation du rapport m/z permet de repérer certaines coélutions et ainsi de détecter 20 composés sur les 36 injectés.

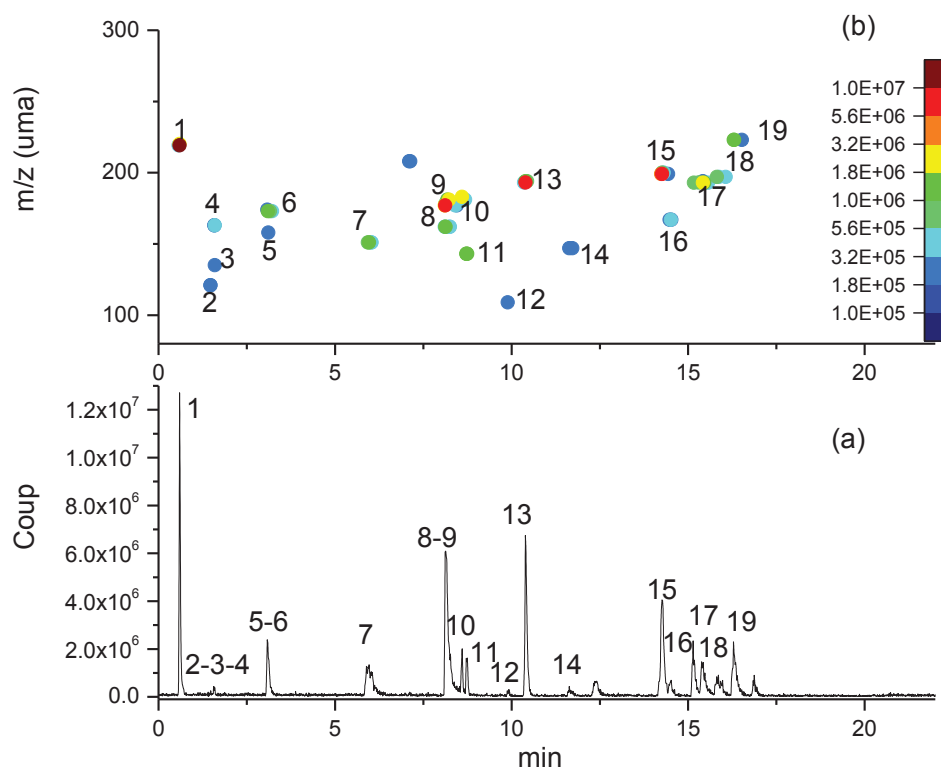


Figure IV-14 : Chromatogramme BPC (a) et mass map (b) du mélange de molécules modèles détectées en SFC-APCI(-)-IT-TOF/MS.

Pour chacun des points sur la cartographie il a été possible via le logiciel SFC/MS d'attribuer une formule brute à l'aide de la mesure de masse précise et des règles de calcul décrites dans le chapitre 2 (Tableau IV-5). A travers ce tableau on peut identifier les composés dans la mesure où l'échantillon est connu. Dans le cadre d'un échantillon complexe nécessitant une caractérisation moléculaire, chacune de ces formules brutes peut correspondre à des centaines d'isomères différents soit de position soit de constitution. L'utilisation de la spectrométrie de masse même très précise ne peut parvenir à résoudre ce problème d'identification. Une étape supplémentaire de fragmentation MS² est alors nécessaire pour identifier la structure de la molécule éluée et détectée.

Tableau IV-5: Identification de formules brutes des molécules modèles détectées en APCI négatif à l'aide du logiciel SFC/MS

N°	Nom UIPAC	Nom commun	Temps de rétention (min)	Masse précise (amu) [M-H] ⁻	Formule brute	Erreur en masse Δm (ppm)
1	2,6-ditertbutyl-4méthylphenol	2,6-ditertbutyl-4méthylphenol	0.59	219.1765	C ₁₅ H ₂₄ O ₁	-0.63
2	2,6-Diméthylphenol	Xylenol	1.47	121.0685	C ₈ H ₁₀ O ₁	-14.77
3	2,4,6-triméthylphenol	Triméthylphenol	1.60	135.0790	C ₉ H ₁₂ O ₁	-19.93
4	2-méthoxy-4-(E)-prop-1-enyl]phenol	Isoeugenol	1.60	163.0792	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	-18.01
5	1,3-Diméthoxy-2-hydroxybenzene	Syringol	2.53	153.0582	C ₈ H ₁₀ O ₃	8.37
6	2-Méthoxy-1-naphthol	Méthoxy naphthol	3.05	173.0628	C ₁₁ H ₁₀ O ₂	19.05
7	4-hydroxy-3-méthoxy benzaldehyde	Vanillin	5.52	151.0425	C ₈ H ₈ O ₃	19.41
8	(E)-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)prop-2-énal	Conifer aldehyde	8.16	177.0589	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	8.93
9	4-hydroxy-3,5-diméthoxy benzaldehyde	Syring aldehyde	8.18	181.0560	C ₉ H ₁₀ O ₄	5.34

10	4-Benzylphenol	Hydroxy diphenyl methane	8.62	183.0841	C ₁₃ H ₁₂ O ₁	13.99
11	Naphtalen-1-ol	Naphtol	8.76	143.0516	C ₁₀ H ₈ O ₁	14.41
12	Benzene-1,2-diol	Catechol	9.90	109.0300	C ₆ H ₆ O ₂	-2.77
13	9-Phenanthrenol	Phenantrol	10.44	193.0691	C ₁₄ H ₁₀ O ₁	17.67
14	(2E)-3-Phénylprop-2-énoic acid	Trans-cinnamic acid	11.62	147.0435	C ₉ H ₈ O ₂	-11.24
15	4-benzylbenzene-1,3-diol	Benzyl resorcinol	14.30	199.0779	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	-9.81
16	4-Hydroxy-3-méthoxybenzoic acid	Vanillic acid	14.55	167.0380	C ₈ H ₈ O ₄	-14.86
17	(E)-3-(4-hydroxy-3-méthoxy-phényl)prop-2-énoic acid	Ferulic acid	15.42	193.0539	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-8.97
18	4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzoic acid	Syringic acid	15.88	197.0459	C ₉ H ₁₀ O ₅	1.79
19	3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)prop-2-énoic acid	Sinapic acid	16.28	223.0656	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	15.25

2.3 Traitement des données de fragmentation

Afin d'élucider la question de la structure des molécules détectées, une des solutions offertes par le spectromètre de masse employé est d'isoler chacune des molécules d'intérêt dans le piège à ions pour ensuite les fragmenter et déduire à partir de la masse des fragments quels groupements sont présents dans la molécule isolée.

Le détail des paramètres de fragmentation est décrit dans le chapitre 2. Une fois les données acquises, le logiciel SFC/MS permet de regrouper les scans de fragmentation correspondant au même ion précurseur. Cette étape est nécessaire car en employant un piège ionique pour fragmenter des molécules, le processus, nommé CID (collision induced dissociation), n'est pas aussi répétable que ceux réalisés à haute énergie dans des sources sous pression réduite. Les spectres de fragmentations sont donc dépendants du spectromètre et des conditions avec lesquelles ils ont été acquis. Cette problématique nuit à la stratégie d'identification basée sur une comparaison avec des bases de données. Il faut donc trouver à la fois une base de données qui regroupe les molécules que l'on cible (petites molécules oxygénées en majorité) mais également une base de données acquises dans des conditions de fragmentation similaires, puisque les spectres de fragmentations sont dépendants de ces conditions. A notre connaissance, il n'existe pas de telles bases. Actuellement les bases de données les plus fournies sont dédiées à des applications spécifiques comme la métabolomique par exemple[7].

Une autre possibilité existe afin d'exploiter les spectres de fragmentation. Certaines plateformes, comme MetFrag proposent de comparer les spectres obtenus expérimentalement à des spectres de fragmentation simulés *in silico*. Par un système de calcul, la plateforme va prédire les fragments possibles pour une molécule donnée ainsi que l'intensité relative de chaque fragment. Cette approche théorique a l'avantage de s'affranchir de spectre de référence et des conditions de fragmentation utilisée. Cependant les algorithmes de calcul constituent une source d'amélioration continue et font l'objet de nombreuses modifications.

Le choix a été fait de travailler avec l'aide d'une plateforme internet permettant d'utiliser les deux approches en simultané : comparaison avec une base de données et comparaison avec des spectres *in silico*. Cette plateforme nommée MetFrag et son fonctionnement sont également décrite dans le chapitre 2.

Les spectres MS², comparés via la plateforme MetFrag, ont été générés par le logiciel SFC/MS qui moyenne les différents spectres de fragmentations acquis pour un même précurseur. Ces spectres sont alors plus représentatif des phénomènes de fragmentation qui peuvent s'opérer. Il est possible d'exporter ce spectre moyenné sous forme de fichier texte et ainsi l'ajouter sur la plateforme MetFrag. La plateforme classe les candidats possibles en fonction de la similarité à la fois avec la base de données MoNA (Massbank of North America) et avec l'approche *in silico* géré par la plateforme elle-même.

Pour valider cette méthodologie et mesurer le degré de confiance que l'on peut apporter à l'utilisation de cette plateforme de comparaison, les spectres MS² des pics des molécules modèles (Figure IV-14) ont été exportés et exploités via cette méthodologie. L'identification de différentes molécules modèles employées dans le mélange et détectées avec ce mode d'ionisation est alors correcte. Il faut cependant noter que seules les fonctions chimiques ont été vérifiées. Les isomères de positions n'ont pas été différenciés à ce stade. Ces considérations ne semblent pas pertinentes à ce

niveau de l'étude et impossibles à résoudre avec l'appareillage à notre disposition. L'approche semble donc possible pour sept molécules sur les 20 détectées et dont la formule brute a été identifiée. Pour les autres molécules non identifiées structurellement, les spectres de fragmentation enregistrés ne sont pas assez discriminant pour parvenir à une identification correcte. Deux cas de figure existent alors. Premièrement les spectres de fragmentation ne contenant que des fragments non discriminant (par exemple une perte de CH_3). Dans ce cas-là, la plateforme Metfrag ne peut différencier deux composés ayant tous les deux cette perte et les scores observés entre les différents candidats sont proches. Le second cas regroupe les spectres de fragmentations trop pauvres en terme de signal enregistré pour parvenir à une quelconque identification que ce soit *in silico* ou via la base de données. Pour les deux cas, les conditions de fragmentation utilisées ne sont pas peut-être pas adaptées pour toutes les molécules. Il est compliqué de fragmenter toutes les molécules de manière correcte avec seulement un seul set de conditions de fragmentation. L'utilisation d'un compromis pour ces paramètres ne semble pas possible.

Pour les molécules correctement identifiées, il est nécessaire de déterminer si la matrice complexe a un impact sur la qualité des spectres de fragmentation. La même méthodologie a été appliquée à une huile de pyrolyse rapide de biomasse dopée avec les molécules modèles. Les dilutions ont été ajustées afin de conserver la même dilution pour l'huile de pyrolyse que lors des expériences précédentes (voir chapitre 3) et avoir chacune des molécules modèles à une concentration de 200 mg/kg dans le mélange final.

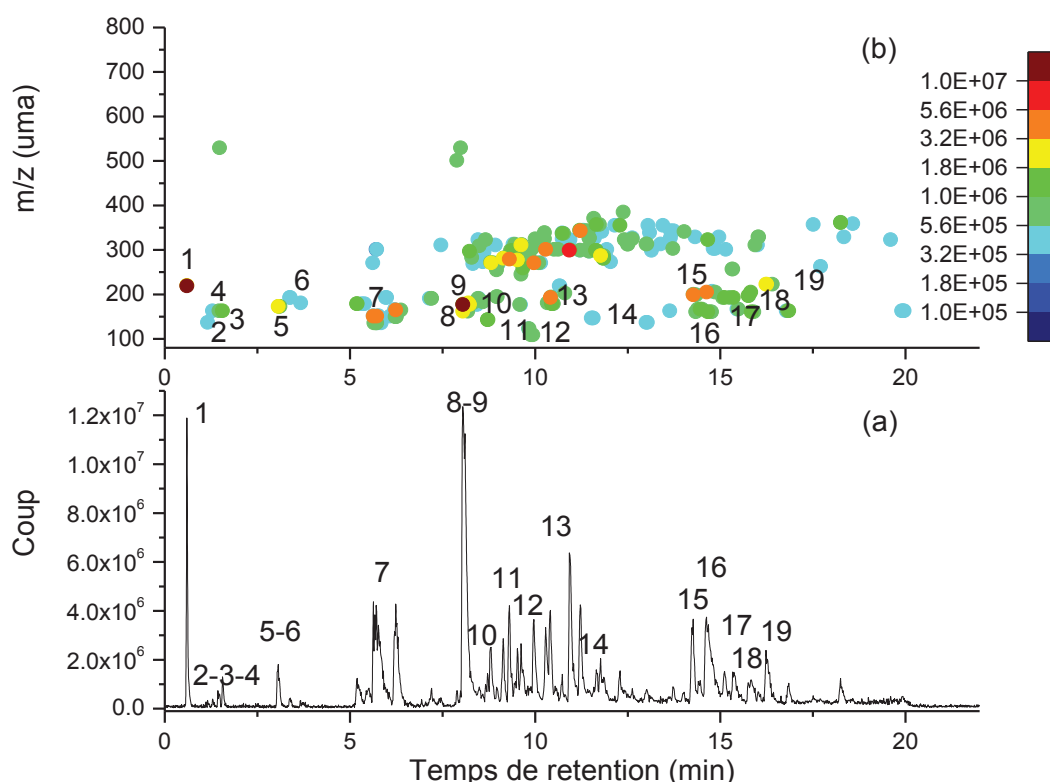


Figure IV-15 : Chromatogramme (a) et mass map (b) en SFC-APCI (-)IT-ToF/MS de l'huile de pyrolyse rapide dopée avec le mélange de molécules modèles (200 mg/kg par composé)

La Figure IV-15 montre que l'intensité des pics des molécules modèles identifiées avec les numéros (Figure IV-14) reste du même ordre de grandeur que le reste de l'échantillon. La concentration des molécules modèles n'est donc pas prépondérante et n'écrase pas le signal du aux

composés de l'huile de pyrolyse rapide. La concentration de 200 ppm semble donc être appropriée pour cette étude. L'effet de la matrice complexe sur la qualité des spectres de fragmentation peut être évalué car les molécules modèles coéluent avec certains composés de la bio-huile. La Figure IV-16 illustre 3 exemples de spectres de fragmentation pour trois précurseurs différents présents à la fois dans le mélange modèle et dans l'huile dopée. Pour chaque composé, les spectres de fragmentation sont très sensiblement les mêmes que ce soit dans une matrice simple comme le mélange modèle ou bien dans une matrice très complexe comme l'huile de pyrolyse rapide dopée. Les résultats donnés par la méthodologie de la Figure IV-13, semblent donc valables dans le cas d'une matrice complexe telle que les bio-huiles.

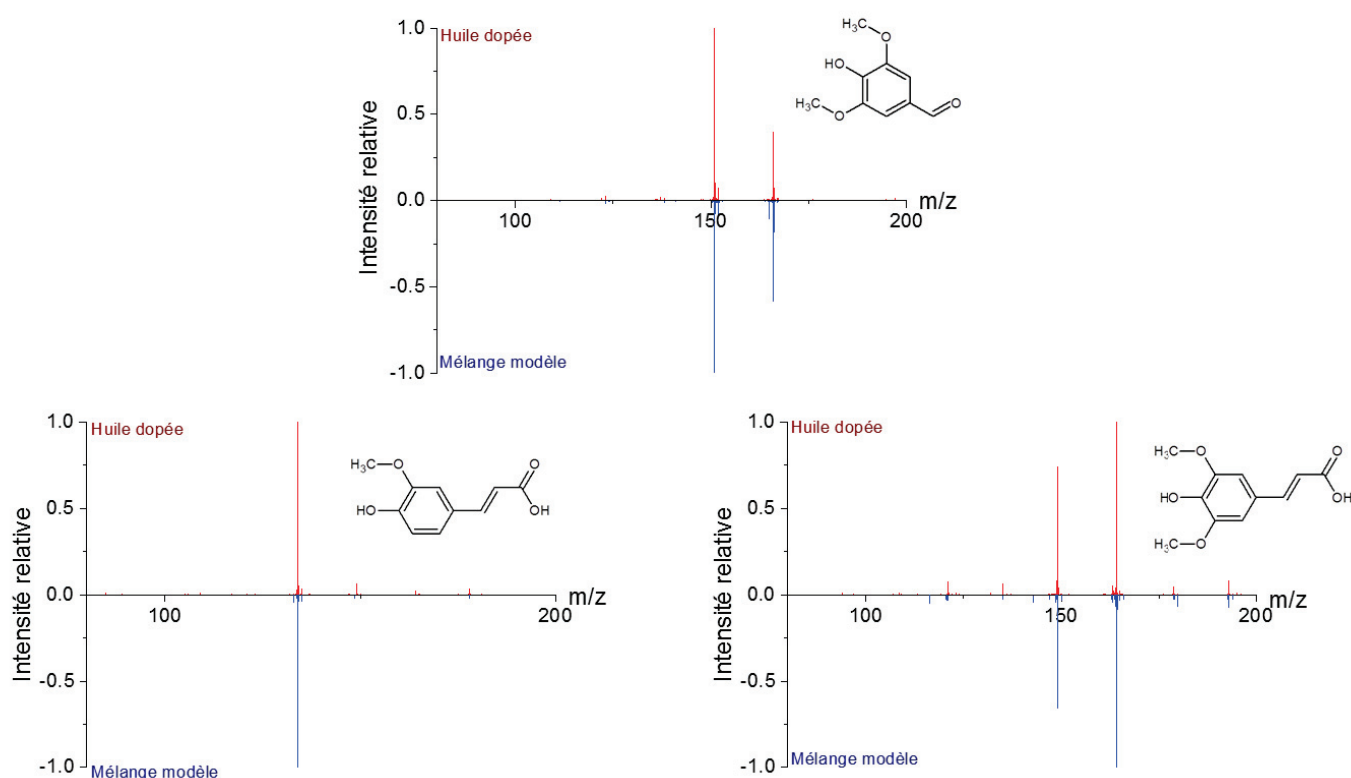


Figure IV-16 : Comparaison des spectres de fragmentations de trois composés différents pics dans le mélange modèle (en bleu) et dopés dans l'huile (en rouge)

3 Application de la méthodologie à une huile de pyrolyse rapide de biomasse

3.1 « Mass map » de l'huile de pyrolyse

Selon la stratégie définie précédemment, les cartographies pour l'huile de pyrolyse rapide, peuvent être comparées pour les quatre modes d'ionisation ESI(-), ESI(+), APCI(-), APCI(+) sur la Figure IV-17. En les comparant également avec celles acquises avec le simple quadripôle (partie A), des tendances similaires se dégagent. En mode négatif, que ce soit en APCI ou en ESI, la majorité des masses détectées sont entre 200 et 400 uma et correspondent à des composés élués sur le palier

isocratique. En APCI (-), des masses entre 100 et 200 uma sont détectées pour des composés élués dans le palier isocratique. Bien qu'optimisé comme les autres modes, l'APCI (+) montre un faible nombre de composés détectés en comparaison des trois autres modes d'ionisation. La nature des composés (fortement oxygénés) élués en SFC est peut-être peu propice à une détection avec une source APCI (+). Les points les plus intenses se trouvent cependant dans le palier isocratique tout comme en ESI (+). Une ionisation positive semble appropriée pour les composés peu retenus en SFC comme les furanes (cf. chapitre 3) alors qu'en mode négatif, ce sont les composés les plus retenus comme des composés phénoliques qui semblent plus facilement ionisés. Ces premières informations ne permettent pas d'avoir une idée précise des structures des composés élués en SFC. Il faut donc appliquer la méthodologie développée pour aller plus en détail.

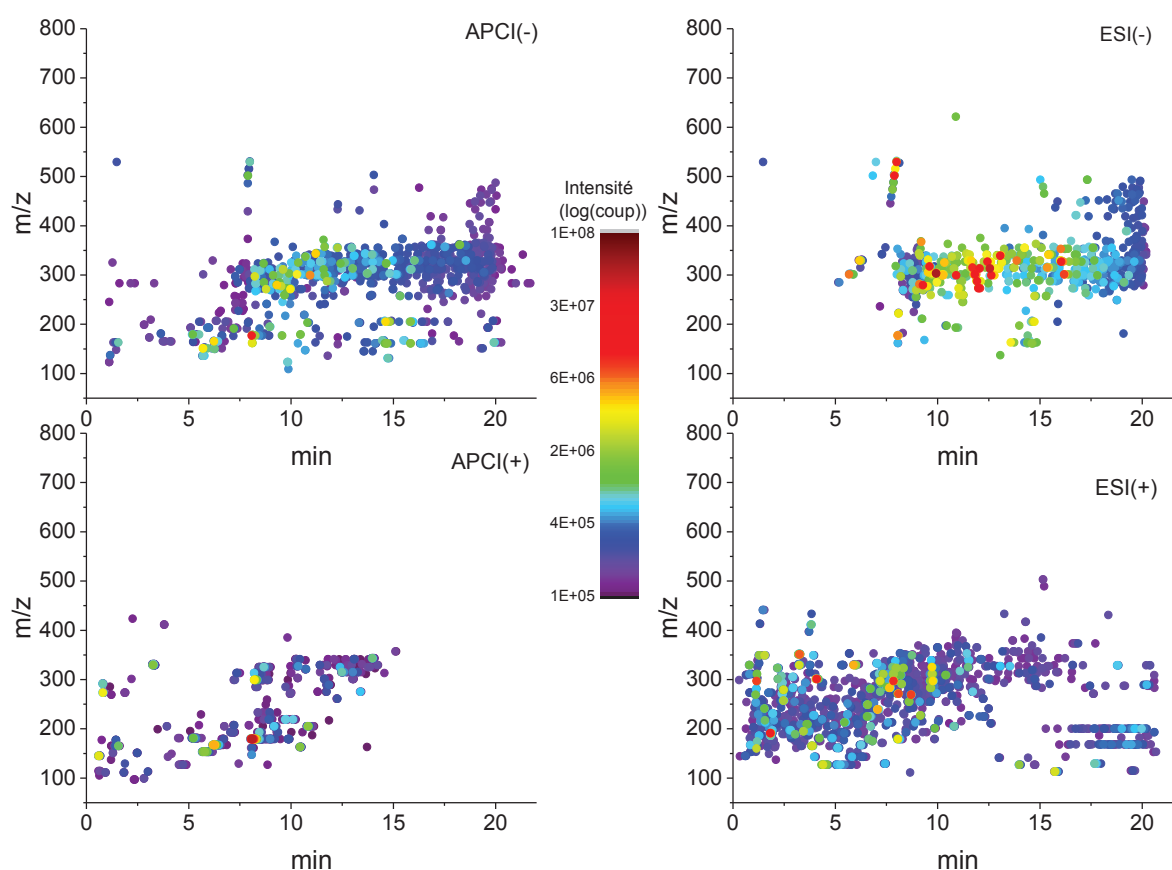


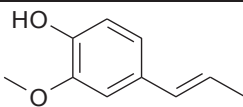
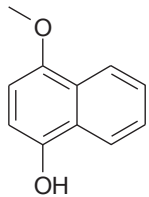
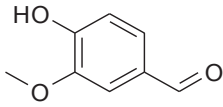
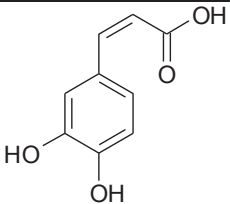
Figure IV-17 : Mass map d'une huile de pyrolyse rapide en SFC/HRMS

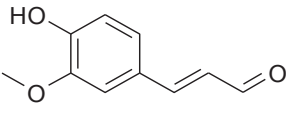
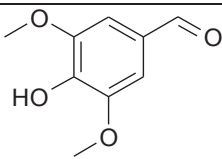
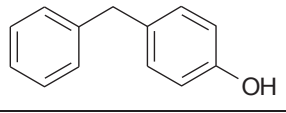
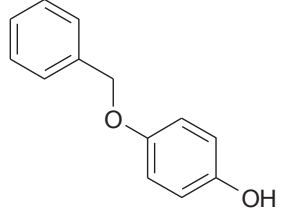
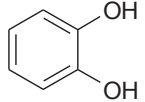
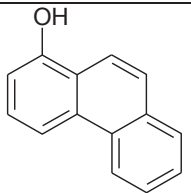
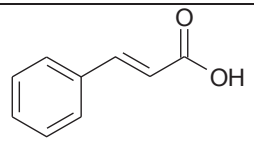
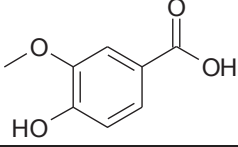
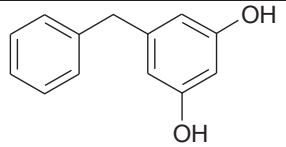
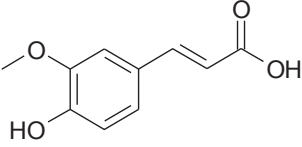
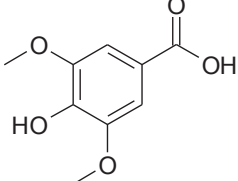
3.2 Recherche de molécules modèles dans l'huile de pyrolyse

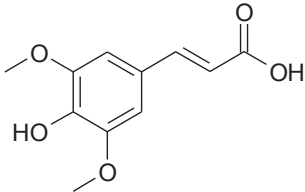
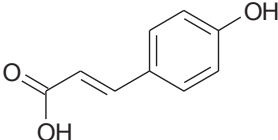
L'objectif est de vérifier à l'aide des informations acquises via l'injection des molécules modèles si elles font partie de la matrice bio huile ou non. Pour cela, les masses précises des différentes molécules modèles ont été recherchées dans les données acquises avec l'huile non dopée. En cas de correspondance entre les masses, les temps de rétention sont également comparés afin de pouvoir attribuer le composé détecté au standard correspondant. Le Tableau IV-6 résume la correspondance en termes de masse et de temps de rétention entre des molécules de l'huile de pyrolyse rapide et les molécules modèles. Les deux critères (masse et temps de rétention) ne sont cependant pas suffisants pour identifier avec certitude les composés, notamment du fait de la présence possible

d'isomères de position. Mais ils permettent de faire un premier screening rapide. Notre mélange modèle a été élaboré d'après la revue de Stas et al. [2] basée majoritairement sur des analyses GC/MS et/ou GCxGC/MS. Les molécules de faibles masses moléculaires (telles que le furane) ne sont pas détectées dans les conditions d'ionisation de notre étude. De plus la majorité des composés a été détectée en mode négatif avec les deux sources (ESI et APCI). En effet, la plupart de ces molécules modèles ont des groupements hydroxyle (-OH) ou méthoxy (-OCH₃) qui peuvent facilement donner un proton lors du processus d'ionisation et permettre ainsi de former un ion moléculaire [M-H]⁻. Seul le coniféraldéhyde est détecté dans les quatre modes d'ionisation. Il possède à la fois des fonctions alcool et méthoxy lui assurant une réponse en mode négatif mais également une fonction cétone facilitant la formation d'un ion pseudo moléculaire en mode positif [M+H]⁺. Le fait de ne détecter qu'une seule molécule dans les quatre modes étaye l'hypothèse de complémentarité des modes d'ionisation pour atteindre une caractérisation totale de l'échantillon. Il est très intéressant de noter également que des isomères dont la formule brute était identique ont été détectés avec des temps de rétention différents (case en gras dans le Tableau IV-6). En effet selon l'arrangement des atomes, les interactions avec la phase stationnaire peuvent varier. Cette méthodologie ciblée sur des composés suspectés d'être présents n'est intéressante que si le jeu de composés suspectés représente l'intégralité des molécules présentes dans l'huile et si d'autre part ces composés sont disponibles en standard. Malheureusement cette approche ciblée n'est pas possible pour une caractérisation globale du fait du très grand nombre de molécules inconnues présentes dans l'huile. Néanmoins sur une sélection de pics les plus intenses une analyse ciblée aurait permis d'améliorer nettement la qualité des spectres de fragmentation.

Tableau IV-6: Molécules modèles détectées dans l'huile de pyrolyse rapide grâce à leur masse et leur temps de rétention

Molécules modèles			Détection dans l'huile			
Nom IUPAC (Nom usuel)	Tr (min)	Structure	Tr en APCI (-) (min)	Tr en APCI (+) (min)	Tr en ESI (-) (min)	Tr en ESI (+) (min)
2-methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]phenol (Isoeugenol)	1.59		1.58	1.53	x	x
2-Methoxy-1-naphthol	3.05		3.10	x	x	x
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (Vanillin)	5.43		5.49	5.53	x	x
acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-énoïque (Caffeic acid)	7.11		6.24	x	14.68	x

(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enal (Coniferaldehyde)	8.11		8.06	8.15	8.07	8.08
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (Syringaldehyde)	8.11		3.67	✗	19.09	✗
4-Benzylphenol	8.61		✗	✗	17.47	✗
4-(benzyloxy) phenol (Monobenzene)	9.28		✗	✗	13.65	3.08
Benzene-1,2-diol (Catechol)	9.90		9.90	✗	✗	✗
9-Phenanthrenol	10.44		19.61	✗	10.53	✗
(2E)-3-Phenylprop-2-enoic acid (Trans-cinnamic acid)	11.60		10.68	✗	10.67	✗
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (Vanillic acid)	14.32		14.39	✗	14.41	✗
4-benzylbenzene-1,3-diol (Benzylresorcinol)	14.50		✗	✗	13.65	3.08
(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid (Ferulic acid)	15.42		5.94	✗	10.99	✗
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (Syringic acid)	15.80		10.37	✗	10.46	✗

3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (Sinapic acid)	16.26		16.31	x	14.77	x
acide 3-(4-hydroxyphenyl)-prop-2-énoïque (Para-coumaric acid)	16.91		13.64	x	13.57	x

3.3 Méthodologie d'identification appliquée à l'huile

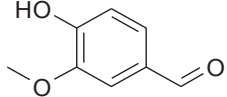
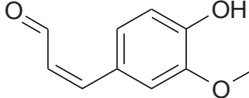
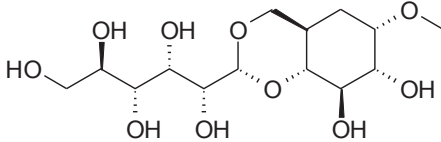
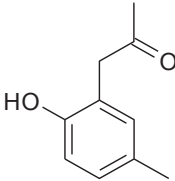
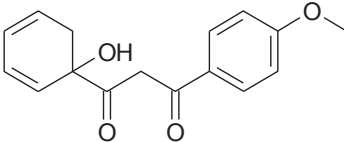
A partir d'analyses non ciblées de l'huile de pyrolyse rapide, la méthodologie développée avec les molécules modèles (traitement des spectres MS² à l'aide de MetFrag) a été testée sur des pics intenses en APCI négatif. Comme pour les molécules modèles, une extraction des spectres MS² correspondant aux pics et donc aux ions précurseurs sélectionnés a été réalisée. Le Tableau IV-7 résume les différentes structures proposées.

Peu de molécules ont un score très différenciant sur le critère in silico et les deux autres scores ne sont pas différenciant en fonction de la présence ou non de la molécule dans la base MoNA ce qui rend l'identification compliquée. Pour rappel (Cf. chapitre 2), ce score correspond à la somme de trois critères calculés et normalisés par la plateforme MetFrag. Deux spectres de fragmentation seulement (vanilline et coniféraldéhyde) sont identiques à celui présent dans la base de données.

Pour les scores MetFrag en dessous de 2, la combinaison des comparaisons de spectres in silico et issus de la base MoNA ne permet pas d'obtenir une identification fiable. En effet, soit l'identification va donner des structures très exotiques et dont la présence dans l'huile de pyrolyse est très peu plausible (par exemple le C₁₃H₂₄O₁₁ détecté à 12.28 min). Dans ce cas la connaissance sur la matrice est nécessaire pour réfuter cette identification.

Une autre possibilité regroupe des structures possibles (exemple du C₁₀H₁₂O₂ détecté à 1.58 min) mais sans avoir de similarité exacte pour l'identification avec la base de données MoNA. De plus dans ce cas-là, la formule brute ainsi que le temps de rétention correspond à ceux d'une molécule modèle injectée (l'isoeugenol). Comme le doute sur l'identification existe, le spectre de fragmentation obtenu dans le cas de l'huile de pyrolyse a été observé et ce dernier apparaît très pauvre (seulement un fragment peu intense). La comparaison est donc plus compliquée pour la plateforme MetFrag et peut donner une fausse identification. La qualité des spectres de fragmentation est donc primordiale et donc difficile à atteindre en mode non ciblé. La concentration plus faible des analytes détectés dans l'huile par rapport à celles des molécules modèles peut être une explication à la différence de résultat. Les conditions de fragmentations en mode non ciblé ne sont sûrement pas optimales et les spectres de fragmentation obtenus pas de qualité suffisante pour utiliser cette approche. Pour confirmer ou réfuter ces identifications, l'injection du standard correspondant s'il est disponible peut être une solution. L'utilisation d'une base de données plus proche en termes de conditions de fragmentation (base de données interne à construire par exemple) semble également une autre voie d'amélioration certaine. Enfin la connaissance de la matrice peut permettre de faire un choix dans les candidats les mieux classés par MetFrag.

Tableau IV-7: Identification des pics principaux de l'huile de pyrolyse rapide en SFC/APCI (-)-IT-ToF/MS

Formule Brute	Temps (min)	Structure possible	Score MetFrag	Score 1 (in silico)	Score 2 (Spectral similarity)	Score 3 (Exact spectral similarity)
C ₈ H ₈ O ₃	5.82		2.90	0.92	1	0.98
C ₁₀ H ₁₀ O ₃	8.06		2.89	0.92	1	0.96
C ₁₃ H ₂₄ O ₁₁	12.28		1.99	1	0.99	0
C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1.58		1.99	1	0.99	0
C ₁₆ H ₁₆ O ₄	9.96		1.94	1	0.94	0

L'identification avec certitude de molécules dans la matrice complexe semblent donc compliquée et dépendante de la qualité des spectres de fragmentation. Il existe plusieurs voies d'amélioration puisque le classement des candidats prend en compte à la fois l'approche *in silico* et la comparaison avec une base de données. Pour le calcul *in silico*, plusieurs approches sont possibles et les équations de calculs de spectres sont encore en constante amélioration. Un témoin de cette rapide évolution est le nombre de participants au concours CASMI qui consiste à identifier la structure de petites molécules à partir d'une approche *in silico* et d'un spectre de fragmentation [11]. La plateforme MetFrag figure parmi les bons candidats à ce concours mais une des possibilités pourrait consister à tester les autres algorithmes *in silico* participant à ce concours pour comparaison.

Le second critère du score MetFrag est calculé en comparant les spectres de fragmentation expérimentaux à ceux présents dans la base de données (MoNA). En améliorant la qualité des spectres de fragmentation (moins de bruit de fond, meilleures conditions de fragmentations), il est donc théoriquement possible d'être plus précis lors de l'identification. De plus il est possible avec le spectromètre de masse IT-ToF/MS de réaliser des analyses ciblées. En pratique, des filtres pour les ions précurseurs à fragmenter sont ajoutés et les paramètres du spectromètre sont modifiés pour décrire au mieux ces précurseurs et leurs fragments. Pour vérifier l'impact de ce changement, on compare alors les spectres de fragmentation obtenus dans les deux modes (ciblé et non ciblé). La Figure IV-18 illustre le cas des molécules identifiées dont l'intensité de l'ion précurseur diffère entre les deux modes. On remarque que pour les cas (a) et (b), correspondant à des pics intenses en MS¹, la

différence entre le spectre de fragmentation en mode ciblé et non ciblé porte sur la sensibilité. L'impact sur le score et donc sur l'identification via MetFrag faible. Pour le cas (c), l'identification proposée diffère et le score associé est en légère augmentation par rapport à celui calculé avec le spectre de fragmentation acquis en non ciblé. Malheureusement le mode ciblé ne permet pas dans ce cas-là d'obtenir un spectre de fragmentation plus informatif et d'améliorer l'identification. Le mode ciblé montre un intérêt dans le cas de spectres de fragmentations bruités comme par exemple (d) et (e). Le score d'identification est supérieur en mode ciblé mais cette faible augmentation et la différence entre les deux structures proposées ne permettent pas là non plus d'assurer avec certitude quelle structure est la bonne. Le mode ciblé devrait améliorer grandement l'identification des structures des molécules en améliorant en même temps les conditions de fragmentation. Une solution serait de réaliser des spectres MS² à différentes énergies de collision pour être le plus exhaustif possible. Les mécanismes seraient autres et pourraient donner accès à des spectres que l'on pourrait comparer car en effet avec notre appareillage (fragmentation par CID), les spectres de fragmentation sont dépendants des conditions dans lesquelles ils ont été acquis, tout comme ceux constituant la base de données. En multipliant les conditions opératoires et en moyennant les spectres obtenus, il sera plus aisé de s'approcher des conditions dans lesquelles les bases de données ont pu être construites.

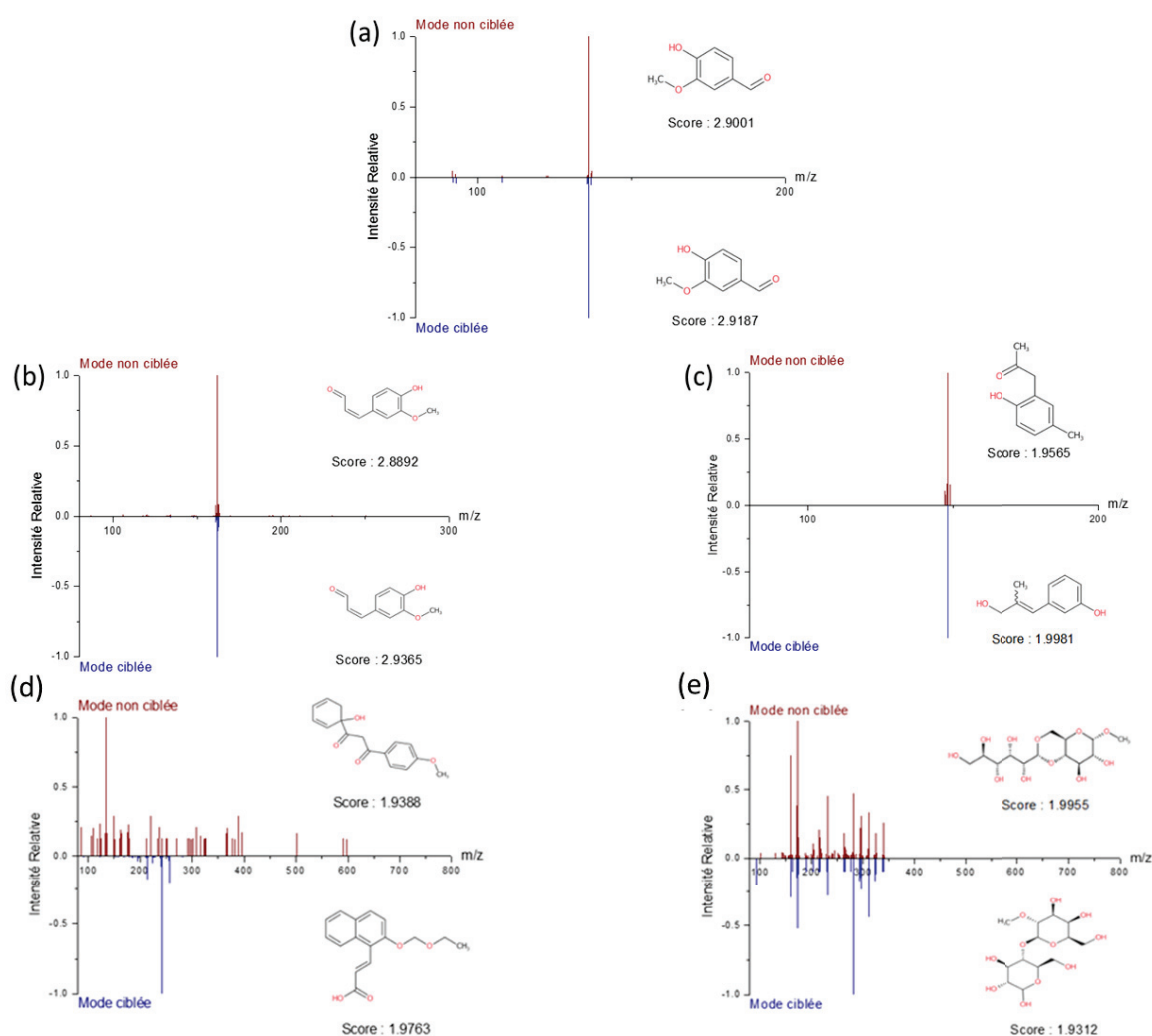


Figure IV-18 : Comparaison de spectres de fragmentation en mode ciblé (en bleu) et non ciblé (en rouge). (a) $t_r = 5.82$ min, (b) $t_r = 8.06$ min, (c) $t_r = 1.58$ min, (d) $t_r = 9.96$ min et (e) $t_r = 12.28$ min

3.4 Analyse quantitative d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse

La caractérisation peut comprendre également la quantification des composés identifiés. Nous avons vu que la présence de la vanilline et du coniféraldéhyde ne faisait pas de doute au sein de l'huile de pyrolyse rapide. Ces deux molécules ont donc été prises pour exemple de quantification dans cette matrice complexe.

La quantification a été réalisée selon la méthode d'étalonnage externe et selon la méthode des ajouts dosés, avec un détecteur PDA (PhotoDiode Array : barrette de diodes) couplé à la SFC, à 210 nm pour détecter le plus grand nombre de composés ainsi qu'à 254 nm et 280 nm afin de s'assurer que la quantification n'est pas dépendante de la longueur d'onde. Les droites d'étalonnage sont montrées sur les Figure IV-19 (vanilline) et Figure IV-20 (coniféraldéhyde) en gris (210 nm), orange (254 nm) et bleu (280 nm). Le Tableau IV-8 résume les résultats obtenus.

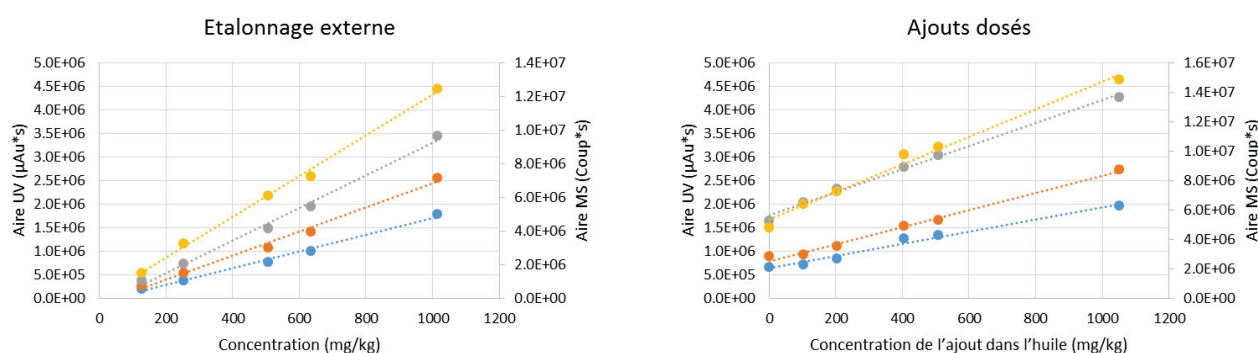


Figure IV-19 : Courbes d'étalonnage de la Vanilline en UV à 210 nm (en gris), à 254 nm (en orange), à 280 nm (en bleu) et en MS (APCI (-)) pour l'ion 151.04 (en jaune) par étalonnage externe (à gauche) et ajouts dosés (à droite)

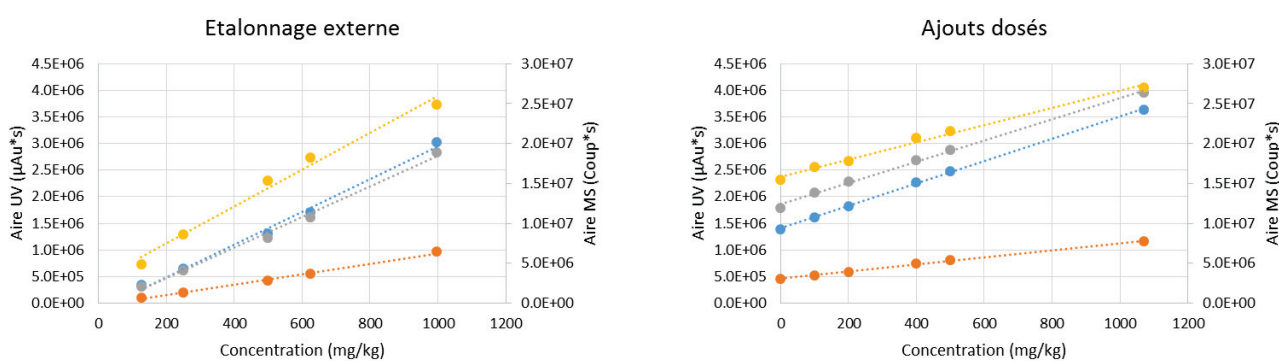


Figure IV-20 : Courbes d'étalonnage du Coniféraldéhyde en UV à 210 nm (en gris), à 254 nm (en orange), à 280 nm (en bleu) et en MS (APCI (-)) pour l'ion 177.06 (en jaune)

Dans les trois cas, les coefficients de détermination sont supérieurs à 0.99. Cependant, pour les deux molécules avec les deux méthodes, les valeurs de quantification à 210 nm sont plus élevées. Ce fait peut s'expliquer par le grand nombre de composés détectés au même temps de rétention à 210 nm, faussant ainsi la quantification. L'utilisation des deux autres longueurs d'onde peut aussi être sujette à ce problème car pas forcément spécifique à une seule molécule. Ainsi avec une matrice très complexe, il est très compliqué de trouver une longueur d'onde spécifique pour effectuer la quantification de

chaque composé sans influence d'autres molécules dans le signal enregistré. Par ailleurs, pour les composés sans chromophore (comme les sucres présents dans cette matrice) la quantification en UV reste totalement impossible.

Tableau IV-8: Teneurs par étalonnage externe et ajouts dosés pour le dosage par SFC-UV de la vanilline et du coniféraldéhyde contenus dans une huile de pyrolyse rapide de biomasse

<i>Méthode de quantification</i>		<i>Étalonnage externe (210 nm)</i>	<i>Étalonnage externe (254 nm)</i>	<i>Étalonnage externe (280 nm)</i>	<i>Ajout dosé (210 nm)</i>	<i>Ajout dosé (254 nm)</i>	<i>Ajout dosé (280 nm)</i>
Vanilline	Quantité (mg/kg)	522	395	418	782	446	504
	Coefficient de détermination	0.994	0.991	0.993	0.999	0.992	0.982
Coniféraldéhyde	Quantité (mg/kg)	662	512	493	985	691	667
	Coefficient de détermination	0.994	0.994	0.993	1.000	0.999	0.999

La détection MS présente l'avantage d'être beaucoup plus spécifique. La même méthodologie a donc été appliquée en considérant l'EIC (Extract Ion Chromatogram) pour chaque ion pseudo-moléculaire, permettant ainsi de ne quantifier que les composés de même masses, élués au même temps de rétention et de limiter le risque de non-spécificité.

Les masses des ions extraits sont 151.0427 (uma) et 177.0578 (uma) respectivement pour la vanilline et le coniféraldéhyde. Les Figure IV-19 et Figure IV-20 montrent également les droites d'étalonnage (en jaune) obtenues pour les deux molécules pour ces signaux MS.

Afin de vérifier la correspondance entre les deux méthodes de quantification en MS, les points issus des deux méthodes ont été mis en relation. Pour cela, la valeur de la concentration dans l'huile seule est estimée à partir de l'étalonnage externe. Cette valeur sert de point de départ afin de placer les points issus des ajouts dosés. Avec un coefficient de corrélation au-delà de 0.99, les deux techniques sont en un accord pour la mesure pour la vanilline (courbe rouge de la Figure IV-21). La valeur d'environ 400 ppm calculée par ces deux méthodes est aussi en accord avec les calculs réalisés à partir des extractions UV à 254 ou 280 nm. Comme l'huile a été diluée 5 fois pour préparer l'échantillon, la quantité de vanilline est donc de 2000 ppm soit 0.2 % m/m dans l'huile de départ. En comparaison avec les données trouvées dans la littérature (entre 0.12 et 0.19 % dans la thèse Marjorie Ruth Rove [12], 0.042 % pour Djokic et al. [8]) cette valeur semble cohérente et démontre la faisabilité d'une quantification par SFC/MS.

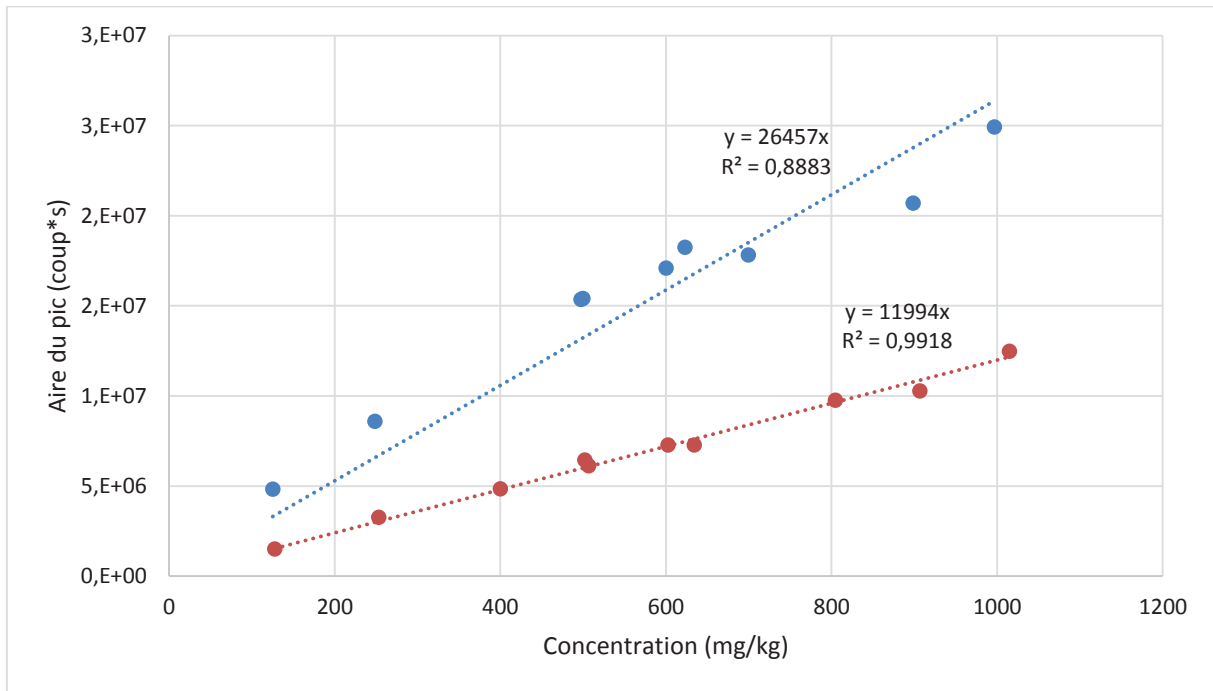


Figure IV-21 : Droite d'étalonnage de la vanilline(en rouge) et du coniféraldéhyde (en bleu) par étalonnage externe et ajout dosé.

Pour le coniféraldéhyde, les deux méthodes donne une valeur cohérente de concentration et semble en accord toute les deux avec un coefficient de corrélation de 0.88 (cf. courbe bleue de la Figure IV-21). La valeur plus faible du coefficient de corrélation peut s'expliquer par le fort coefficient de réponse de ce composé. En effet, l'intensité du signal mesuré est très forte (30 000 000 coups pour les concentrations les plus hautes) pour les derniers points mesurés, on peut supposer donc un effet de saturation du détecteur MS. Cela montre que la gamme pour les étalonnages doit être choisie avec précaution.

Conclusion

Afin d'obtenir un maximum d'informations sur une matrice complexe, il est important de coupler les avantages de la chromatographie à un détecteur hautement informatif. Dans cette optique, le couplage entre SFC et MS semble particulièrement approprié. Cependant, l'utilisation d'une phase mobile sous pression a demandé un développement approprié pour parvenir à détecter les molécules éluées de la colonne. Les sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, APCI et APPI principalement) étaient les seules possibilités. Les sources ESI et APCI ont été utilisées, l'APPI étant théoriquement moins adapté aux molécules suspectées dans les huiles de pyrolyse rapide.

Deux types de spectromètres ont été employés : un simple quadripôle et un IT-ToF/MS, tous deux fabriqués par le constructeur Shimadzu.

Les travaux sur le simple quadripôle ont permis d'appréhender le couplage entre SFC et MS en mettant en lumière l'importance du make-up, l'influence des différents paramètres d'ionisation (débit de gaz, température de source etc.) Une démarche a été mise en place afin de trouver le meilleur compromis pour l'ionisation de l'échantillon. La quantité de données obtenues a nécessité de mettre en place des représentations graphiques adaptées afin de comparer au mieux ces résultats. Ces premiers tests de couplage entre SFC et MS ont permis de développer une stratégie pour exploiter les données produites. Si quelques informations (gamme de masse détectée, coélutions possibles etc.) ont pu être déduites de ces analyses, malheureusement la résolution unitaire de cet analyseur a rapidement limitée le potentiel de cette approche. La connaissance acquise a pu être transposée au couplage avec le second spectromètre de masse.

L'IT-ToF/MS doté de deux analyseurs permet donc de réaliser des mesures de masses précises (20 ppm d'écart en masse) et également de la fragmentation (MS^2). En partant des conclusions issues des expériences du simple quadripôle, les paramètres du couplage avec la SFC ont pu être optimisés et adaptés à la géométrie de source de ce spectromètre. Les acquisitions réalisées dans les 4 modes d'ionisation (APCI-, APCI+, ESI-, ESI+) ont nécessité un logiciel qui a été mis au point à façon pour répondre à cette problématique. Ce logiciel permet d'attribuer une formule brute à chacun des ions détectés lors de l'analyse. Une fois cette liste de formules brutes établie, l'identification structurale de chaque molécule a été investiguée en employant une plateforme en libre accès sur Internet associant une approche *in silico* (fragmentation théorique) et une comparaison à une base de données (MoNA). Cette approche a pu être validée à l'aide de molécules modèles en mélange puis au sein d'une matrice complexe (huile de pyrolyse rapide). Une méthodologie adaptée pour la caractérisation des espèces séparées en amont par la SFC est disponible pour n'importe quel échantillon complexe.

Pour l'application à l'analyse de l'huile de pyrolyse rapide, cette approche a été réalisée en APCI négatif. L'utilisation de la plateforme MetFrag avec une approche *in silico* et comparaison avec la base de données MoNA n'a pas permis d'identifier de nouvelles structures moléculaires. Ceci est dû à la mauvaise qualité des spectres MS/MS obtenus ainsi qu'à une interprétation des scores MetFrag non adaptée. Plusieurs solutions alternatives peuvent être envisagées. La première concerne l'amélioration de la qualité des spectres MS/MS en ciblant les molécules majoritaires dans un premier temps suite à une analyse non ciblée. La création d'une base de données interne à l'aide de standard

ciblée sur le type de composés recherchés permettrait d'avoir plus de candidats pertinents en comparaison aux bases de données externes actuellement employées. Cette solution peut également résoudre un second problème lié aux spectres de fragmentation présents dans les bases de données. Ces spectres sont dépendants des conditions dans lesquelles ils ont été acquis. Une base de données créée à partir d'expériences sur le même appareil permettrait de s'affranchir de cet obstacle. L'autre solution pour surmonter cela, consiste à acquérir les spectres MS² à plusieurs conditions de fragmentations et de les regrouper afin d'obtenir le spectre le plus complet possible.

Enfin, la quantification par SFC-UV/MS a été comparée à la littérature pour deux composés. L'intérêt d'utiliser la MS réside dans le fait que contrairement à l'UV, le choix de l'ion à suivre va permettre d'être spécifique au composé et de s'affranchir des coélutions. De plus, les espèces non chromophores (sucres par exemple) sont aussi candidat à cette quantification. Les résultats trouvés concordent avec ceux trouvés dans la littérature.

Afin d'être transposé à d'autres échantillons complexes, la méthodologie de retraitement devra subir quelque ajustement comme des paramètres de fragmentations optimisés pour les molécules cibles ou un choix de base de données adaptée à l'application recherchée.

Références

- [1] A. Grand-Guillaume Perrenoud, C. Hamman, M. Goel, J.L. Veuthey, D. Guillarme, S. Fekete, Maximizing kinetic performance in supercritical fluid chromatography using state-of-the-art instruments, *Journal of Chromatography A* 1314 (2013) 288–297.
- [2] M. Stas, D. Kubic, J. Chudoba, M. Pospíš, Overview of Analytical Methods Used for Chemical Characterization of Pyrolysis Bio-oil, *Energy Fuels* (28) (2014) 385–402.
- [3] Y. Cho, M.-H. Choi, B. Kim, S. Kim, Supercritical fluid chromatography coupled with in-source atmospheric pressure ionization hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for compound speciation, *Journal of chromatography. A* 1444 (2016) 123–128.
- [4] D. Giuffrida, M. Zoccali, S.V. Giofrè, P. Dugo, L. Mondello, Apocarotenoids determination in *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero, by supercritical fluid chromatography-triple-quadrupole/mass spectrometry, *Food chemistry* 231 (2017) 316–323.
- [5] D. Wolrab, P. Frühauf, C. Gerner, Direct coupling of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids and related compounds: Comparing electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization, *Analytica Chimica Acta* 981 (2017) 106–115.
- [6] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.-F. Tranchant, E. Lesellier, Hyphenation of ultra high performance supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation high resolution mass spectrometry: Part 1. Study of the coupling parameters for the analysis of natural non-polar compounds, *Journal of chromatography. A* 1509 (2017) 132–140.
- [7] T. Kind, H. Tsugawa, T. Cajka, Y. Ma, Z. Lai, S.S. Mehta, G. Wohlgemuth, D.K. Barupal, M.R. Showalter, M. Arita, O. Fiehn, Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search, *Mass spectrometry reviews* (2017).
- [8] M.R. Djokic, T. Dijkmans, G. Yildiz, W. Prins, K.M. van Geem, Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography, *Journal of chromatography. A* 1257 (2012) 131–140.
- [9] N.S. Tessarolo, R.V.S. Silva, G. Vanini, A. Casilli, V.L. Ximenes, F.L. Mendes, A. Rezende Pinho, W. Romão, E.V.R. Castro, C.R. Kaiser, D.A. Azevedo, Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques: ^1H NMR, GC \times GC-TOFMS and FT-ICR MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 117 (2016) 257–267.
- [10] I. Miettinen, M. Mäkinen, T. Vilppo, J. Jänis, Characterization of Phase-Separated Pine Wood Slow Pyrolysis Oil by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass, *Energy Fuels* (2015).
- [11] E.L. Schymanski, C. Ruttkies, M. Krauss, C. Brouard, T. Kind, K. Dührkop, F. Allen, A. Vaniya, D. Verdegem, S. Böcker, J. Rousu, H. Shen, H. Tsugawa, T. Sajed, O. Fiehn, B. Ghesquière, S. Neumann, Critical Assessment of Small Molecule Identification 2016: Automated methods, *J Cheminform* 9 (1) (2017) 412.
- [12] Marjorie Ruth Rove, Analysis of sugars and phenolic compounds in bio-oil, Iowa university, 2013.

*Chapitre 5 : Positionnement de la
SFC/IT-ToF pour la caractérisation des
bio-huiles*

Sommaire du chapitre

Sommaire du chapitre	196
Liste des figures et tableaux	197
Introduction	198
Comparaison GCxGC/ToF vs SFC/IT-ToF	199
1 Analyse par GCxGC/ToF	199
2 Comparaison avec SFC/IT-ToF	202
Comparaison FT-ICR/MS vs SFC/IT-ToF	205
1 Analyses par FT-ICR/MS	205
2 Comparaison avec SFC/IT-ToF	208
Comparaison GCxGC/ToF vs SFC/IT-ToF vs FT-ICR/MS	215
Conclusions	217
Références	218
Annexe 1	219

Liste des figures et tableaux

Figure V-1 : Chromatogramme GCxGC de l'huile de pyrolyse rapide.....	199
Figure V-2 : Résumé de la comparaison de formules brutes entre GCxGC/MS et SFC/MS	204
Figure V-3 : Distribution de nombre de formules brutes identifiées en FT-ICR/MS en fonction du nombre d'hétéro élément en APCI (+/-) (a) et en ESI (+/-) (b).....	205
Figure V-4 : Diagrammes van Krevelen issus de l'analyse de l'huile de pyrolyse rapide dans les quatre modes d'ionisation en FT-ICR/MS	207
Figure V-5 : Diagramme Van Krevelen de l'huile de pyrolyse rapide dans les quatre modes d'ionisation en SFC/MS.....	210
Figure V-6 : Distribution de nombre de formules brutes identifiées en SFC/IT-ToF en fonction du nombre d'hétéro élément en APCI (+/-) (a) et en ESI (+/-) (b).....	211
Figure V-7 : Distribution en nombres de formules brutes identifiées en SFC/APCI (-)-IT-ToF en fonction du nombre d'hétéro élément et du temps de rétention	212
Figure V-8 : Diagrammes van Krevelen des formules brutes identifiées communes (à gauche) et des points singuliers (à droite) identifiées en SFC/MS, GCxGC/MS et FT-ICR/MS	216
Tableau V-1 : Nombre de composés identifiés structurellement par GCxGC/ToF en fonction du nombre de fonction oxygénée par molécule	201
Tableau V-2: Comparaison des résultats obtenus par GCxGC/ToF et SFC/IT-ToF sur l'huile de pyrolyse rapide de biomasse	203
Tableau V-3 : Comparaison FT-ICR/MS et SFC/MS pour l'analyse de l'huile de pyrolyse rapide	209
Tableau V-4 : Liste des isomères observés en SFC/APCI (-)-MS avec les différents temps de rétention observés	213
Tableau V-5 : Comparaison entre FT-ICR/MS et SFC/MS	214

Introduction

Comme l'état de l'art a pu le montrer, les huiles de pyrolyse rapide sont constituées de nombreuses molécules oxygénées dont il faut déterminer la nature afin de parvenir à valoriser ce type de produit. Or ces mélanges oxygénés organiques sont très complexes car ils contiennent différents types de fonctions chimiques (carbonyls, alcools, acides carboxyliques, esters, furanes, phénols, sucres et leurs dérivés) avec potentiellement plusieurs fonctions réunies au sein d'une même molécule. La caractérisation de ces huiles a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature. Si un large panel de techniques analytiques a été testé pour tenter de caractériser ces matrices, deux approches ont concentré l'essentiel des informations acquises jusqu'ici sur ces bio-huiles : la chromatographie gazeuse (GC/MS ou GCxGC/MS) et la spectrométrie de masse très haute résolution avec la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR/MS).

La majorité des connaissances que l'on a sur les huiles de pyrolyse rapide provient de l'utilisation de la GC mono ou bidimensionnelle [1–3]. Bien qu'environ 40 % [4] de la matrice puissent être caractérisés au niveau moléculaire via cette approche, notre connaissance demeure limitée du fait d'une grande gamme de volatilité, polarité et/ou « polyfonctionnalité » des composés à analyser et de leur nombre élevé. Pour aller plus loin et s'affranchir de ces limitations, la technique de spectrométrie de masse haute résolution FT-ICR/MS offre la possibilité de détecter un large nombre de composés avec une très grande sensibilité (plus de 1000 composés détectés avec une précision en masse proche du ppm). Depuis quelques années, plusieurs équipes ont utilisé cette technique pour caractériser les huiles de pyrolyse rapide en utilisant différentes sources d'ionisation, majoritairement ESI et plus rarement en APPI [5–14]. Bien que cette technique permette l'identification en termes de formule brute d'un très grand nombre de composés, aucune information structurale n'est accessible à moins de réaliser des analyses MSⁿ qui ne peuvent pas distinguer les isomères sans séparation en amont.

Ces deux techniques sont donc actuellement utilisées par les équipes travaillant sur les huiles de pyrolyse rapide. Elles sont également celles qui sont les plus abouties en termes de développement analytique à la fois d'un point de vue instrumentation mais également traitement de données. C'est pourquoi, il a été fait le choix de comparer la FT-ICR/MS, la GCxGC/ToF et la SFC/IT-ToF afin de montrer ce que le couplage développé peut apporter dans le cadre de la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide. Pour ce faire, une huile de pyrolyse rapide de biomasse a été analysée par SFC-UV/IT-ToF en utilisant les sources d'ionisation ESI (+/-) et APCI (+/-) pour couvrir une gamme la plus large possible en terme de masse moléculaire et de polarité. Il est à noter que l'APPI n'a pas été envisagée dans cette étude car l'huile de pyrolyse analysée comporte seulement quelques traces de composés de type hydrocarbure aromatique. Cette même huile a également été caractérisée par GCxGC/ToF avec une source à ionisation électronique (EI).

Comparaison GCxGC/ToF vs SFC/IT-ToF

1 Analyse par GCxGC/ToF

Au travers de la littérature, nous avons pu voir qu'une grande partie des connaissances sur les huiles de pyrolyse rapide ont été acquises jusqu'ici à l'aide de la GC/MS ou de la GCxGC/MS. En effet, environ 40 % de la matrice a pu ainsi être identifiée grâce à cette approche en employant diverses configurations (normale ou inverse). Dans le cadre de notre étude, nous avons fait le choix de travailler à l'aide d'un montage dit « normal ». Cette configuration utilise une colonne de type apolaire en première dimension et une colonne à caractère polaire en seconde dimension. Ainsi sur le chromatogramme obtenu, les différentes espèces seront séparées selon leur température d'ébullition principalement sur la première dimension alors qu'en seconde dimension, la séparation sera réalisée selon la polarité des composés. Ces deux mécanismes de rétention sont orthogonaux et permettent une occupation de l'espace chromatographique maximale. De part ces deux dimensions, on a alors une organisation du chromatogramme en famille chimique comme l'illustre la Figure V-1. Cette structuration du chromatogramme est moins claire que pour les produits pétroliers du fait de la polyfonctionnalité des molécules. Une attribution moléculaire pic par pic est nécessaire à l'aide d'un spectromètre de masse de type ToF.

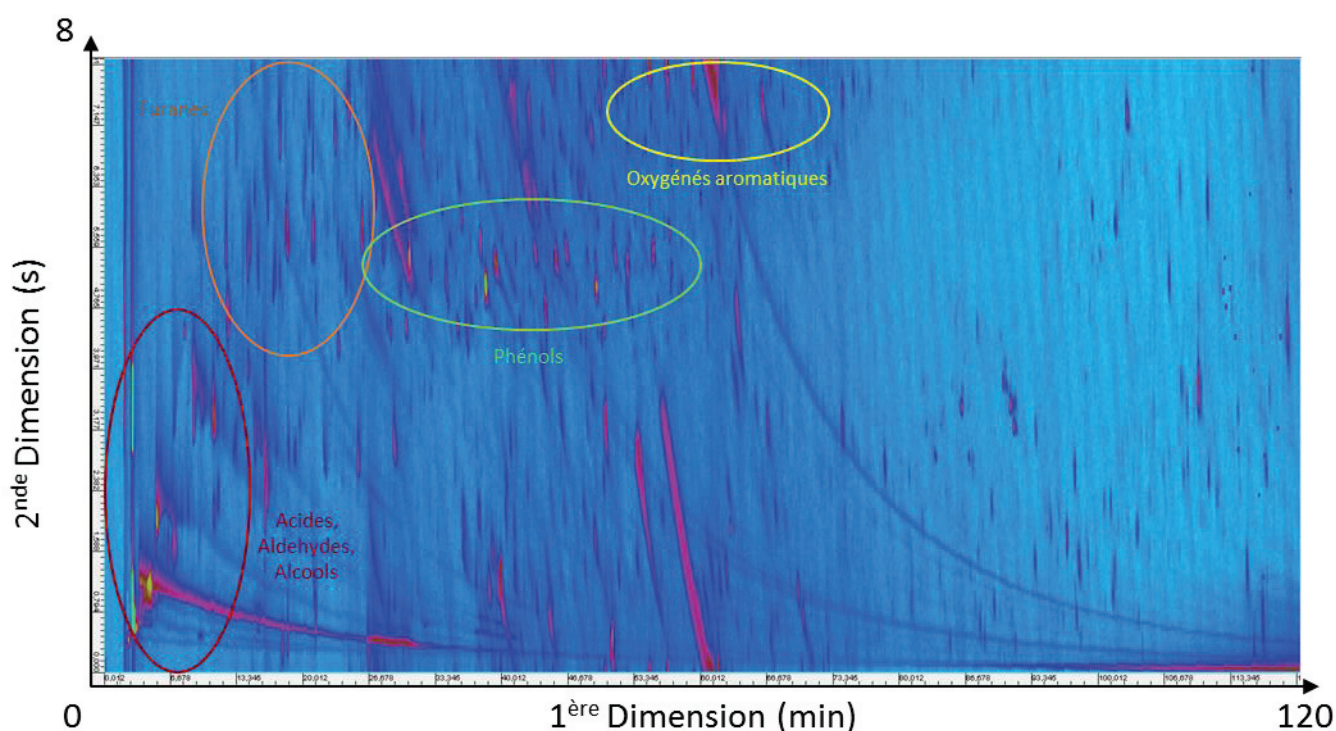


Figure V-1 : Chromatogramme GCxGC de l'huile de pyrolyse rapide.

A partir de ce chromatogramme 2D, pour chaque pic, le spectre de masse enregistré est comparé aux bases de données NIST afin de parvenir à une identification structurale. Ainsi 175 structures chimiques ont pu être identifiées. Le chromatogramme comporte bien plus de pics mais une

correspondance n'a pu être trouvée pour tous soit à cause des conditions opératoires soit par le fait que la base NIST n'est pas exhaustive. Pour les structures identifiées, elles contiennent entre 1 et 6 atomes d'oxygène avec une majorité de composés contenant 1, 2 ou 3 atomes d'oxygène (respectivement 32, 81 et 34 structures sur les 175 listées). Du point de vue du nombre de carbone, une évolution entre 1 et 21 atomes de carbone est observée et les masses moléculaires des composés varient entre 30 et 344 uma. Cependant, une minorité de structures identifiées dépasse les 200 uma (20 structures sur 175). La GCxGC/ToF est adapté à l'élution des composés avec une grande volatilité et une stabilité thermique. La volatilité des molécules organiques est dépendante de leur masse moléculaire et de leur polarité ainsi des alcanes de masse moléculaire supérieure à 500 uma peuvent être élués en GC par contre certains alcools ou polyols de masse moléculaire plus faible sont difficilement vaporisables sans dérivation chimique.

Dans le cas de notre analyse en GCxGC/ToF, les espèces comportant une seule fonction chimique oxygénée ne représentent qualitativement que 32 % des 175 espèces identifiées et comportent le plus souvent un acide carboxylique ou une cétone (Cf. Tableau V-1). Les résultats obtenus montrent que la proportion d'espèces polyfonctionnelles est très importante en nombre : 39 % des structures possèdent deux fonctions oxygénées (identiques ou différentes) tandis que 29 % des structures ont trois fonctions oxygénées ou plus. Les espèces avec deux groupements chimiques contiennent généralement un alcool non aromatique ou un phénol. Cette observation est également valable pour les molécules comportant trois fonctions oxygénées ou plus pour lesquelles les alcools non aromatiques et les phénols sont largement plus nombreuses parmi les espèces identifiées. L'analyse de ce type de composés revêt donc une importance particulière dans la problématique d'analyse des huiles de pyrolyse rapide de biomasse.

Toutefois, s'il est vrai que les groupements hydroxy constituent une large part des substituants oxygénés identifiés par GCxGC/MS dans l'huile (40 et 50 structures contiennent respectivement au moins un alcool non aromatique ou un phénol), il n'en demeure pas moins que d'autres groupements oxygénés de nature très diversifiée sont également présents : cétone (41 structures), éther (28 structures), furane (23 structures), aldéhyde (22 structures), acide carboxylique (20 structures), pyrane (10 structures) et ester (8 structures). Les groupements éthers, furanes, aldéhydes et acides carboxyliques sont souvent détectés tandis que les pyranes et esters sont moins fréquemment rencontrés. Grâce à la grande capacité de séparation de la chromatographie GCxGC et à l'information moléculaire extraite des spectres obtenus en ionisation électronique, cette analyse GCxGC/ToF montre d'une part la large diversité des fonctions chimiques présentes dans une huile de pyrolyse rapide, et d'autre part la forte probabilité de rencontrer des espèces polyfonctionnelles pouvant comporter jusqu'à 2 ou 3 fonctions chimiques et encore davantage. Malgré ses atouts en matière de séparation et d'identification, l'approche GCxGC/ToF ne permet qu'une connaissance partielle de la composition moléculaire de ces mélanges complexes. La présence d'espèces de hautes masses moléculaires et/ou composée d'un grand nombre d'atomes d'oxygène, bien que suspectées d'après la littérature, n'est pas prouvée via cette analyse.

Tableau V-1 : Nombre de composés identifiés structurellement par GCxGC/ToF en fonction du nombre de fonction oxygénée par molécule

1 fonction oxygénée		56		
Acide carboxylique		14		
Alcool non aromatique		5		
Aldehyde		6		
Cetone		12		
Ester		6		
Ether		3		
Furane		1		
Pyrane		1		
Phenol		8		
2 fonctions oxygénées		68		
Alcool non aromatique	Acide carboxylique	1		
Alcool non aromatique	Alcool non aromatique	1		
Alcool non aromatique	Aldehyde	4		
Alcool non aromatique	Cetone	7		
Alcool non aromatique	Ether	2		
Aldehyde	Aldehyde	1		
Aldehyde	Cetone	1		
Cetone	Cetone	3		
Ether	Acide carboxylique	2		
Ether	Ester	1		
Ether	Ether	6		
Furane	Alcool non aromatique	1		
Furane	Aldehyde	3		
Furane	Cetone	6		
Pyrane	Alcool non aromatique	2		
Benzenediol		12		
Methoxyphenol		15		
3 et + fonctions oxygénées		50		
Alcool non aromatique	Acide carboxylique	Ether	1	
Alcool non aromatique	Aldehyde	Alcool non aromatique	1	
Alcool non aromatique	Aldehyde	Aldehyde	1	
Alcool non aromatique	Cetone	Ether	1	
Alcool non aromatique	Ether	Ether	Alcool non aromatique	2
Alcool non aromatique	Ether	Ether	Ether	1
Polyols				10
Cetone	Acide carboxylique	Acide carboxylique		2
Cetone	Aldehyde	Cetone		1
Cetone	Ether	Ether		1
Furane	Alcool non aromatique	Aldehyde		1
Furane	Alcool non aromatique	Cetone		3
Furane	Aldehyde	Ester		1
Furane	Cetone	Cetone		2
Furane	Ether	Ether		1
Furane	Alcool non aromatique	Cetone	Ether	1
Pyrane	Alcool non aromatique	Cetone		4
Pyrane	Alcool non aromatique	Alcool non aromatique		1
Pyrane	Alcool non aromatique	Alcool non aromatique	Cetone	1
Phenol	Ether	Ether	Ether	1
Benzenediol	Aldehyde			1
Benzenediol	Ether			1
Benzenediol	Cetone	Alcool non aromatique		1
Benzenediol	Pyrane	Alcool non aromatique	Phenol	1
Methoxyphenol	Aldehyde			1
Methoxyphenol	Cetone			2
Methoxyphenol	Methoxyphenol			3
Methoxyphenol	Methoxyphenol	furane	Cetone	4

2 Comparaison avec SFC/IT-ToF

Afin de mettre en lumière la complémentarité des deux techniques, il est nécessaire de comparer les résultats obtenus dans les deux cas. Cependant, la comparaison entre SFC/MS (IT-ToF/MS dans notre cas) et GCxGC/MS (ToF/MS, ici) est compliquée à mettre en place. En effet, les deux techniques possèdent des processus d'identification très différents. Celui de SFC/MS a été largement décrit dans le chapitre 4 et peut se résumer à une première étape d'identification de formules brutes et une seconde d'identification structurale à l'aide de spectres de fragmentations. Pour la GCxGC/MS dans notre cas à IFPEN, l'identification se déroule en une seule étape. Le spectre de masse enregistré pour chaque pic défini sur le chromatogramme est comparé avec la base de données NIST. Le résultat le plus plausible est alors proposé à l'utilisateur. Ce processus a largement été étudié et est considéré aujourd'hui comme abouti à l'inverse de celui de SFC/MS.

Dans ce cadre, la comparaison entre GCxGC/MS et SFC/MS peut être réalisée à plusieurs échelles. Premièrement, en considérant le nombre de composés potentiellement identifiables par la technique. Dans le cas de la GCxGC/ToF, il est directement relié au nombre de pics observés sur le chromatogramme (cf. Figure V-1). Sur cette expérience, l'estimation est entre 700 et 900 pics potentiellement identifiables. Cette estimation est bien sûr dépendante des conditions opératoires et des conditions de retraitement (seuil, largeur de pics, etc.). Pour la SFC/IT-ToF, le nombre de composés potentiellement identifiables correspond à celui des formules brutes détectées dans les différents modes d'ionisation. Pour nos expériences, ce nombre est de 3027 formules brutes identifiées différentes (pour les quatre modes d'ionisation). A noter que ce nombre peut peut-être subir d'une surestimation si des adduits ou des dimères ont été identifiés comme des composés coélus. Malgré cela, ce chiffre est donc bien supérieur en SFC/IT-ToF qu'en GCxGC/ToF. Il montre que potentiellement la SFC/IT-ToF permet de détecter plus de composés. En se basant sur l'état de l'art, ces composés correspondraient aux composés lourds (> 200 g/mol) et polaires non élués par la GCxGC.

La seconde comparaison prend en compte le résultat final de l'identification, à savoir l'identification structurale. Sur les 700 – 900 composés potentiellement identifiables en GCxGC/ToF, 175 ont été structurellement identifiés. Cela montre que la base de données NIST n'est pas exhaustive et peut donner de fausses identifications si le composé cible n'est pas référencé ou bien si une coélution intervient sous le pic détecté. Bien qu'abouti, ce processus d'identification n'est donc pas suffisant dans le cadre des huiles de pyrolyse rapide. En comparaison, au cours du chapitre 4, seulement quelques identifications ont pu être proposées dans un mode d'ionisation (APCI négatif), prouvant la faisabilité du processus d'identification. Les difficultés rencontrées pour trouver une base de données adaptée, associées à la complexité des spectres de fragmentation de type CID constituent donc des verrous scientifiques réduisant à l'heure actuelle les résultats obtenus. Du point de vue de l'identification structurale, la GCxGC/ToF est donc bien plus performante et aboutie que la SFC/IT-ToF.

Ces deux techniques possèdent donc chacune leurs avantages et leurs inconvénients comme résumés dans le Tableau V-2.

Tableau V-2: Comparaison des résultats obtenus par GCxGC/ToF et SFC/IT-ToF sur l'huile de pyrolyse rapide de biomasse

<i>Techniques analytiques</i>	<i>Nombre de composés potentiellement identifiables</i>	<i>Nombre de composés identifiés structurellement</i>	<i>Nombre de formules brutes propres à chaque technique</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
GCxGC/ToF	700 - 900	175	33	<ul style="list-style-type: none"> • Comparaison avec base NIST, Identification non dépendante des conditions opératoires • Adapté aux molécules volatiles (petites masses mono ou bi fonctionnelles) 	<ul style="list-style-type: none"> • Limite de masse autour de 200 uma pour ce type de composés (oxygénés polyfonctionnel)
SFC/IT-ToF	3027	Moins de 10	3005	<ul style="list-style-type: none"> • Adapté à une large gamme de masse (entre 80 et 800 uma) 	<ul style="list-style-type: none"> • Identification possible mais à améliorer

Bien que difficilement comparable, la question peut se poser du recoupement des deux techniques analytiques. Pour cela, seule une comparaison au niveau des formules brutes identifiées communes est possible. Parmi les 175 composés identifiés en GCxGC/ToF, les isomères ont été regroupés sous leur seule formule brute. 55 formules brutes différentes en GCxGC/ToF sont comparées au 3027 détectées en SFC/IT-ToF (Figure V-2). Sur ces 55 formules brutes identifiées en GCxGC/ToF, 22 sont communes avec l'identification en SFC/IT-ToF et donc 33 formules brutes seulement détectées en GCxGC/ToF. Dans ces 33 formules brutes non détectées en SFC/IT-ToF, 19 possèdent une masse inférieure à 80 uma et sont donc hors de la gamme d'étude de la SFC/IT-ToF. Enfin sur les 14 autres formules brutes propres à la GCxGC/ToF, on trouve 4 acides linéaires, 2 composés furaniques, 2 cétones cycliques et 6 phénols alkyles (methyl, dimethyl, ethylmethyl etc..). De par l'étude des molécules modèles faite dans le chapitre 3, ces composés peuvent être élués de la colonne dans nos conditions SFC. Cependant, leur non détection en SFC/IT-ToF peut être expliqué par le faible coefficient de réponse de ce type de composé. En effet, lors de l'étude sur molécules modèles, ces types de composés mono fonctionnels n'ont pas montré de forte réponse.

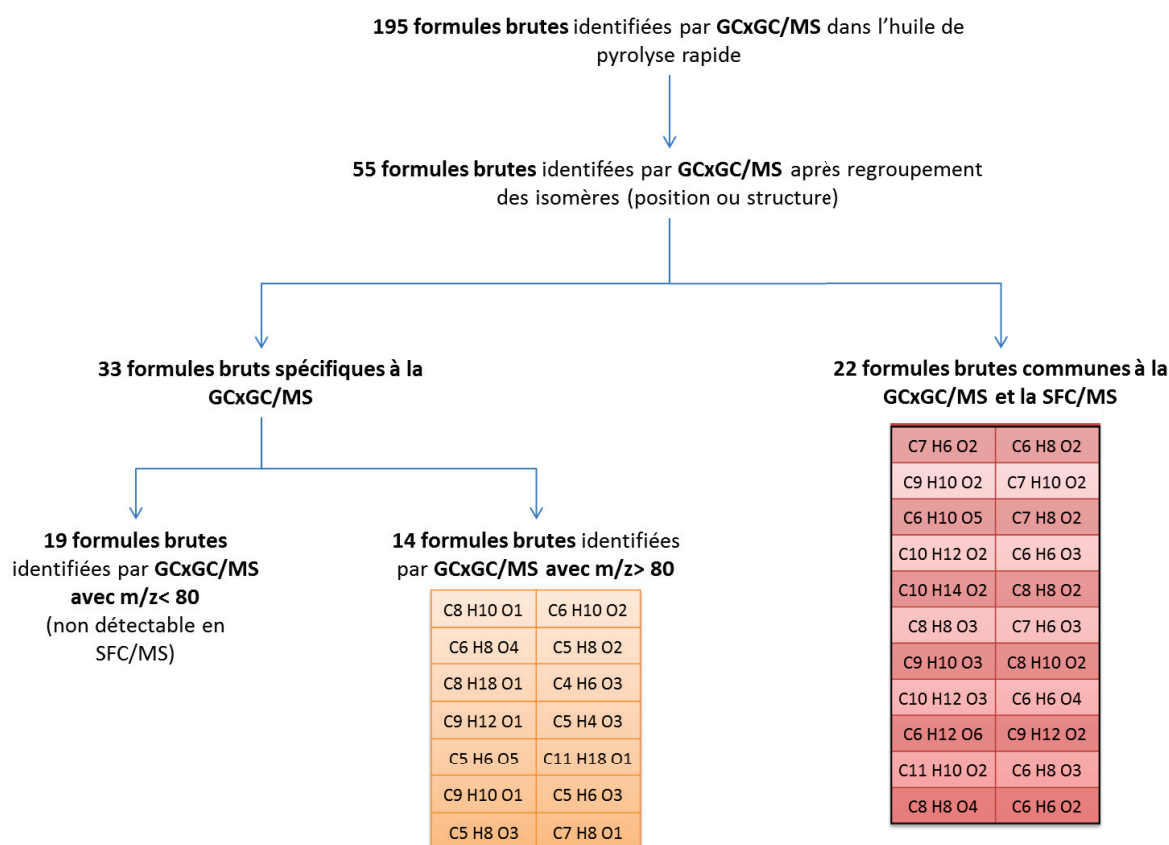


Figure V-2 : Résumé de la comparaison de formules brutes entre GCxGC/MS et SFC/MS

Concernant les formules brutes en commun entre les deux techniques, une comparaison d'identification structurale a été testée sur 3 composés identifiés par GCxGC/ToF et particulièrement intenses en SFC/APCI (-)–MS. Il s'agit de la vanilline, de l'acétovanillone et du 1,6-anhydro-beta-D-talopyranose. En employant la méthodologie développée dans le chapitre 4, la structure de la vanilline a été proposée par la plateforme MetFrag avec une forte probabilité (score de 2.90) à partir des données MS² obtenues par analyse SFC/IT-ToF de l'huile. Cependant pour les autres composés, acétovanillone et 1,6-anhydro-beta-D-talopyranose, l'identification à l'aide des spectres de fragmentation ne donne pas le même résultat entre SFC et GC. Dans ce cadre-là, la qualité insuffisante des spectres de MS² peut expliquer cette différence d'identification pour les structures. Si les mêmes formules brutes peuvent être détectées entre les deux techniques, la qualité des spectres en MS² indique que la SFC/MS nécessite encore des améliorations comme discutées dans le chapitre 4.

En conclusion, le couplage GCxGC/ToF permet une caractérisation mieux maîtrisée pour des molécules de faible masse moléculaire (en dessous de 80 uma). L'approche SFC/IT-ToF apparaît comme potentiellement complémentaire car elle permet d'augmenter les informations sur des composés très retenus en chromatographie gazeuse, c'est-à-dire des molécules potentiellement polyfonctionnelles de masse moléculaire supérieure à environ 200 uma.

Comparaison FT-ICR/MS vs SFC/IT-ToF

1 Analyses par FT-ICR/MS

L'huile de pyrolyse rapide a été analysée par FT-ICR/MS, en utilisant les sources ESI et APCI en mode d'ionisation positif ou négatif. De manière générale, la source d'ionisation ESI est davantage adaptée aux gammes de polarités et de masses moléculaires plus élevées que celles typiquement analysées par APCI. De plus, le mode d'ionisation positif favorise la détection d'espèces basiques tandis que le mode d'ionisation négatif est utilisé pour les molécules acides ou neutres. En employant ces quatre modes d'ionisation, une large gamme de possibilités en termes de molécules ionisables est couverte. Les différents paramètres d'ionisation et de détection sont décrits dans le chapitre 2. Ces paramètres ont été améliorés rapidement afin d'obtenir une exploitation des résultats. Aucune optimisation poussée n'a été menée sur ces expériences. Le but recherché ici est d'avoir des informations sur notre échantillon via FT-ICR/MS. Il faut également garder en mémoire que chaque molécule détectée va avoir un coefficient de réponse différents et l'intensité d'un pic à un autre n'est pas forcément représentatif de l'abondance de ce dernier dans la matrice. De plus des effets de matrices peuvent exalter ou au contraire défavoriser l'ionisation de certains composés en mélange.

Une fois les données acquises dans les différents modes d'ionisation, le logiciel Kendrick Inside, développé par IFPEN et décrit dans le chapitre 2, va permettre de déterminer les formules brutes de toutes les espèces ionisées et détectées dans chacun des modes. Des listes contenant de nombreuses formules brutes (3949 en APCI négatif, 2070 en APCI positif, 3813 en ESI négatif et 3223 en ESI positif) sont alors obtenues. Pour parvenir à bien visualiser ces grandes quantités de données, il existe plusieurs façons de représenter les informations.

La Figure V-3 présente la distribution en nombre des formules brutes identifiées par APCI (+/-) (a) et ESI (+/-) (b) en fonction du nombre d'hétéro-éléments dans l'huile (pour une abondance relative > 0.1 %).

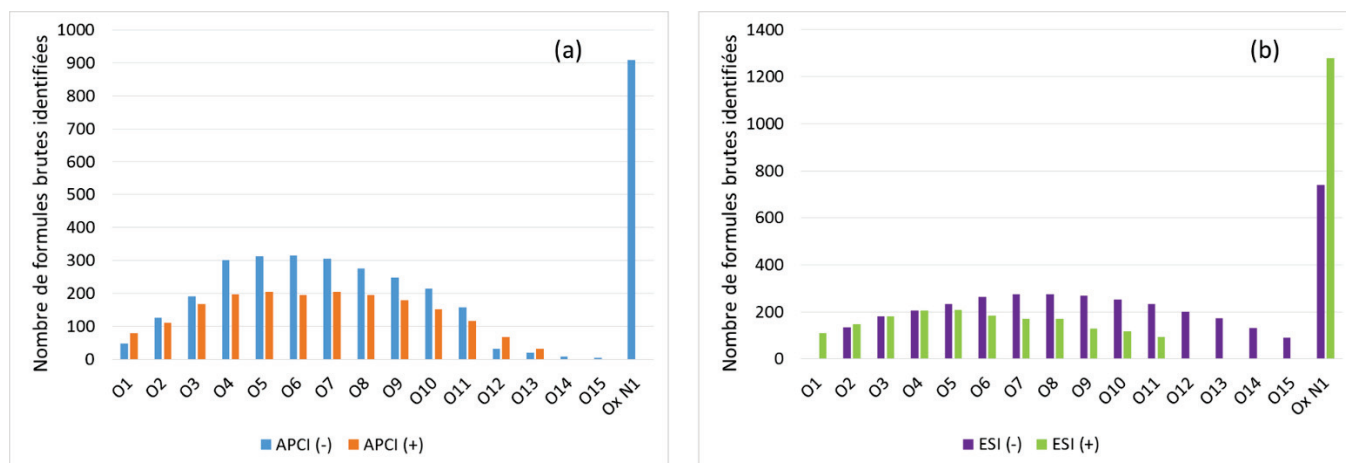


Figure V-3 : Distribution de nombre de formules brutes identifiées en FT-ICR/MS en fonction du nombre d'hétéro élément en APCI (+/-) (a) et en ESI (+/-) (b)

Usuellement dans la littérature, ces diagrammes sont tracés en abondance relative. Dans notre cas, le choix a été fait de les représenter en nombre de formules brutes identifiées. La même tendance est observée malgré la différence des coefficients de réponse des différents composés de la matrice. A l'aide de ces distributions, il est possible de déterminer la gamme prépondérante au sein de la matrice. Le profil observé en APCI (-) s'étend ainsi de O_1 à O_{13} , avec un maximum un nombre de formules brutes (> 300) de O_4 à O_8 , centré autour de O_5 , O_6 et O_7 . Les formules brutes contenant un atome d'azote sont regroupés dans la famille O_xN_1 et ne sont pas détectées en APIC (+). Le profil de distribution en APCI (+) est proche de celui observé en APCI (-) avec toutefois deux différences notables :

- i) Le nombre d'espèces oxygénées détectées est moins important en APCI (+) qu'en APCI (-).
- ii) De manière étonnante, les espèces azotées sont détectées uniquement en APCI (-).

Ces différences peuvent trouver une explication dans le fait que les deux modes vont ioniser des molécules différentes et l'APCI (+) est moins adapté pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide. De plus même si on s'attend à détecter les composés azotés plus facilement en mode positif [15], la faible réponse enregistrée dans ce mode (deux fois moins de composés identifiés que dans les autres modes) peut expliquer le manque d'information sur ce type de composés. Nos conditions n'étaient peut-être pas optimales pour l'ionisation de ces composés azotés en APCI (+).

Sur la Figure V-3b, les formules brutes identifiées par ESI (-) possèdent entre 2 et 15 atomes d'oxygène; la distribution est centrée sur des molécules en $O_5 - O_8$. Contrairement aux analyses APCI, le profil en ESI (+) est clairement différent par rapport à celui observé en ESI (-), avec un décalage vers des nombres plus faibles d'atomes d'oxygène ($O_1 - O_{10}$), centrés en $O_3 - O_5$. Concernant les molécules azotées, on observe logiquement plus de composés N_1O_x en ESI (+) qu'en ESI (-).

En comparant les analyses APCI et ESI, il apparaît que le profil APCI (-) est relativement similaire à celui observé en ESI (-) dans la mesure où le nombre de formules brutes identifiées sont comprises entre O_1 et $O_{15} - O_{16}$ avec un maximum en $O_4 - O_8$ pour l'APCI (-) et en $O_5 - O_8$ pour l'ESI (-). Les profils APCI (+) et ESI (+) sont proches en termes d'intervalle de distribution (O_1 à $O_{12} - O_{15}$) avec des différences au niveau du total de formules brutes ($O_3 - O_7$ pour APCI (+) et $O_3 - O_5$ pour ESI (+)).

En conclusion, dans nos conditions d'analyse et pour l'huile étudiée, on observe de manière générale une distribution comprise entre O_1 et O_{15} , centrée entre O_3 et O_8 , avec toutefois des différences significatives selon le type d'ionisation utilisé. La réponse des espèces azotées est exacerbée en APCI (-) et en ESI (+). Les modes APCI (+) et ESI (+) ont tendance à ioniser davantage les molécules faiblement oxygénées (moins de 6 atomes d'oxygène) tandis que les modes APCI (-) et ESI (-) sont plus dédiés à l'analyse de composés ayant plus de 6 atomes d'oxygène. Ces comparaisons sont effectuées sur les formules brutes ainsi il est possible que des mêmes formules brutes détectées en APCI et ESI ainsi que dans les différentes polarités soit totalement différentes chimiquement.

Bien que la distribution du nombre de formules brutes identifiées par FT-ICR/MS dépendent fortement des conditions d'ionisation mais également d'autres facteurs (biomasse pyrolysée, technologie et conditions de pyrolyse, collecte des vapeurs de pyrolyse, conditions d'analyse FT-ICR/MS), nos résultats apparaissent globalement cohérents avec les travaux de la littérature.

L'essentiel des études publiées utilise une ionisation par ESI (-) ; les espèces identifiées contiennent de 1 à 2 jusqu'à 7 ou 17 atomes d'oxygène, les distributions étant centrées de O₂ à O₇ [6,8,10,12–14].

Les données issues des analyses FT-ICR/MS peuvent également être représentées sous une autre forme. Au travers de la littérature plusieurs équipes ont employé des diagrammes illustrant l'évolution du ratio H/C en fonction du ratio O/C (diagramme de van Krevelen) pour chaque formule brute identifiée. Ainsi, ces diagrammes, qui sont très employés dans l'analyse de la matière organique sédimentée, permettent d'avoir accès à une représentation globale sur laquelle on peut faire apparaître des grandes familles d'intérêt, et d'apporter un peu d'information sur le type de molécules présentes. De manière très schématique, pour des ratios H/C supérieurs à 1.5, des zones seraient dédiées aux lipides, protéines, sucres aminés et sucres pour des ratios O/C croissants ; pour des ratios H/C inférieurs à 1.5, des zones peuvent être attribuées à des hydrocarbures condensés, des dérivés de lignines et/ou des molécules alicycliques riches en groupements carboxyles et tannins selon Minor et al. [16]. Dans le cas des analyses FT-ICR/MS réalisées sur notre huile, la Figure V-4 illustre les diagrammes de Van Krevelen obtenus pour chacun des modes d'ionisation.

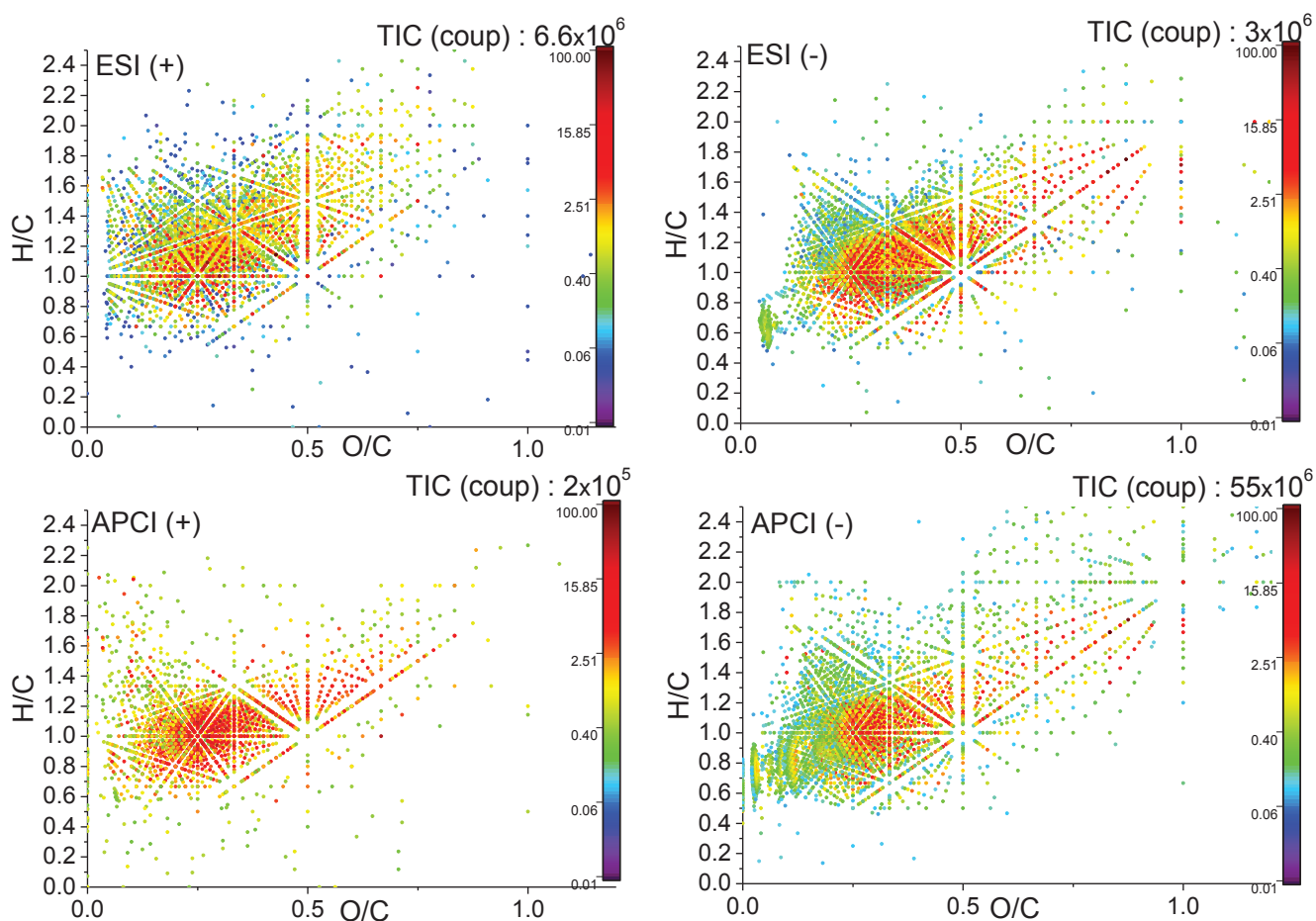


Figure V-4 : Diagrammes van Krevelen issus de l'analyse de l'huile de pyrolyse rapide dans les quatre modes d'ionisation en FT-ICR/MS

Cette figure indique que les deux modes d'ionisation APCI (-) et APCI (+) ont en commun une zone (ratios O/C compris entre 0.1 et 0.5 et ratio H/C compris entre 0.5 et 2) pour laquelle les formules brutes identifiées sont nombreuses. La somme des intensités de chaque mode indique que le mode

APCI (+) ne comporte pas d'information intense en comparaison à l'APCI (-). Les molécules oxygénées suspectées dans ce type de matrice répondront plus facilement en mode négatif. La source APCI (-) a la particularité de caractériser les molécules avec un ratio O/C supérieur à 0.8 (comme les tanins [15]). De manière surprenante, un nombre important de formules brutes sont identifiées en APCI (-) dans la zone des « sucres » alors que aucune réponse n'est observée en APCI (+) dans cette partie du diagramme. Des remarques similaires peuvent être adressées pour les analyses ESI : le plus grand nombre de molécules détectées en ESI (-) et en ESI (+) ont des ratios O/C compris entre 0.2 et 0.8 et des ratios H/C compris entre 0.5 et 2. Enfin, en APCI et en ESI, les formules brutes les plus nombreuses et les plus intenses se regroupent dans une zone centrale (ratios O/C 0.1 - 0.7 et ratio H/C 0.5 - 2) correspondant à des molécules phénoliques issues de la transformation de lignine comme les méthoxyphénols. Si les diagrammes de van Krevelen présentés dans la Figure V-4 permettent de bien mettre en évidence la complémentarité des modes négatif et positif par rapport aux zones de différents ratios O/C et H/C, il semble plus difficile de montrer une différence nette entre les résultats APCI (-) versus ESI (-) d'une part, et APCI (+) versus ESI (+) d'autre part.

Enfin, avec la connaissance issue de la littérature sur les huiles de pyrolyse et l'analyse élémentaire de l'échantillon, il est admis que les composés oxygénés représentent la majeure partie de la matrice. Afin d'apporter plus de détails sur ces différentes familles, une autre représentation est usuellement employée dans la littérature. Ces diagrammes représentent le nombre d'insaturations (DBE : Double Bond Equivalent) en fonction du nombre d'atomes de carbone au sein de la molécule. Afin de ne pas surcharger de figures, on trouvera en annexe la totalité de ces représentations pour chacune des familles O_x dans chaque mode d'ionisation. Une large gamme de nombre d'atomes de carbone est couverte et débute de manière générale avec 5 atomes de carbone, quels que soient le mode d'ionisation et la famille O_x . Le nombre d'atomes de carbone maximal dans les formules brutes identifiées est de 35, parfois 40 pour les nombres d'atomes d'oxygène les plus élevés (exemple en O_7 pour l'APCI (-) et l'ESI (-), en O_5 pour l'APCI (+)). Le nombre maximal de carbones est nettement plus faible (*ie* 30 atomes de carbone) dans le cas de l'analyse par ESI (+). La gamme d'aromaticité (DBE) couverte apparaît peu liée au nombre d'atomes d'oxygène mais davantage dépendante du mode d'ionisation employé : un DBE maximal d'environ 30 est observé en APCI (-), de 20 en ESI (-) et APCI (+) et de 15 en ESI (+). Globalement, les distributions en APCI (-) correspondent à des distributions avec un degré DBE plus élevé que pour les autres modes d'ionisation tandis qu'à l'inverse le mode ESI (+) tend à favoriser l'identification de formules brutes ayant des plus faibles nombres d'atomes de carbone et de DBE. Avec un comportement intermédiaire, les modes ESI (-) et APCI (+) présentent tous deux des gammes de nombres d'atomes de carbone et de DBE relativement proches. Bien que ces différentes représentations soient souvent employées, elles permettent de comparer deux (ou plusieurs) échantillons entre eux grâce aux cartographies créées. Il est alors possible de situer où se situent les différences et points communs sur la cartographie. Comme chaque zone correspond à un type de composés, une comparaison macroscopique de différents échantillons est alors disponible.

2 Comparaison avec SFC/IT-ToF

L'utilisation de la spectrométrie FT-ICR/MS permet d'avoir accès à des cartographies (ratios H/C vs O/C, DBE en fonction du nombre d'atomes de carbone) d'un échantillon composé de milliers de formules brutes identifiées dans chacun des modes d'ionisation. Si cette technique donne accès à la

liste de nombreuses formules brutes, elle ne permet pas d'aller plus loin dans le détail structural de chaque molécule pour un échantillon complexe où il y a de nombreux isomères.

D'autre part pour des raisons pratiques, la SFC a été couplée avec un spectromètre de masse IT-ToF/MS possédant une résolution moindre en comparaison au spectromètre FT-ICR/MS (10 000 au lieu de 100 000). Cette perte en termes de résolution induit donc une perte d'information lors de l'analyse de composés isobares. Pour vérifier l'impact que cela peut avoir lors d'une analyse, le même type d'acquisition a été réalisé directement sur le spectromètre IT-ToF/MS en l'absence de séparation chromatographique. Pour cela, l'huile de pyrolyse rapide a été infusée dans les mêmes conditions qu'en FT-ICR/MS et les données acquises via ces expériences ont été retraitées en employant le logiciel Kendrick Inside (cf. Chapitre 2) paramétré à l'identique (sauf pour l'erreur en masse qui a été mise à 20 ppm). Comme attendu, seuls les pics majoritaires sont correctement identifiés par cette approche et l'utilisation de l'IT-ToF/MS comme seule source d'information est impossible. Cependant en ajoutant une dimension de séparation, via la SFC, les performances du système s'en trouvent améliorées et ce couplage peut induire des apports vis-à-vis de la FT-ICR/MS.

Les résultats obtenus par analyses FT-ICR/MS et SFC-UV/IT-ToF de l'huile de pyrolyse rapide de biomasse ont été comparés mode d'ionisation par mode d'ionisation. Le Tableau V-3 résume alors les nombres de formules brutes identifiées par chacune des techniques dans chacun des modes d'ionisation.

Tableau V-3 : Comparaison FT-ICR/MS et SFC/MS pour l'analyse de l'huile de pyrolyse rapide

<i>Mode d'ionisation</i>	<i>Nombre de formules brutes identifiées en FT-ICR/MS</i>	<i>Nombre de formules brutes identifiées en SFC/IT-ToF</i>	<i>Nombre de formules brutes communes</i>
APCI (-)	3949	1379	835
APCI (+)	2070	258	128
ESI (-)	3813	2042	1035
ESI (+)	3223	1230	585

Ce tableau met en lumière la différence de sensibilité entre les deux spectromètres de masse. En effet, dans les quatre modes d'ionisation, on remarque que le nombre de formules brutes identifiées est bien inférieur lors de l'analyse en SFC-UV/IT-ToF (deux fois moins environ) en comparaison avec une analyse par FT-ICR/MS. Les points singuliers en FT-ICR/MS proviennent de la haute résolution de l'appareil qui permet d'observer la quasi-totalité des espèces ionisables dans la matrice. Ces espèces non détectées en SFC/IT-ToF montrent que ce couplage ne peut pas être considérée seul pour la caractérisation des huiles de pyrolyse rapide. Cela s'observe également sur les diagrammes Van Krevelen issus des analyses SFC-UV/IT-ToF (cf. Figure V-5). Tout comme en FT-ICR/MS, le mode APCI (+) ne semble pas être pertinent pour cette application. En observant la faible valeur de la somme des intensités détectées (TIC : Total ion count) (5 fois moins qu'en ESI (+) ou APCI (-)), il est

possible de supposer que la faible réponse des composés oxygénés en mode positif et la gamme de masse supposé des molécules à identifier font de l'APCI (+) le mode le moins adapté pour la caractérisation d'huile de pyrolyse rapide. Les modes négatifs concentrent donc l'essentiel de l'information obtenus en SFC-UV/IT-ToF.

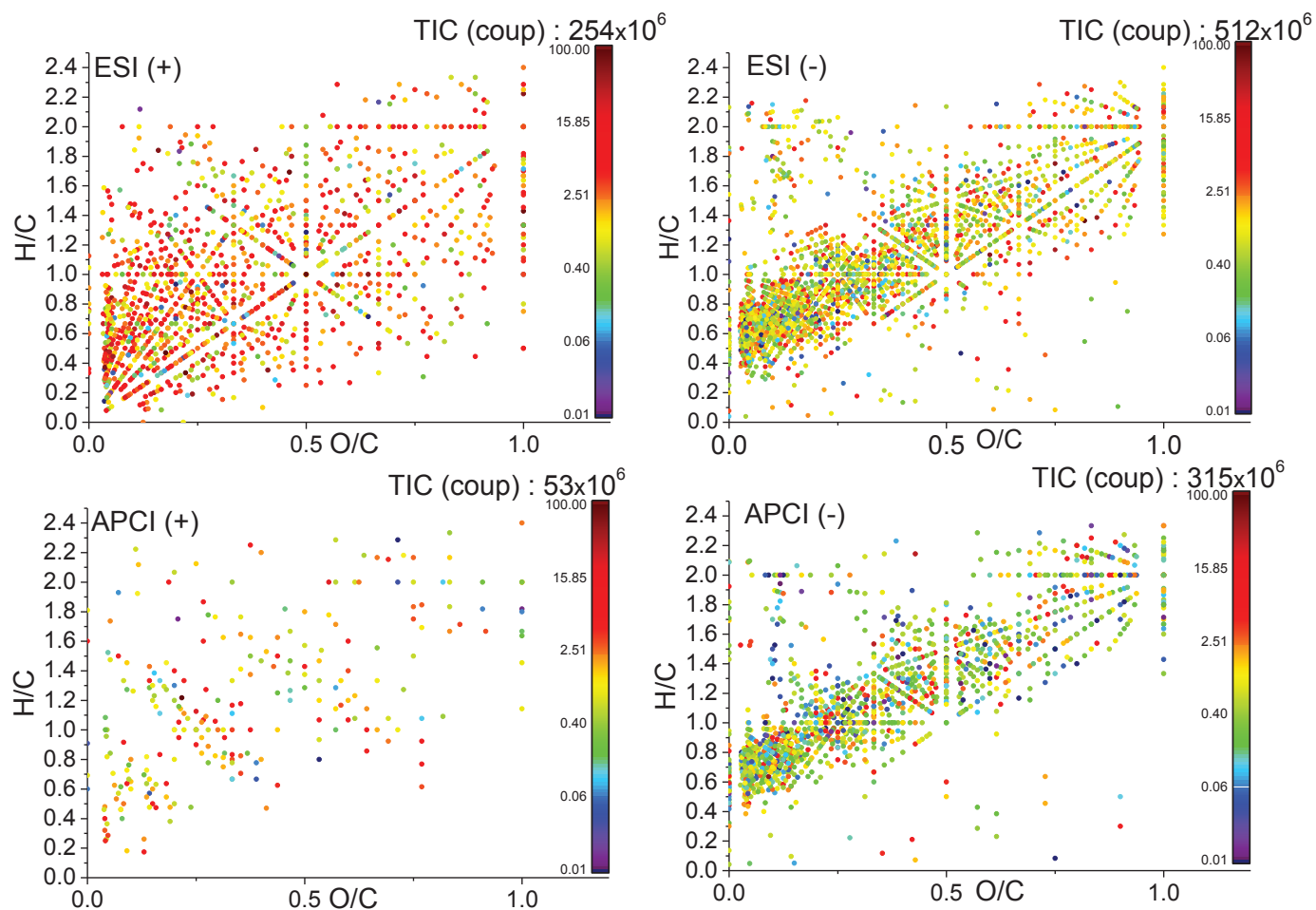


Figure V-5 : Diagramme Van Krevelen de l'huile de pyrolyse rapide dans les quatre modes d'ionisation en SFC/MS

Tout comme en FT-ICR/MS, cette figure permet de montrer le comportement proche entre APCI (-) et ESI (-). En effet, une densité importante de molécules dans la zone regroupant les composés phénoliques (O/C entre 0 et 0.6 et H/C entre 0.5 et 1.5) et les sucres (O/C entre 0.6 et 1.1 et H/C au-delà de 1.5) issus de la dégradation de la lignine, est observée. Cela traduit un nombre important de composés avec une polarité moyenne au sein de notre matrice. De plus les conclusions du chapitre 3 ont montré qu'une phase stationnaire polaire (BEH-2EP) était la plus adaptée à notre application. Il semble logique d'avoir plus de rétention sur des composés avec une polarité prononcée comme les composés phénoliques et les sucres. Le mode ESI (+) quant à lui permet une détection d'une très large gamme de composés et se focalise seulement sur une zone de faible O/C (entre 0 et 0.2). Là aussi, en accord avec les conclusions du chapitre 3, le mode positif peut permettre la détection de composés tels que les furanes localisés dans cette zone.

De plus, certaines identifications de formules brutes sont donc spécifiques à la SFC/IT-ToF. Cela s'observe dans le Tableau V-3 et sur les Figure V-4 et V-5 où certaines zones sont plus riches

pour une analyse SFC-UV/IT-ToF que pour une analyse FT-ICR/MS (en ESI(+), zone pour H/C < 0.5 et en ESI (-) zone avec H/C > 1.5 et O/C > 0.7). Cela montre que lors d'une analyse par FT-ICR/MS, la complexité de la matrice va induire de la suppression d'ionisation pour certaines espèces et induire un signal correspondant à ces molécules inférieur à la limite de détection de l'appareil. A l'inverse en SFC/IT-ToF, la complexité de la matrice lors de l'entrée dans la source d'ionisation est moindre grâce à la séparation et les effets de suppression d'ionisation peuvent être atténués. Potentiellement, la moitié (environ pour chaque mode d'ionisation) des informations acquises par SFC/IT-ToF sont impossible à détecter en FT-ICR/MS malgré la très haute résolution. Une identification structurale aboutie semble la manière la plus simple pour confirmer ces résultats. Ce phénomène s'observe également via d'autres représentations. Tout comme en FT-ICR/MS, le nombre de formules brutes identifiées en fonction du nombre d'hétéros éléments a été tracé. La Figure V-6 illustre cette représentation. Premièrement l'analyse en SFC/IT-ToF montre là aussi le peu d'intérêt du mode APCI (+) pour les huiles de pyrolyse rapide. Très peu de formules brutes sont détectées dans ce cas-là en comparaison aux trois autres modes. Pour les autres modes d'ionisation en comparant avec la Figure V-3, les familles les moins intenses, soit avec peu d'oxygène (O₁, O₂, O₃) soit avec beaucoup d'oxygène (O₁₃, O₁₄, O₁₅) sont plus fournies en nombre de composés détectés. Une explication possible provient de la suppression d'ionisation à cause de la complexité de la matrice en FT-ICR/MS. En effet, on peut supposer que la dimension de séparation va simplifier la matrice et la détection de ces composés s'en trouve améliorer. Cela constitue un avantage important de la SFC/IT-ToF en comparaison à la FT-ICR/MS.

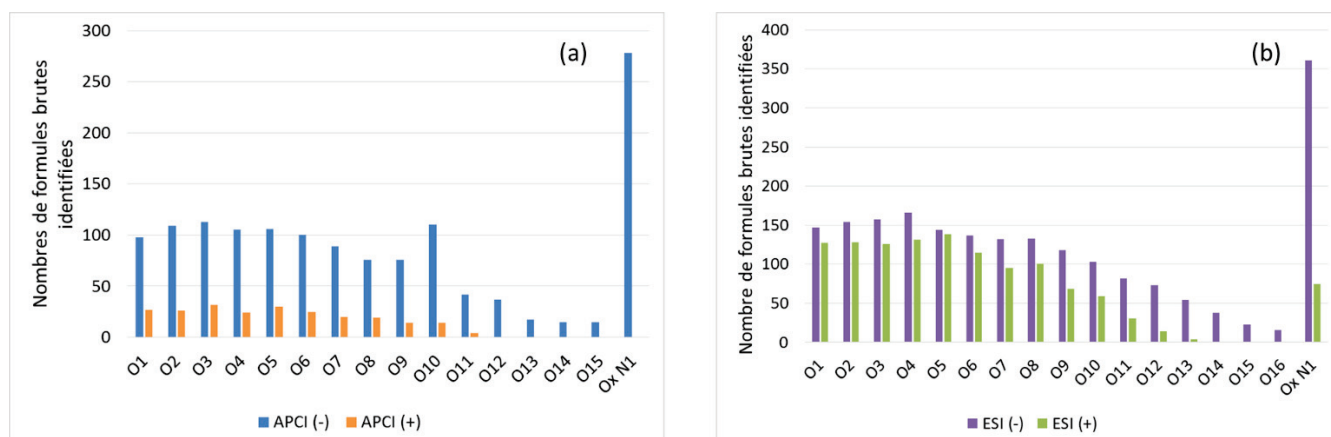


Figure V-6 : Distribution de nombre de formules brutes identifiées en SFC/IT-ToF en fonction du nombre d'hétéro élément en APCI (+/-) (a) et en ESI (+/-) (b)

Pour confirmer cette hypothèse, l'exemple du mode APCI négatif avec la SFC/IT-ToF a été sélectionné. Les formules brutes identifiées ont été regroupées selon leur temps de rétention. Le chromatogramme a été scindé en trois parties égales et une distribution a été réalisée pour chacune de ces parties. La Figure V-7 illustre chacune de ces trois parties ainsi que la distribution totale en APCI (-). Les familles O₁₂, O₁₃, O₁₄ et O₁₅, peu vues en FT-ICR/MS, ne sont détectés que sur l'histogramme vert représentant la fin du chromatogramme. Leur détection est donc peut être réalisée grâce à leur séparation du reste de la matrice dans la dernière partie de l'analyse.

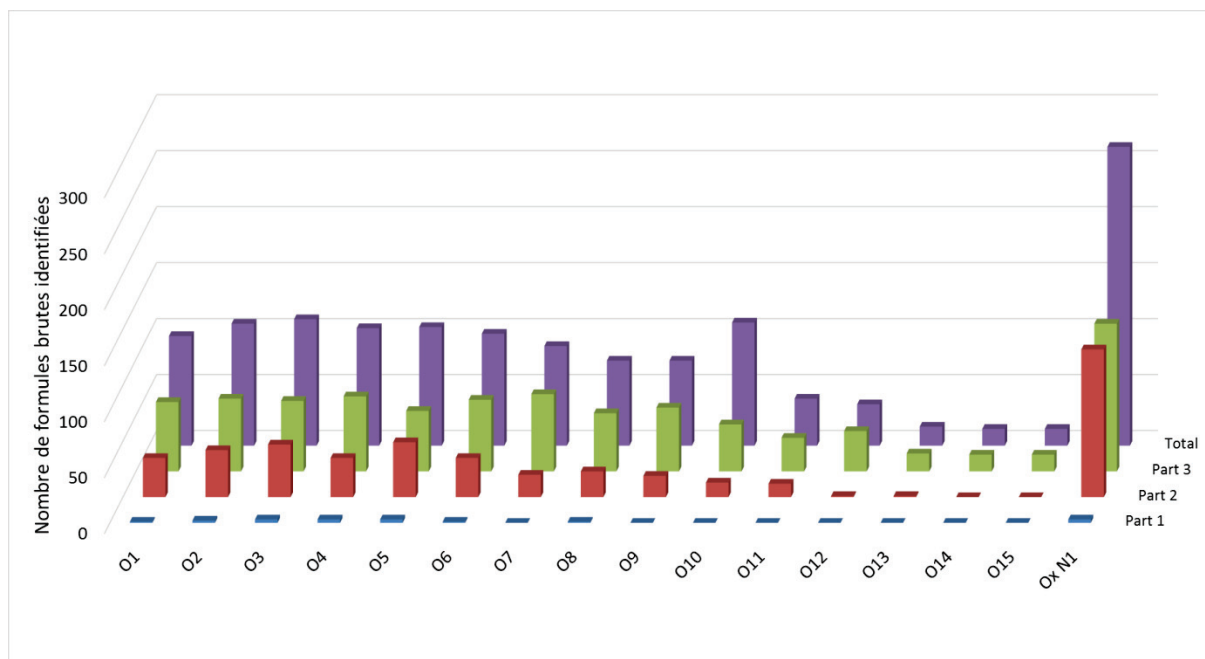


Figure V-7 : Distribution en nombres de formules brutes identifiées en SFC/APCI (-)IT-ToF en fonction du nombre d'hétéro élément et du temps de rétention

Outre cette possibilité de correspondance entre les techniques, un second intérêt de la SFC/MS vis-à-vis de la FT-ICR/MS se situe dans la différenciation des composés isomérique. Deux composés isobariques (isomériques) ne sont détectés que comme un seul pic de masse dont les deux formes apporteront une contribution. Le manque d'information structurale peut alors sous-estimer le nombre de composés réellement présents et ionisés. A contrario, avec la séparation SFC en amont, des exemples ont pu mettre en évidence qu'une même masse peut correspondre à plusieurs pics le long du chromatogramme. Le Tableau V-4 résume les différents isomères trouvés pour le mode APCI négatif en SFC/MS. Ces formules brutes ont été identifiées en FT-ICR/MS mais associées à une seule molécule potentiellement. On remarque que sur ces 25 formules brutes, au moins deux contributions ont été détectées le long du chromatogramme avec des temps de rétention bien différents (voir 3 ou 4 signaux). Cette différence en termes de rétention laisse supposer que chaque signal correspond à une structure différente. Pour aller plus loin, appliquer la méthodologie d'identification développée dans le chapitre 4 pourrait confirmer cette supposition. Dans les cas relevés dans le Tableau V-4 malheureusement, aucun spectre de fragmentation de bonne qualité n'a pu être exploité. Là aussi, le besoin d'améliorer les conditions de fragmentation constitue une nécessité pour exploitation plus poussée de nos données.

Tableau V-4 : Liste des isomères observés en SFC/APCI (-)-MS avec les différents temps de rétention observés

Formule de la molécule	Tr 1 (min)	Tr 2 (min)	Tr 3 (min)	Tr 4 (min)	Masse unitaire (uma)
C ₁₀ H ₁₀ O ₂	10.34	14.71	16.51		162
C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1.56	19.91			164
C ₁₀ H ₁₀ O ₃	8.13	8.46	6.61		178
C ₁₀ H ₁₂ O ₃	5.19	10.47			180
C ₁₁ H ₁₂ O ₄	6.37	14.68			208
C ₁₆ H ₁₆ O ₄	8.78	9.95			272
C ₆ H ₁₀ O ₅	14.67	15.84			162
C ₂₀ H ₂₄ O ₅	11.2	13.62	15.33		344
C ₈ H ₁₂ O ₆	13.31	15.95			204
C ₁₄ H ₁₈ O ₆	11.62	11.85	17.54		282
C ₁₆ H ₁₆ O ₆	9.9	14.81			304
C ₂₀ H ₂₆ O ₆	16.89	18.24			362
C ₇ H ₁₀ O ₇	14.61	14.78	15.8		206
C ₁₂ H ₁₆ O ₇	9.4	16.74			272
C ₁₃ H ₂₀ O ₇	12.15	17.95			288
C ₁₃ H ₁₈ O ₈	12.1	13.19	15.36		302
C ₉ H ₂₀ O ₉	8.81	15.01			272
C ₁₂ H ₂₂ O ₉	8.56	10.77			310
C ₁₀ H ₂₀ O ₁₀	9.12	13.01	14.51	15.7	300
C ₁₀ H ₂₂ O ₁₀	11.34	13.89	15.19		302
C ₁₁ H ₂₂ O ₁₀	10.87	12.45	15.58	16.63	314
C ₁₁ H ₂₄ O ₁₀	11.3	18.24			316
C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	8.38	10.97	14.65		324
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₀	10.35	12.69	14.34	16.21	326
C ₁₃ H ₂₂ O ₁₀	10.7	10.77	12.18		338

Enfin l'intérêt d'utiliser ces deux techniques se trouve dans le nombre de points communs entre les deux analyses permettant de choisir une liste de formules brutes détectées via les deux techniques afin d'effectuer des analyses ciblées futures en SFC/IT-ToF. En employant des conditions de fragmentation spécifiques et ciblées sur la masse correspondantes à ces formules brutes, il sera possible d'augmenter la qualité des spectres de fragmentation et donc améliorer la confiance dans la méthodologie d'identification développée dans le chapitre 4.

La séparation d'isomères combinée à la possibilité d'obtenir des structures précises via notre méthodologie constitue un avantage important de la SFC/MS vis-à-vis de la FT-ICR/MS. En conclusion le Tableau V-5 résume les points forts et les limites de chacune des techniques. Si la SFC/MS semble constituer un réel intérêt pour la caractérisation des huiles de biomasse, une des opportunités serait de coupler la séparation obtenue à un spectromètre de masse très haute résolution équivalente à celle du FT-ICR/MS afin d'accroître encore la résolution de l'analyse.

Tableau V-5 : Comparaison entre FT-ICR/MS et SFC/MS

<i>Techniques analytiques</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
FT-ICR/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Très haute résolution permettant l'ionisation d'une grande majorité de la matrice 	<p><i>Infusion (sans séparation SFC)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Complexité de la matrice entraînant suppression d'ionisation • Aucune différenciation des isomères
SFC/IT-ToF	<p><i>Séparation SFC :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout de l'information « temps de rétention » permettant la différenciation des isomères • Simplification de la matrice lors de l'entrée dans la source d'ionisation 	<ul style="list-style-type: none"> • Résolution de l'IT-ToF plus faible limitant le nombre d'espèces détectées

Comparaison GCxGC/ToF vs SFC/IT-ToF vs FT-ICR/MS

Prise une à une, les différentes techniques analytiques utilisées dans cette étude ne semblent pas en mesure de caractériser l'ensemble de la matrice complexe. La GCxGC/ToF ne parvient pas à éluer la partie lourde de la matrice mais permet d'identifier de manière certaine les composés détectés. La FT-ICR/MS permet de voir une grande majorité des composés ionisables mais dans nos conditions aucune structure de molécules n'est accessible. La SFC/IT-TOF quant à elle ne possède pas encore un processus d'identification abouti et ne détecte pas toute la matrice.

Comme attendu dans le cadre de la caractérisation d'échantillon complexe, la démarche à adopter consiste à croiser les informations de techniques complémentaires. Pour l'exemple des huiles de pyrolyse rapide, GCxGC/ToF, FT-ICR/MS et SFC/IT-ToF apparaissent comme tels. La Figure V-8 représente les points communs et les points singuliers de chaque technique analytique en termes de formules brutes identifiées. Les points singuliers montrent l'intérêt d'utiliser les différentes techniques ensemble, il apparaît que certaines zones sont spécifiques à la SFC/IT-ToF (faible O/C et H/C) par exemple alors que cette approche ne permet pas de décrire tous les points situés au centre du diagramme qui sont détectés seulement en FT-ICR/MS. L'utilisation d'un spectromètre plus résolutif que l'IT-ToF/MS en couplage avec la SFC pourrait peut-être donner accès aux points rouges du diagramme de gauche vu exclusivement en FT-ICR/MS.

Le nombre de points communs entre les différentes techniques ne semble pas très élevé (peu de points verts et jaunes) à cause de la représentation employée. Les résultats de GCxGC/ToF représentent peu d'informations en comparaison aux autres mais la qualité de ces informations est bien supérieure. En effet, une identification structurale aboutie est disponible et permet de caractériser la partie « légère » de la matrice. En focalisant les expériences SFC/MS (avec IT-ToF/MS ou autre spectromètre) sur la partie plus « lourde » à l'aide d'analyses ciblées, il est possible d'augmenter la qualité de la fragmentation et donc potentiellement parvenir à l'identification structurale de ces composés.

Ces trois approches semblent donc complémentaires et adaptées pour parvenir à la caractérisation la plus aboutie possible des huiles de pyrolyse rapide.

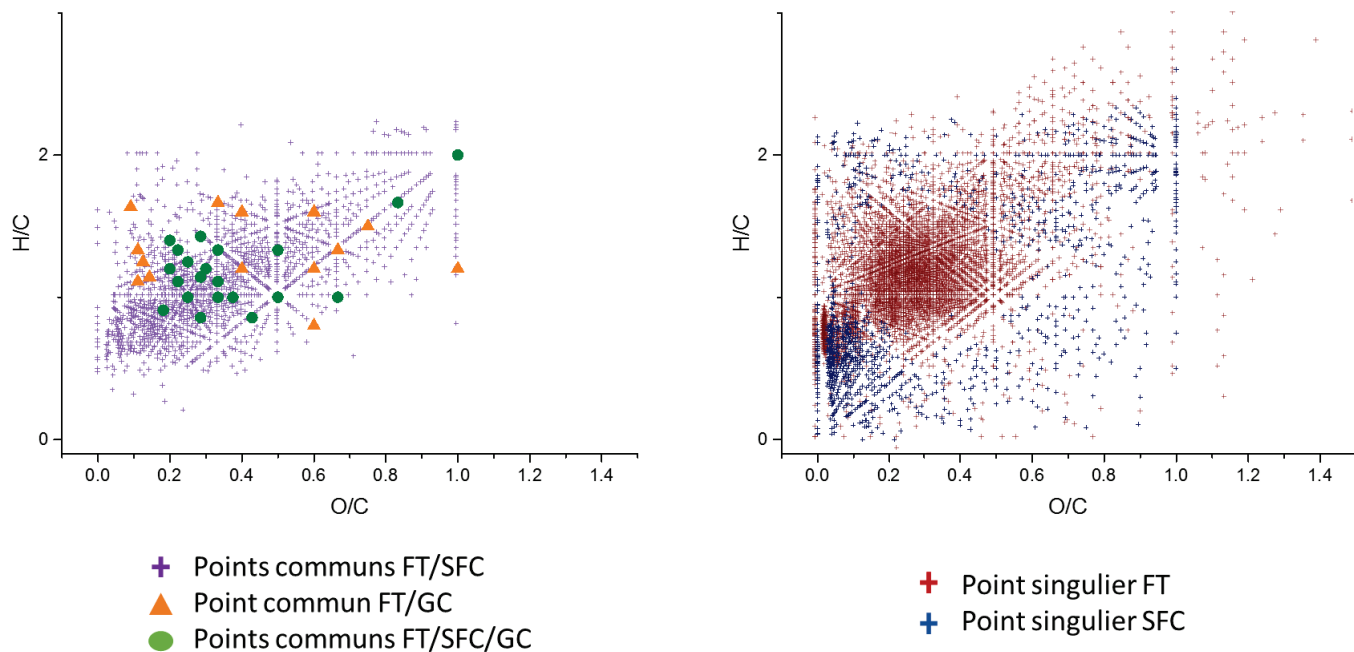


Figure V-8 : Diagrammes van Krevelen des formules brutes identifiées communes (à gauche) et des points singuliers (à droite) identifiées en SFC/MS, GCxGC/MS et FT-ICR/MS

Conclusions

Plusieurs techniques analytiques ont déjà été investiguées pour la caractérisation des huiles de pyrolyse au travers de la littérature. Les deux techniques regroupant le plus de travaux sont la GC/MS (et GCxGC/MS) ainsi que la spectrométrie de masse très haute résolution (FT-ICR/MS). Chacune de ces techniques permet d'accroître les informations sur les huiles de pyrolyse rapide. La GCxGC/MS apparait donc comme une technique de choix pour les molécules de petites masses moléculaires (jusqu'à 200 uma). La possibilité de comparer les données expérimentales à la base de données NIST en fait un outil puissant pour identifier la partie éluee de la matrice. Malheureusement la thermosensibilité et la polarité des autres espèces présentes dans la matrice empêchent une caractérisation totale par cette technique. Une autre approche utilise la spectrométrie de masse très haute résolution afin de réaliser des cartographies les plus exhaustives possibles de l'échantillon en identifiant un large nombre de formules brutes.

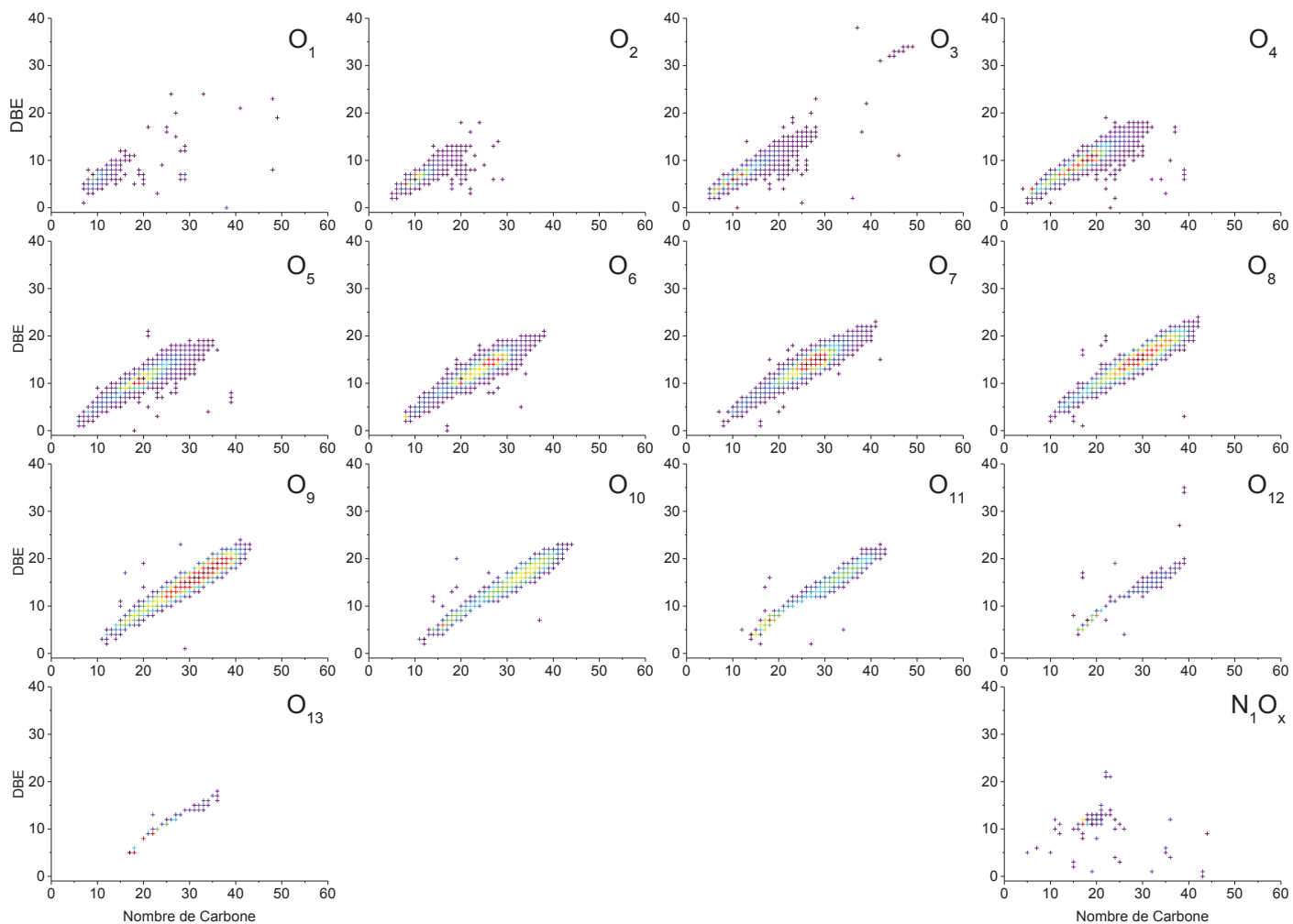
Le couplage SFC/MS apparait comme une alternative complémentaire à ces deux premières approches. En effet, si la GCxGC/MS est adaptée aux petites molécules, la SFC/MS permet de couvrir une gamme plus large en termes de masse molaire et de complexité chimique. En combinant les résultats de ces deux approches, la composition de davantage de constituants de l'huile de pyrolyse rapide est alors accessible pour identification.

La technique SFC/MS permet d'obtenir des données structurales par fragmentation MS^n et de différencier des isomères au sein de ces matrices s'ils ont différents temps de rétention. Une approche combinée de ces deux techniques consisterait à se focaliser sur les points communs entre les deux techniques afin de réaliser des analyses ciblées sur ces composés et ainsi parvenir à identifier de nouveaux composants des huiles de pyrolyse rapide. Enfin une dernière perspective serait d'adapter le couplage SFC/MS entre la SFC et le FT-ICR/MS. Afin d'obtenir une résolution maximum pour la caractérisation de nouvelles espèces dans les huiles de pyrolyse rapide.

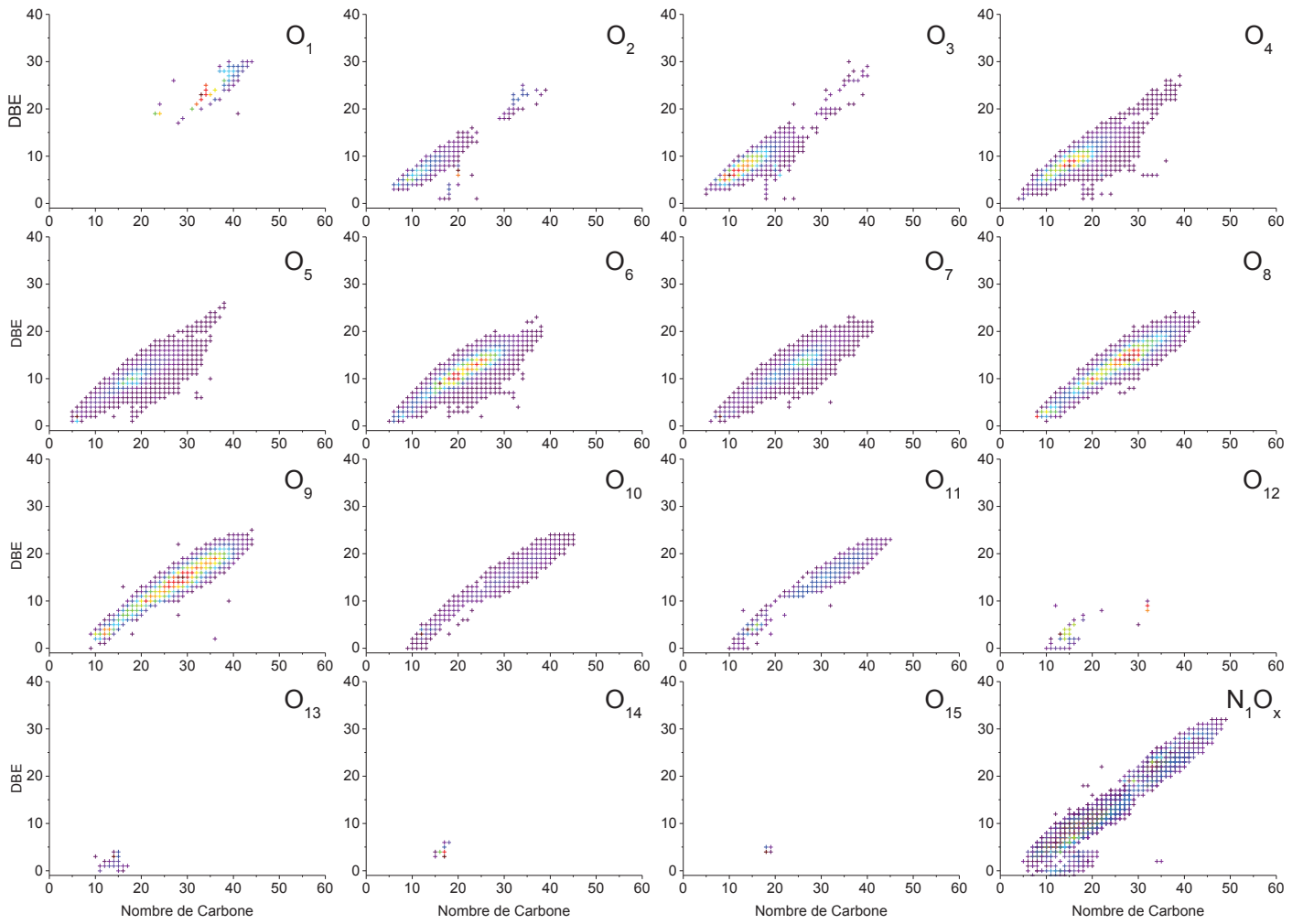
Références

- [1] C. Michailof, T. Sfetsas, S. Stefanidis, K. Kalogiannis, G. Theodoridis, A. Lappas, Quantitative and qualitative analysis of hemicellulose, cellulose and lignin bio-oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1369 (2014) 147–160.
- [2] L. Negahdar, A. Gonzalez-Quiroga, D. Otyuskaya, H.E. Toraman, L. Liu, J.T.B.H. Jastrzebski, K.M. van Geem, G.B. Marin, J.W. Thybaut, B.M. Weckhuysen, Characterization and Comparison of Fast Pyrolysis Bio-oils from Pinewood, Rapeseed Cake, and Wheat Straw Using (^{13}C) NMR and Comprehensive GC \times GC, *ACS sustainable chemistry & engineering* 4 (9) (2016) 4974–4985.
- [3] M. Staš, J. Chudoba, D. Kubička, J. Blažek, M. Pospíšil, Petroleomic characterization of pyrolysis bio-oils: a review, *Energy Fuel* 31 (10) (2017) 10283–10299.
- [4] D. Meier, Pyrolysis Oil Biorefinery, in: Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–37.
- [5] R. Olcese, V. Carré, F. Aubriet, A. Dufour, Selectivity of Bio-oils Catalytic Hydrotreatment Assessed by Petroleomic and GC*GC/MS-FID Analysis, *Energy Fuels* 27 (4) (2013) 2135–2145.
- [6] N. Sudasinghe, J.R. Cort, R. Hallen, M. Olarte, A. Schmidt, T. Schaub, Hydrothermal liquefaction oil and hydrotreated product from pine feedstock characterized by heteronuclear two-dimensional NMR spectroscopy and FT-ICR mass spectrometry, *Fuel* 137 (2014) 60–69.
- [7] N.S. Tessarolo, R.V.S. Silva, G. Vanini, A. Casilli, V.L. Ximenes, F.L. Mendes, A. Rezende Pinho, W. Romão, E.V.R. Castro, C.R. Kaiser, D.A. Azevedo, Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques: ^1H NMR, GC \times GC-TOFMS and FT-ICR MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 117 (2016) 257–267.
- [8] T. Kekäläinen, T. Venäläinen, J. Jänis, Characterization of Birch Wood Pyrolysis Oils by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: Insights into Thermochemical Conversion, *Energy Fuels* 28 (7) (2014) 4596–4602.
- [9] D.J. McClelland, A.H. Motagamwala, Y. Li, M.R. Rover, A.M. Wittrig, C. Wu, J.S. Buchanan, R.C. Brown, J. Ralph, J.A. Dumesic, G.W. Huber, Functionality and molecular weight distribution of red oak lignin before and after pyrolysis and hydrogenation, *Green Chem* 19 (5) (2017) 1378–1389.
- [10] J.M. Jarvis, D.S. Page-Dumroese, N.M. Anderson, Y. Corilo, R.P. Rodgers, Characterization of Fast Pyrolysis Products Generated from Several Western USA Woody Species, *Energy Fuels* 28 (10) (2014) 6438–6446.
- [11] Y. Liu, Q. Shi, Y. Zhang, Y. He, K.H. Chung, S. Zhao, C. Xu, Characterization of Red Pine Pyrolysis Bio-oil by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (7) (2012) 4532–4539.
- [12] E.A. Smith, S. Park, A.T. Klein, Y.J. Lee, Bio-oil Analysis Using Negative Electrospray Ionization: Comparative Study of High-Resolution Mass Spectrometers and Phenolic versus Sugaric Components, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3796–3802.
- [13] P.V. Abdelnur, B.G. Vaz, J.D. Rocha, M.B.B. de Almeida, M.A.G. Teixeira, R.C.L. Pereira, Characterization of Bio-oils from Different Pyrolysis Process Steps and Biomass Using High-Resolution Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 27 (11) (2013) 6646–6654.
- [14] I. Miettinen, S. Kuittinen, V. Paasikallio, M. Mäkinen, A. Pappinen, J. Jänis, Characterization of fast pyrolysis oil from short-rotation willow by high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Fuel* 207 (2017) 189–197.
- [15] M. Staš, J. Chudoba, M. Auersvald, D. Kubička, S. Conrad, T. Schulzke, M. Pospíšil, Application of orbitrap mass spectrometry for analysis of model bio-oil compounds and fast pyrolysis bio-oils from different biomass sources, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 124 (2017) 230–238.
- [16] E.C. Minor, M.M. Swenson, B.M. Mattson, A.R. Oyler, Structural characterization of dissolved organic matter: A review of current techniques for isolation and analysis, *Environmental science. Processes & impacts* 16 (9) (2014) 2064–2079.

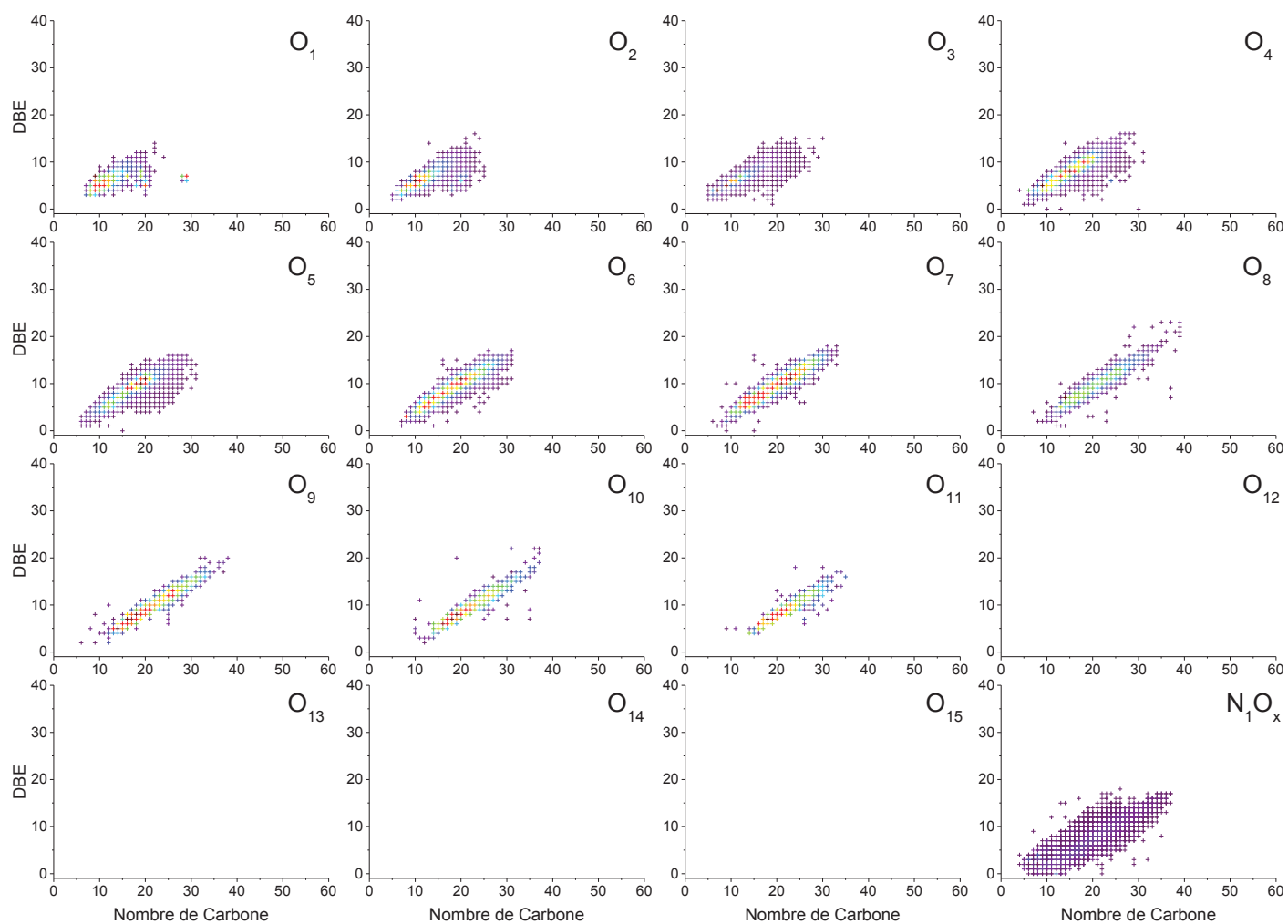
Annexe 1



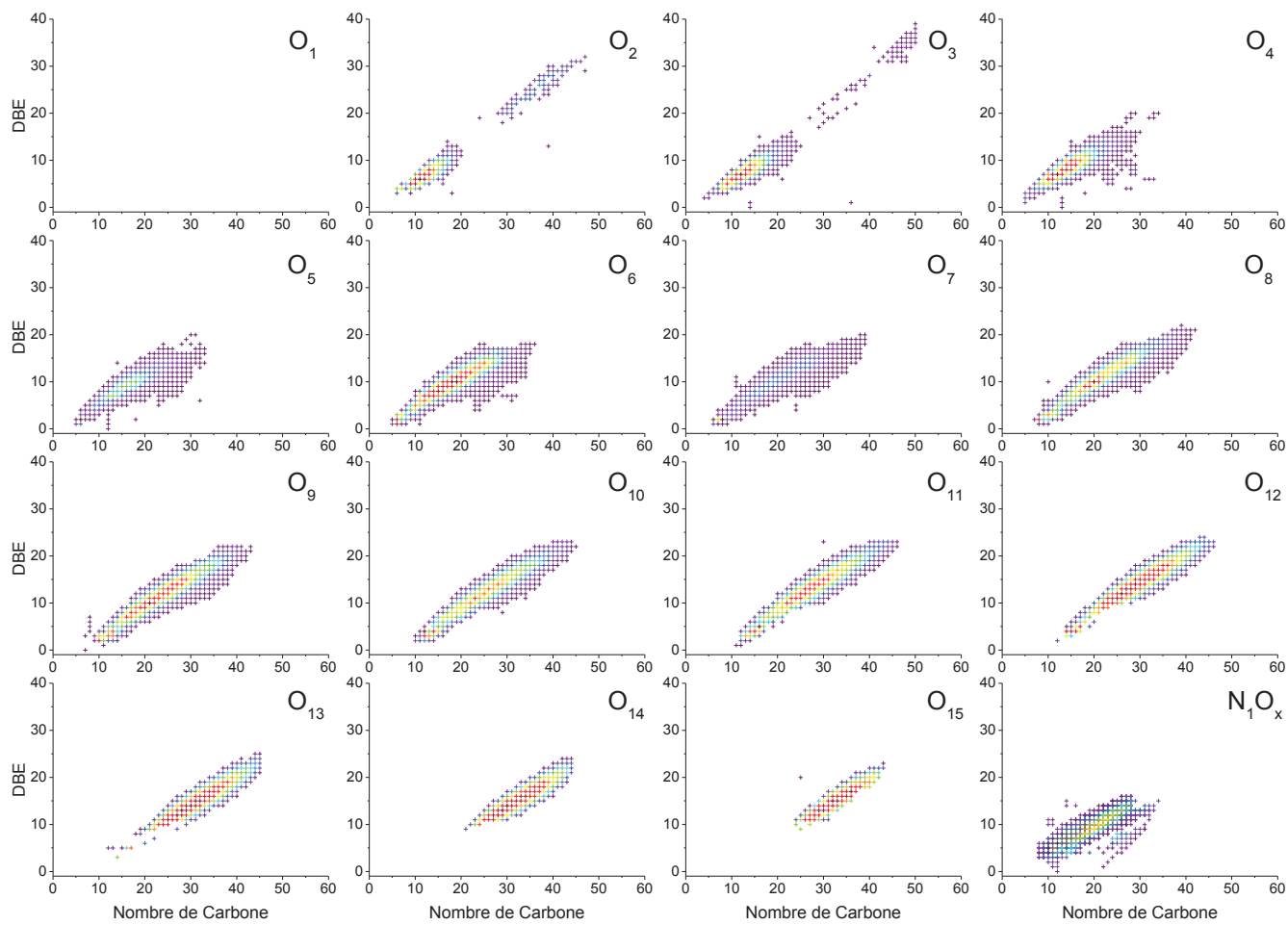
Diagrammes de Kendrick obtenus en APCI(+)-FT-ICR/MS par familles oxygénées



Diagrammes de Kendrick obtenus en APCI(-)-FT-ICR/MS par familles oxygénées



Diagrammes de Kendrick obtenus en ESI(+)-FT-ICR/MS par familles oxygénées



Diagrammes de Kendrick obtenus en ESI(-)-FT-ICR/MS par familles oxygénées

Conclusions générales et perspectives

Conclusions Générales et Perspectives

La transformation de la biomasse lignocellulosique pour la production de biocarburants et de produits biosourcés est un des défis actuels à relever dans le contexte actuel de transition énergétique. Afin de valoriser au mieux cet échantillon complexe, il est obligatoire de connaître la composition chimique des produits qui en sont issus. Dans cette optique, des techniques analytiques comme la GCxGC/MS ou la FT-ICR/MS permettent de caractériser en partie ces échantillons complexes. Cependant, une seule technique analytique est insuffisante du fait de la complexité de ces matrices (larges gammes de volatilité, de polarité, de masses moléculaires). Nous avons envisagé la chromatographie en phase supercritique (SFC) couplée à la spectrométrie de masse comme alternative aux techniques analytiques usuelles de la littérature. La SFC/MS est encore peu employée sur ce type de matrices complexes. Les principales utilisations se focalisent sur les analyses d'impuretés essentiellement dans des matrices simples. La SFC permettrait de combiner, dans notre cas, certains avantages des chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide : capacité de pics par unité de temps, sélectivités, compatibilité pour l'analyse de produits non volatils et/ou thermosensibles. Cette approche avait, à notre connaissance, pas encore été utilisée pour la caractérisation d'huile de pyrolyse rapide.

La première étape de ce projet a été de mettre au point une méthodologie pour le développement d'une analyse SFC-UV en se basant directement sur l'échantillon réel et non sur des molécules modèles, approche originale par rapport à la littérature et qui permet de prendre en compte la complexité de l'échantillon dès les premières étapes de développement. Le nombre de pics détectés, l'occupation du chromatogramme et la fenêtre d'élution ont été les trois critères considérés ayant un impact sur la capacité de pics. La méthodologie proposée visait tout d'abord à déterminer le couple phase stationnaire/phase mobile le plus adapté. Les conditions d'élution (température, pression, gradient d'élution) ont également été optimisées. Bien que la pression et la température aient un impact discret sur la rétention des composés pris un par un, l'impact sur le grand nombre de composés de la matrice est confondu et minimiser. Cette démarche est parfaitement transposable à n'importe quelle autre matrice complexe.

La seconde étape a consisté à mettre au point le couplage entre la SFC et la spectrométrie de masse, détecteur hautement informatif sélectionné pour atteindre l'identification des composés. Deux spectromètres de masse ont été utilisés au cours de ces travaux (simple quad et IT-ToF/MS). L'optimisation de l'interface et des paramètres d'ionisation ont confirmé que lors d'un couplage SFC et MS le débit entrant dans la source d'ionisation était un paramètre prépondérant. De plus, les optimisations de paramètres doivent prendre en compte la complexité de l'échantillon. Chaque molécule possède une réponse différente à chaque paramètre et il est nécessaire de trouver le meilleur compromis pour l'ensemble de la matrice. Ces optimisations ont permis d'obtenir un set de méthodes analytiques fournissant un grand volume de données et dont le retraitement et la valorisation nécessite une méthodologie adaptée.

L'utilisation du simple quadripôle comme analyseur MS a permis de développer à la fois le couplage avec la SFC ainsi qu'une méthodologie de retraitement. Afin de s'affranchir des logiciels

commerciaux et de leur dépendance aux extensions propres à chaque constructeur, nous avons créé notre propre logiciel de traitement du signal SFC/MS. Ce logiciel permet de visualiser graphiquement l'ensemble des données acquises (temps de rétention, masse et intensité). A chacun des points de la cartographie produite, est associé une formule brute. Comme une formule brute peut correspondre à des milliers de molécules différentes, notre méthodologie a consisté à utiliser la fragmentation (MS/MS) et de confronter les spectres MS² à une plateforme internet mêlant approche *in silico* et comparaison de base de données. Cette approche a pu être testée d'abord sur des molécules modèles, à la fois dans un mélange simple et dans une matrice complexe. La même démarche a également été appliquée à l'huile de pyrolyse rapide. Les premiers résultats obtenus mettent en évidence l'importance des informations contenues dans les spectres de fragmentation. Dans notre cas, le peu d'informations tirées de ces spectres n'a pas permis d'accroître les connaissances moléculaires sur les huiles de pyrolyse rapide. En effet, si les spectres de fragmentation sont trop bruités ou avec des fragments peu intenses et non discriminants, l'identification structurale va proposer des résultats dont il sera difficile d'évaluer le degré de confiance. Ce logiciel ainsi que cette méthodologie peuvent être facilement utilisés avec d'autres matrices mais également avec d'autres techniques chromatographiques couplées à la masse.

Pour valoriser la grosse quantité de données produites par ces différentes méthodes, les résultats SFC/IT-ToF ont été comparés à ceux obtenus via deux techniques analytiques largement employées pour la caractérisation d'huile de pyrolyse rapide : GCxGC/MS et FT-ICR/MS. La SFC/IT-ToF présente des avantages comme la détection de molécules dans une gamme de masse plus élevée que la GCxGC/MS et la possibilité d'obtenir des informations structurales non disponibles par FT-ICR/MS. La différenciation d'isomère grâce au temps de rétention est également un avantage par rapport à la FT-ICR/MS. Cependant l'utilisation de la SFC/IT-ToF n'est pas suffisante, seule, pour parvenir à une caractérisation totale des huiles de pyrolyse rapide. En effet, certaines molécules détectées en FT-ICR/MS ne le sont pas en SFC/IT-ToF. Et l'identification structurale n'est pas encore un processus aussi abouti que celui employé en GCxGC/MS. Pour ces différentes raisons, la SFC/IT-ToF ne peut pas être considéré comme la seule et unique solution de caractérisation mais peut compléter avantageusement les autres approches afin de combler certains manques dans la connaissance de ces huiles.

Ce travail de thèse a permis de montrer que la SFC/MS était une solution alternative complémentaire pour la caractérisation d'échantillons complexe. Elle reste cependant encore améliorable et perfectible pour constituer un outil puissant. Pour cela plusieurs voies d'amélioration sont apparues au cours de ces travaux.

La complexité des échantillons pourrait être diminuée en amont de la séparation. En effet, le fractionnement de la matrice d'origine peut donner accès des chromatogrammes plus simples à traiter. Si le fractionnement par SEC testé n'est pas la meilleure solution, il existe d'autres types de fractionnement envisageable comme la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) qui permettrait de fractionner par polarité l'huile de pyrolyse rapide. Il sera alors possible d'analyser ces fractions soit par la méthode SFC proposée soit appliquer la méthodologie décrite afin de développer des méthodes SFC spécifiques à chaque fraction produite.

Concernant le couplage entre SFC et IT-ToF/MS, la première perspective consiste à améliorer la qualité de la fragmentation réalisée. En effet, ces conditions de fragmentation ainsi que les spectres

qui en résultent sont le facteur clé pour apporter avec précision des informations moléculaires et structurales sur la matrice. Plusieurs approches sont envisageables : l'utilisation de plusieurs sets de conditions de fragmentation. Le regroupement par précurseur des différents spectres de fragmentation obtenus permettrait d'avoir un maximum d'information sur les fragments créés à faible énergie et ceux produits avec des valeurs plus hautes d'énergie de fragmentation. Ainsi les spectres de fragmentation seront bien représentatifs de la molécule et l'étape de comparaison à des bases de données s'en trouverait facilitée. Une seconde perspective toujours associée à cette étape d'identification consiste à travailler avec une base de données plus adaptée à la problématique des huiles de pyrolyse rapide. Pour cela, il est envisageable de créer cette base de données en interne à l'aide de standard, de regroupement d'autres bases de données, d'informations issues d'autres analyses (autres matrices, autres techniques analytiques par exemple) afin de décrire au mieux cette gamme de petites molécules polaires assez peu décrites aujourd'hui dans les bases de données disponibles. En parallèle, l'approche *in silico* doit rester une alternative à ne pas négliger à la vue de son rapide évolution dans la communauté scientifique aujourd'hui.

Dans le dernier chapitre de cette thèse, la précision du FT-ICR/MS est apparue comme un avantage. Le couplage entre ce spectromètre de masse très haute résolution et la SFC permettrait de travailler avec un outil très puissant pour la description moléculaire d'un échantillon complexe. La gestion de l'interface mais également des particularités du FT-ICR/MS comme l'accumulation dans la cellule ICR devraient être prises en compte afin de ne pas re-mélanger les composés séparés par la SFC.

Enfin, l'utilisation de la SFC couplée à la spectrométrie de masse génère un gros volume de données avec différents modes d'ionisation. La gestion et le croisement de ces données a constitué un axe important de cette thèse. Si une stratégie de comparaison a été mise en place, une dernière perspective consiste à structurer au mieux les informations afin d'effectuer des recoupements entre les différents modes d'ionisation. Sur la base du travail réalisé avec les données MS¹, une première étape serait de pouvoir comparer les données MS² par précurseur.

Toute cette étude permet d'affirmer que la SFC couplée à la spectrométrie de masse est une technique analytique intéressante pour la caractérisation d'échantillons complexes. La large gamme d'utilisation de la SFC permet de couvrir beaucoup d'applications et une fois le retraitement des données HRMS et MSⁿ maîtrisé, ce couplage s'intègre parfaitement dans un parc analytique de pointe.

La chromatographie en phase supercritique en couplage avec une détection UV et spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse d'échantillons complexes : application aux bio-huiles

Résumé :

Ces travaux de thèse ont porté sur l'analyse d'échantillons complexes, via l'exemple des huiles de pyrolyse rapide, par chromatographie en phase supercritique (SFC) en couplage avec un détecteur UV et un spectromètre de masse haute résolution (HRMS). Encore méconnue, cette technique est à ce jour peu répandue en comparaison avec la chromatographie gazeuse. En premier lieu, une optimisation basée sur la maximisation de la capacité de pics lors de l'analyse de la bio-huile a été mise en place. Pression, température, phases stationnaires et phases mobiles ont ainsi été sélectionnées pour séparer un maximum de pics (soit plus d'une centaine de pics) sur la plus large fenêtre de rétention possible. Une fois la séparation maîtrisée, un travail expérimental de couplage avec la spectrométrie de masse a été conduit tout d'abord sur un détecteur à simple quadripôle puis sur un détecteur à temps de vol avec un piège linéaire (IT-ToF/MS). Des expérimentations en fragmentation MS/MS ont ensuite été réalisées pour proposer une identification des espèces détectées. Le retraitement du grand nombre de données générées a aussi nécessité de développer un outil de retraitement adapté pour réaliser l'identification de formules brutes et proposer des structures développées à l'aide de la fragmentation et d'outils de comparaison ouverts, en libre accès sur Internet. La dernière partie de ces travaux a été consacrée à la comparaison des résultats obtenus sur une bio-huile par SFC-UV/IT-ToF, GCxGC/ToF et FT-ICR/MS. L'ensemble de ces travaux à vocation méthodologique a permis d'améliorer notre connaissance de ce type de couplage SFC-UV/HRMS au travers d'une application liée à la caractérisation de matrices complexes ex-biomasse.

Supercritical fluid chromatography hyphenated with UV detection and high resolution mass spectrometry for analysis of complex samples: application to fast pyrolysis bio oils

Summary:

This thesis focused on the analysis of complex sample, with the example of fast pyrolysis bio-oils, by supercritical fluid chromatography (SFC) hyphenated with a UV detector and a high resolution mass spectrometer (HRMS). Still unknown, this technique is currently not widespread in comparison with gas chromatography. First, an optimization based on the maximization of peak capacity during the analysis of a bio-oil has been put in place. Pressure, temperature, stationary phase and mobile phase were selected to separate a maximum of peaks (more than a hundred peaks) on the widest possible retention window. Once separation optimized, an experimental work of coupling with the mass spectrometry was carried out first on a single quadrupole then on a time of flight detector with a linear trap (IT-ToF/MS). MS/MS fragmentation experiments were then carried out to propose an identification of the detected species. The reprocessing of the large number of data also required the development of a reprocessing tool adapted to carry out the identification of molecular formulae and to propose developed structures using fragmentation and open-source comparison tools. The last part of this work was devoted to the comparison of the results obtained on a bio-oil by SFC-UV/IT-ToF, GCxGC/ToF and FT-ICR/MS. All of this methodological work has improved our knowledge of this type of SFC-UV/HRMS coupling through application example related to the characterization of ex-biomass complex matrices.

Key words: Supercritical fluid chromatography; Mass spectrometry; Bio-oil; Fast pyrolysis; Complex sample

Adresse du laboratoire: IFP Energies nouvelles – Direction Physique et Analyse - Rond-point de l'échangeur de Solaize - BP 3 - 69360 Solaize - France