



Potentiel du couplage de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle avec l'ICP-MS/MS pour l'analyse de matrices organiques complexes

Marie Bernardin

► To cite this version:

Marie Bernardin. Potentiel du couplage de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle avec l'ICP-MS/MS pour l'analyse de matrices organiques complexes. Chimie analytique. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1220 . tel-02447668

HAL Id: tel-02447668

<https://theses.hal.science/tel-02447668>

Submitted on 21 Jan 2020

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 : 2019LYSE1220

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 05/11/2019, par :
Marie BERNARDIN

Potentiel du couplage de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle avec l'ICP-MS/MS pour l'analyse de matrices organiques complexes

Devant le jury composé de :

Chartier, Frédéric	Directeur de recherche	CEA	Rapporteur
Thiébaud, Didier	Directeur de recherche	ESPCI Paris	Rapporteur
Cardinael, Pascal	Professeur	Université de Rouen	Examineur
Fongarland, Pascal	Professeur	Université de Lyon	Examineur
Le Masle, Agnès	Ingénieure de recherche	IFPEN	Examinatrice
Rouquette, Charlotte	Ingénieure de recherche	Axens	Examinatrice
Heinisch, Sabine	Ingénieure de recherche	Université de Lyon	Directrice de thèse
Bessueille, Frédérique	Ingénieure de recherche	CNRS	Invitée
Lienemann, Charles-Philippe	Ingénieur de recherche	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

Directeur Général 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

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

TITRE en Français : Potentiel du couplage de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle avec l'ICP-MS/MS pour l'analyse de matrices organiques complexes

RESUME en Français : La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle permet d'accéder à une capacité de pics élevée, nécessaire à l'analyse de matrices complexes. Couplée à une détection spécifique comme l'ICP-MS/MS elle permet d'envisager une spéciation élémentaire, qui peut s'avérer d'un grand intérêt dans la recherche de contaminants. Les matrices pétrolières ont été choisies comme cas d'étude dans cette thèse, avec comme contaminants d'intérêts : les espèces soufrées ou encore métallées (vanadium et nickel). La mise en place de ce couplage a nécessité en premier lieu d'évaluer différents systèmes d'introduction de l'échantillon en amont de la détection. La comparaison de nombreux systèmes, au regard de la dispersion qu'ils génèrent, a démontré que seule une minorité d'entre eux était adaptée au couplage, dans la mesure où ils permettaient de conserver la qualité de séparation obtenue en sortie du système LCxLC. Dans un second temps, les conditions de séparation de première et seconde dimension ont été mises au point. Des tests expérimentaux, associés à une étude théorique basée sur une approche Pareto ont permis de sélectionner le couplage répondant au mieux aux critères choisis : une capacité de pics maximale, pour un temps d'analyse raisonnable et un taux de dilution limité. Ainsi, c'est le couplage SECxRPLC-ICP-MS/MS en mode hors ligne qui a été retenu, il offre une capacité de pics théorique de 2600 et permet d'accéder en une seule analyse à une information sur la taille et l'hydrophobie des contaminants détectés spécifiquement. Les conditions de séparation choisies induisent l'introduction de phase mobile organique dans le plasma, avec une composition qui varie au cours de l'analyse réalisée en mode gradient d'élution. Face à ces contraintes pour le maintien du plasma, des solutions permettant d'assurer sa stabilité et de limiter les différences de réponse au cours de l'analyse ont été proposées et évaluées. Enfin, le potentiel du couplage développé au cours de ces travaux a été illustré au travers de l'étude de plusieurs échantillons issus d'unités pilotes et d'origines diverses. Les cartographies bidimensionnelles obtenues sont inédites à ce jour. Elles, démontrent l'intérêt de cette approche pour expliquer le comportement de certaines matrices au sein des unités de raffinage.

TITRE en anglais : Potential of coupling two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS/MS in case of organic complex matrices

RESUME en Anglais : Two-dimensional liquid chromatography provides access to a high peak capacity required for the analysis of complex matrices. Used in combination with a specific detection, such as ICP-MS/MS, two-dimensional liquid chromatography speciation analysis seems to be of great interest in the search of contaminants. Petroleum matrices were chosen as a case study in this thesis, with sulfur, vanadium, and, nickel as contaminants of interest. The implementation of this coupling first required the evaluation of different sample introduction systems prior to the detection. The comparison of those systems, regarding the dispersion they induce, showed that only a minority of them were suitable for this coupling by keeping the quality of the separation. Secondly, the first and second dimension separation conditions were developed. Experimental tests, combined with a theoretical study based on a Pareto approach, made it possible to select the coupling that best meets the following criteria: maximum peak capacity, for a reasonable analysis time and a limited dilution factor. Therefore, it is the SECxRPLC-ICP-MS/MS coupling in offline mode which has been selected, as it offers a theoretical peak capacity of 2600 and allows to have access on both the molecular weight and the hydrophobicity of elements of interest, in a single analysis. The conditions of the separation chosen induce the introduction of organic mobile phase into the plasma, with a composition varying during the analysis time due to an elution gradient mode. Faced with these constraints for maintaining the plasma, solutions to ensure its stability and to limit the differences in sensitivity have been proposed and evaluated. Finally, the potential of the coupling developed during this work was illustrated through the study of several samples from pilot units and from various geographical origins. The 2D-contour plots obtained were never reported until now in the literature. They demonstrate the interest of this approach in explaining the behavior of certain matrices within refining units.

Discipline : Chimie analytique

Mots-Clefs : Chromatographie bidimensionnelle, ICP-MS/MS, spéciation, produits pétroliers, métaux, hétéroatomes

Adresse du laboratoire : Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua, 69100 VILLEURBANNE (France)

PRINCIPALES ABREVIATIONS

¹ D	Première dimension
² D	Seconde dimension
1D-LC	Chromatographie en phase liquide unidimensionnelle
2D-LC	Chromatographie en phase liquide bidimensionnelle
ΔC	Plage de composition en solvant organique du gradient
A	Largeur du pic, du départ jusqu'au milieu du pic, à 10 % de la hauteur
ACN	Acétonitrile
APC	Advanced Polymer Chromatography
b	Pente de gradient dans la relation de Snyder « gradient steepness »
B	Largeur du pic à partir du centre jusqu'à la fin du pic, à 10 % de la hauteur
CAD	Charged Aerosol Detector
CPS	Coup Par Seconde
DAD	Diode Array Detector
DAO	De Asphalted Oil
D_f	Facteur de dilution
DIHEN	Direct Injection Nebulizer High Efficiency
DIN	Direct Injection Nebulizer
D_m	Coefficient de diffusion
EXAFS	Extended X-ray Fine Structure
F	Débit
FTIR	Fourier Transform Infrared spectroscopy
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
FTN	Flow Through Needle
FX	Fluorescence X
GC	Gas Chromatography
GPC	Gel Permeation Chromatography
HDAC7	Conversion des asphaltènes
HDAr, HDCCR	Hydrogénation des cycles aromatiques
HDM	Hydrodémétallation
HDN	Hydrodéazotation
HDS	Hydrodésulfuration
HMI	High Matrix Introduction
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HT	High Temperature
HT-GC	Chromatographie en phase Gazeuse à Haute Température
I	Intensité du signal
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy
IFPEN	Institut Français du Pétrole et Energies Nouvelles
k	Facteur de rétention
k_e	Facteur de rétention à l'élution
L	Longueur de la colonne
LC	Chromatographie Liquide
LC-LC	Chromatographie en phase liquide bidimensionnelle « Heart-cut »
LCxLC	Chromatographie en phase liquide bidimensionnelle « comprehensive »

LDI	Laser Desorption Ionisation
LSS	Linear Solvent Strenght
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MCN	Micro-Concentric Nebulizer
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
Mw	Molecular weight
n_c	Capacité de pics
N	Nombre de plateaux
n_{2D} , effective	Capacité de pics effective en 2D
N_{col}	Nombre de plateaux théoriques de la colonne
NMP	1-méthyl-2-pyrrolidone
NP	Normale Phase
PC ³	Peltier Cyclonic Spray Chamber Cooler
PDA	Photo Diode Array
PEEK	PolyEther Ether Ketone
PFA	PerFluoroAlkoxy
ppm	Partie Par Million
PS	Polystyrène
RA	Résidu Atmosphérique
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RPLC	Reversed-Phase Liquid Chromatography
RSV	Résidu Sous Vide
S	Pente du modèle de rétention
SARA	Saturés, Aromatiques, Résines, Asphaltènes
SEC	Size Exclusion Chromatography
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SIS	Sample Introduction System
TEEA	Thermal Evaporation Assisted Adsorption
THF	Tétrahydrofurane
UHPLC	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra-Violet
VGO	Vacuum Gaz Oil
t_1	Temps de rétention du composé le moins retenu
t_n	Temps de rétention du composé le plus retenu
t_g	Temps de gradient
t_r	Temps de rétention
V_e	Volume exclusion total
V_0	Volume mort
V_i	Volume injecté
$w_{0.1}$	Largeur du pic à 10 % de la hauteur maximum
$w_{0.5}$	Largeur du pic à mi-hauteur
XANES	X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy
Z_{th}	Ratio de split théorique
Z_{mes}	Ratio de split mesuré

ε_e	Porosité externe
ε_t	Porosité totale
α	Facteur de correction due au sous-échantillonnage
β	Facteur de correction du au transfert non idéal
γ	Facteur de correction du à l'espace de séparation
σ	Ecart type en unité de temps σ_t , ou en volume σ_v
σ^2	Variance d'un pic
$\sigma_{detector}^2$	Dispersion liée au détecteur
σ_{ext}^2	Dispersion extra-colonne
$\sigma_{injection}^2$	Dispersion liée à l'injection
σ_{tubing}^2	Dispersion liée aux tubings
σ_{col}^2	Dispersion liée à la colonne

Les exposants 1 et 2 sont utilisés pour indiquer s'il s'agit d'une grandeur de première ou seconde dimension.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 - CONTEXTE ET ETAT DE L'ART.....	5
INTRODUCTION	7
A. <i>Matrices Pétrolières</i>	8
I. Généralités.....	8
II. Composition des pétroles bruts.....	9
III. Fractionnement des pétroles bruts.....	13
IV. Principaux procédés de conversion des fractions lourdes du pétrole	15
V. Difficultés rencontrées dans le cas de la conversion des produits lourds.....	16
VI. Caractérisation chimique des coupes pétrolières lourdes.....	16
VII. Conclusion.....	20
B. <i>Chromatographie liquide bidimensionnelle</i>	21
I. Principe général.....	21
II. Traitement des données	22
III. Aspects théoriques : capacité de pics	24
IV. Mise en place d'analyses bidimensionnelles	26
V. Différents couplages LCxLC pour l'analyse de matrices pétrolières	27
VI. Conclusion.....	30
C. <i>Couplage LC-ICP-MS/MS</i>	31
I. Principe général ICP-MS/MS.....	31
II. Dispersion liée aux systèmes d'introduction	31
III. Contraintes liées à l'introduction de solvants organiques dans le plasma	51
IV. Analyseur Triple quadripôle	56
V. Conclusion.....	57
D. <i>Conclusion</i>	59
REFERENCES	60
OBJECTIFS DE LA THESE	71
OBJECTIFS DE LA THESE	72
CHAPITRE 2 - CONDITIONS EXPERIMENTALES	75
INTRODUCTION	77
A. <i>Appareillage</i>	78
I. Appareillages de chromatographie.....	78
II. Spectromètre de masse à couplage inductif : ICP-MS/MS 8800 (Agilent)	79
B. <i>Phases stationnaires</i>	83
C. <i>Phases mobiles</i>	84
D. <i>Composés d'intérêts</i>	85
I. Solution de parabènes	85
II. Solution multi-élémentaire	85
III. Solution étalon de porphyrine.....	85
IV. Standards de polystyrène.....	85
V. Echantillons réels provenant des coupes lourdes du pétrole	85
E. <i>Outils de calculs et traitement des données</i>	87
I. Optimisation des méthodes LCxLC.....	87
II. Données 1D.....	87
III. Données 2D.....	87
RÉFÉRENCES.....	88

CHAPITRE 3 - OPTIMISATION DE L'INTERFACE DE COUPLAGE LC-ICP-MS/MS	89
INTRODUCTION	91
A. <i>Choix du système d'introduction</i>	92
B. <i>Autres points faibles du couplage</i>	101
I. Té Agilent pour le couplage LC-ICP-MS/MS	101
II. Autres connecteurs pour le couplage LC-ICP-MS/MS	103
III. Etude de l'impact de différents paramètres sur la qualité d'un split	104
CONCLUSIONS	110
REFERENCES	111
CHAPITRE 4 - DEVELOPPEMENT D'ANALYSES BIDIMENSIONNELLES ET APPLICATIONS AUX COUPES LOURDES DU PETROLE	113
INTRODUCTION	115
A. <i>Analyse bidimensionnelle hors-ligne pour les coupes lourdes du pétrole, par SECxRPLC-ICP-MS/MS.....</i>	116
B. <i>Sensibilité du plasma en présence de solvants organiques pour les analyses de spéciation</i>	132
CONCLUSIONS	138
RÉFÉRENCES	139
CHAPITRE 5 - COMPARAISON D'ECHANTILLONS COMPLEXES.....	142
INTRODUCTION	144
A. <i>Comparaison d'échantillons complexes</i>	145
CONCLUSIONS	163
RÉFÉRENCES	164
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	166
ANNEXES	169
ANNEXE 1 : OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE PLASMA DANS UNE SOLUTION ACÉTONITRILE POUR DIFFÉRENTS SYSTÈMES	
D'INTRODUCTION.	170

INTRODUCTION GENERALE

Depuis le début du 21^{ème} siècle, les besoins croissants en énergie de notre société ont fait émerger l'utilisation de nouvelles sources d'hydrocarbures. En parallèle de l'accroissement des énergies renouvelables (éolien, solaire, hydraulique...), les nouveaux types de pétroles dits « *non conventionnels* » restent une source d'énergie intéressante pour les compagnies pétrolières. Ces pétroles « *lourds* », ainsi que les résidus de raffinage, ont donc pour objectif d'être convertis en produits à haute valeur ajoutée, comme des coupes légères (essence ou gazole), au sein des unités de craquage.

Au sein de IFPEN, les équipes travaillent couramment à la valorisation de matrices pétrolières en tant que carburant. Parmi ces mélanges, certains sont très difficiles à caractériser du fait de leurs propriétés (haut point d'ébullition, grande gamme de poids moléculaire, composés hautement polaires...). La technique de caractérisation détaillée employée pour la majorité des analyses des coupes pétrolières est la chromatographie en phase gazeuse (GC). Cependant, cette technique séparative nécessite une volatilité suffisante des échantillons ainsi qu'une faible polarité des molécules. Certains mélanges, tels que les fractions les plus lourdes du pétrole, ne peuvent donc pas être analysés par chromatographie en phase gazeuse. La connaissance de ces coupes reste alors limitée du fait du manque d'outils analytiques exploités pour leur caractérisation. Les contaminants métalliques ou hétéroatomiques contenus dans ces matrices sont nombreux (Ni, V, S...) et peuvent être la cause de multiples problèmes au sein des unités de conversion ou de traitement (empoisonnement des catalyseurs par exemple...). En outre, les spécifications environnementales tendent à se durcir concernant les teneurs en soufre, d'où la nécessité de mieux caractériser les fractions les plus lourdes du pétrole, qui en contiennent jusqu'à plusieurs pourcents.

Pour accéder à l'analyse par spéciation de ces matrices pétrolières, la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle couplée à une détection spécifique comme la spectrométrie de masse à couplage inductif (LCxLC-ICP-MS) a été envisagée dans cette étude. Il a été largement démontré en LCxLC que l'ajout d'une dimension de séparation permet un gain important en capacité de pics par rapport aux analyses unidimensionnelles. Le haut pouvoir de séparation offert par la LCxLC, avec une détection spécifique, telle que l'ICP-MS/MS, permet donc d'envisager une bonne caractérisation des espèces métalliques présentes, sans se limiter à la teneur totale en éléments. Un tel couplage reste, à notre connaissance, inédit à ce jour.

Une description des matrices pétrolières (produits issus des coupes pétrolières lourdes) est proposée dans le chapitre 1, ainsi qu'un état de l'art des contraintes liées au couplage de la chromatographie liquide avec l'ICP-MS/MS et des solutions qui sont proposées.

Ce chapitre détaille les principes théoriques de la chromatographie liquide bidimensionnelle. Après avoir décrit dans le chapitre 2 les conditions expérimentales utilisées dans les différentes études, l'optimisation de l'interface de couplage entre LC et ICP-MS/MS est détaillée dans le chapitre 3. La démarche d'optimisation est fondée sur une méthodologie permettant de quantifier la perte d'efficacité induite par les différentes interfaces envisagées. Ces différentes interfaces, (*système d'introduction d'échantillon* (SIS)) ont ainsi pu être comparées. Ce chapitre a aussi pour objectif d'évaluer l'impact de pièces additionnelles (tés, connectiques...) au montage LCxLC-ICP-MS/MS, et de statuer sur la pertinence de leur utilisation.

La seconde partie du développement instrumental concerne l'optimisation de la partie LCxLC. Elle est décrite dans le chapitre 4. Le choix de deux mécanismes de rétention différents (SEC et RPLC), primordial au vu de la complexité des échantillons (en termes de polarité, solubilité, poids moléculaire...), est discuté dans ce chapitre. La sélection du mode (hors-ligne ou en-ligne) ainsi que la position des deux séparations (SECxRPLC ou RPLCxSEC) sont également discutées. L'introduction de matrices organiques dans les sources plasma est rendu difficile du fait des nombreuses contraintes instrumentales et analytiques qui sont en jeu. Ceci est d'autant plus vrai en gradient d'élution en phase inverse (RPLC) lorsque la composition en solvant organique évolue au cours du temps. Une discussion sur les solutions existantes pouvant pallier ce problème est proposée dans ce chapitre.

Enfin, le chapitre 5 est dédié à l'analyse comparative d'échantillons de provenance diverse, par la méthode développée dans le chapitre 4. En effet, des observations faites par les chercheurs de IFPEN, montrent le caractère réfractaire à la conversion de certaines coupes lourdes. Grâce à la méthode proposée, une tentative est menée dans ce chapitre pour comprendre les comportements des huiles dans les procédés de conversion, et pour les expliquer à l'aide des cartographies 2D (LCxLC-ICP-MS/MS). La connaissance du poids moléculaire et de l'hydrophobie de certaines espèces permet d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues.

Quatre études sont présentées sous forme d'articles scientifiques :

Article 1 (chapitre 1)

“Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 Theoretical and experimental considerations on solute dispersion”

M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. 1565 (2018) 68–80. doi:10.1016/j.chroma.2018.06.024

Article 2 (chapitre 3)

“Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 2 Comparison of Sample Introduction Systems”

M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. (2019), 380-387, doi:10.1016/j.chroma.2019.04.074

Article 3 (chapitre 4)

“Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the characterization of sulfur, vanadium and nickel compounds in petroleum products”

M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. (2019), in press

Article 4 (chapitre 5)

“Speciation of sulfur, vanadium and nickel in heavy crude oils by comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry”

M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Talanta (2019), submitted

Chapitre 1 - CONTEXTE ET ETAT DE L'ART

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

Article 1

“Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 Theoretical and experimental considerations on solute dispersion”

M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. 1565 (2018) 68–80. doi:10.1016/j.chroma.2018.06.024

INTRODUCTION

La chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D) est une technique séparative à très haut pouvoir résolutif. Ce couplage associé à la dimension supplémentaire fournie par la spectrométrie de masse à couplage inductif offre la possibilité de caractériser des échantillons d'une grande complexité à l'échelle élémentaire.

Néanmoins, atteindre le plein potentiel d'une analyse bidimensionnelle avec une détection spécifique est un défi analytique qui requiert la prise en compte des contraintes instrumentales inhérentes à chacune des deux techniques analytiques. La chromatographie liquide bidimensionnelle « compréhensive » est une technique complexe qui nécessite, pour développer correctement des méthodes, d'aborder des équations théoriques et empiriques reliant de nombreuses grandeurs chromatographiques entre elles. Le couplage de LC-2D avec l'ICP-MS/MS dans le cas de matrices organiques pose un certain nombre de problèmes d'un point de vue instrumental, mais permet d'envisager d'obtenir une meilleure caractérisation des matrices d'intérêts, à l'échelle élémentaire.

Ce chapitre présente dans une première partie les matrices qui ont été retenues pour ce développement instrumental et met en lumière les techniques analytiques classiquement utilisées pour leur caractérisation. Une seconde partie est dédiée à la description de la chromatographie liquide bidimensionnelle et à ses rares applications dans le domaine pétrolier. Enfin, une dernière partie est consacrée aux contraintes instrumentales liées à un tel couplage en milieu organique. Une attention particulière est portée sur l'interface entre le système chromatographique et le système de détection, en particulier les dispersions dans l'interface, dans le cas des matrices organiques, étant au vu de la littérature, le point faible des analyses par LC-ICP-MS/MS. D'autre part, l'introduction de solvants organiques dans une source plasma est un défi dans le domaine de la spectrométrie de masse à couplage inductif. Un compromis entre sensibilité, stabilité du plasma et haut pouvoir résolutif, doit donc être trouvé pour l'analyse de mélanges complexes organiques. Les spécificités d'un tel montage seront détaillées dans ce chapitre.

A. MATRICES PETROLIERES

I. GENERALITES

Le pétrole est issu de l'accumulation de sédiments riches en matière organique qui n'ont pas été recyclés par la biosphère. Sous l'effet de la compression, les couches de sédiments formées, appelées kérogène, se transforment en roches qui évoluent en réservoirs de pétrole. L'épaisseur de ces strates sédimentaires augmente et la température s'élève, entraînant ainsi la transformation des matières organiques originelles en hydrocarbures constituées de carbone, d'hydrogène et autres hétéroatomes [1]. Un pétrole brut extrait du sol contient un grand nombre de fractions que l'on peut différencier par leur point d'ébullition.

Le raffinage permet, grâce à une étape de distillation à pression atmosphérique, la séparation des fractions légères d'un pétrole (gaz, essence, kérosène...) qui seront valorisées en tant que carburant après un traitement final adéquat. Le résidu atmosphérique obtenu à l'issue de cette étape peut subir une seconde distillation, dans des conditions de faible pression, afin d'abaisser les températures d'ébullition des composés et ainsi récupérer un maximum de distillat valorisable en carburant après conversion et traitement final. Un résidu sous vide (RSV) est récupéré après cette seconde étape et contient les fractions les plus lourdes du pétrole, notamment les asphaltènes et les résines [2]. Ces deux étapes de distillations sont illustrées de façon schématique sur la Figure 1-1.

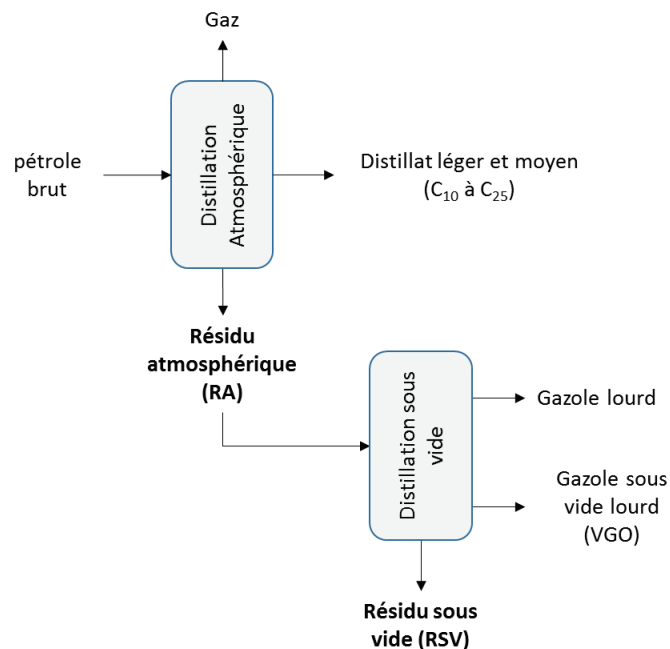


Figure 1-1 : Représentation schématique des étapes de distillation au sein d'une raffinerie

La Figure 1-2 présente les différentes coupes pétrolières existantes en fonction du nombre de carbones et de leur température d'ébullition.

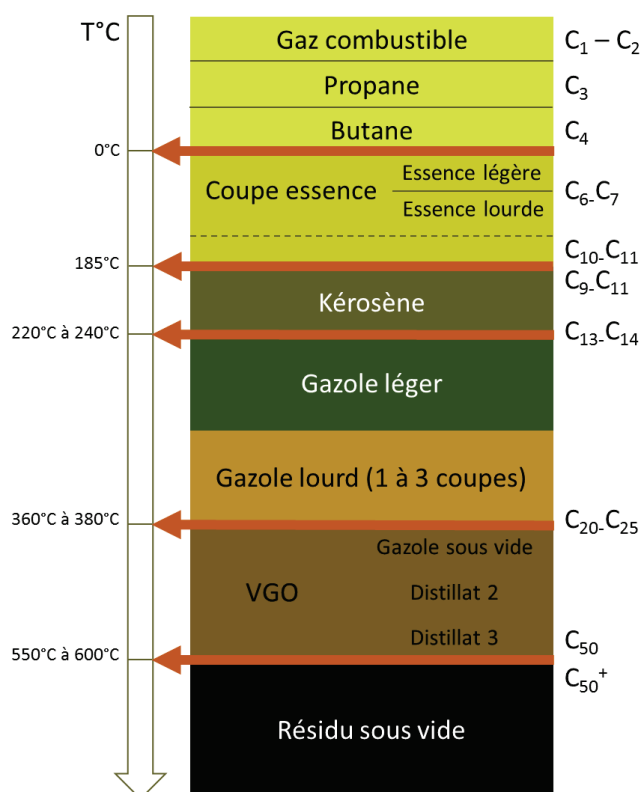


Figure 1-2 : Représentation schématique des différentes coupes pétrolières (adapté de formation IFP Training 2018 – RA DIV-MS18 - Ver1.0)

Les coupes lourdes sont encore assez peu valorisées en carburant étant de loin les plus difficiles à convertir et à purifier dans les pétroles. Elles servent surtout comme combustible (fiouls lourds industriels), comme base pour l'élaboration des bitumes routiers ou encore comme carburant lourd (fioul lourd de soute) pour les navires de gros tonnage. Toutefois, le marché des fiouls lourds industriels se réduit chaque année davantage. Celui des bitumes reste relativement stable, alors que celui des fiouls de soute augmente. Ces coupes lourdes sont appelées à être de plus en plus converties et purifiées dans les années à venir. Néanmoins des contraintes extrêmement sévères sont attendues prochainement concernant la teneur en soufre par exemple.

II. COMPOSITION DES PETROLES BRUTS

À température ambiante, les pétroles bruts sont des mélanges complexes pouvant se présenter sous plusieurs formes : liquide, gazeux, ou solide en fonction du nombre d'atomes de carbone qu'ils contiennent. Ces atomes de carbone s'associent à d'autres atomes conduisant à la formation de composés chimiques diversifiés qu'il est possible de regrouper en différentes familles [3].

1. Hydrocarbures

Ce sont les constituants essentiels des pétroles. Ces molécules ne contiennent que des atomes de carbone et d'hydrogène et se regroupent en plusieurs familles chimiques selon qu'elles contiennent ou non des liaisons doubles, triples ou des noyaux aromatiques. Ces structures sont basées sur la tétravalence de l'atome de carbone. Il est donc possible de différencier les composés saturés pour lesquels toutes les liaisons sont complétées par des atomes d'hydrogène, des composés insaturés qui présentent des liaisons $C=C$ et/ou $C\equiv C$.

1.1. Hydrocarbures saturés

Ils sont constitués d'un ensemble d'atomes de carbone portant chacun de 0 à 3 atomes d'hydrogène. On distingue deux types de molécules : celles constituées d'atomes de carbone saturés par de l'hydrogène (paraffines), et celles cycliques (naphtènes).

Les paraffines peuvent, elles aussi, être divisées en deux catégories : les paraffines normales (n-paraffines) constituées de chaînes linéaires, et les paraffines ramifiées (iso-paraffines) pour lesquelles les atomes de carbone forment des chaînes branchées.

D'autre part, les composés naphténiques se caractérisent par la présence de cycle(s) saturé(s) de 5 ou 6 atomes de carbone formant des cyclopentanes ou des cyclohexanes qui ont la possibilité d'être ramifiés par une chaîne paraffinique elle-même droite ou ramifiée. Il existe aussi la possibilité d'avoir des cycles condensés.

1.2. Hydrocarbures insaturés

Les composés aromatiques ainsi que les oléfines constituent les deux familles d'hydrocarbures insaturés. Les aromatiques comprennent un ou plusieurs cycles benzéniques, appelés hydrocarbures polyaromatiques. Les oléfines sont composées d'atomes en chaîne avec une ou deux doubles liaisons mais il existe aussi des oléfines cycliques. Les oléfines ne sont pas présentes dans le pétrole brut mais on les retrouve dans les procédés de raffinage, particulièrement dans les fractions provenant de procédés de conversion des fractions lourdes, que ces procédés soient thermiques ou catalytiques. Ce sont des matières de base importantes dans la pétrochimie [3].

2. Composés hétéroatomiques

2.1. Composés soufrés

Le soufre est l'un des hétéroéléments le plus répandu dans les pétroles bruts. Les composés soufrés se divisent en quatre groupes : les thiols de formule brute $R-S-H$, les sulfures où ils s'intercalent dans une chaîne ou un cycle saturé $R-S-R'$ voire même les polysulfures de formule brute $R-S\dots-S-R'$ et les thiophéniques pour lesquels le soufre est inséré dans un cycle aromatique (ex : benzothiophène...). La caractérisation de ces produits est nécessaire car ils

sont nocifs pour diverses raisons : odeurs désagréables, production de SO₂ par combustion, empoisonnement des catalyseurs. Un grand nombre de procédés de raffinage, appelés procédés de désulfuration, ont pour objectif d'éliminer ces molécules soufrées qui se trouvent dans les produits pétroliers, jusqu'à plusieurs pourcents.

2.2. Composés oxygénés

Les pétroles bruts comprennent en règle générale, moins d'oxygène que de soufre. Malgré sa faible abondance, l'oxygène participe au caractère acide des pétroles qui leur confère des propriétés corrosives, non souhaitables. Les familles chimiques de composés oxygénés principalement retrouvées dans le pétrole sont les phénols, les furanes et benzofuranes où un cycle oxygéné est condensé à un ou plusieurs cycles aromatiques, et les acides carboxyliques.

2.3. Composés azotés

Ces derniers sont essentiellement présents dans les fractions lourdes du pétrole et en plus faible quantité que les composés soufrés. Ils se retrouvent majoritairement dans les fractions à haut point d'ébullition (>250 °C) tels que les gazoles, distillats/résidus sous vide ou encore les asphaltènes [3]. L'azote peut se trouver sous la forme d'amides saturés ou aromatiques, d'amines, de carbazoles ou encore de pyridines. De manière générale, les propriétés chimiques de ces espèces constituent un obstacle (empoisonnement ou inhibition de catalyseurs) à la conversion catalytique des produits lourds.

2.4. Composés organométalliques

Des éléments métalliques tels que le nickel et le vanadium sont présents dans les fractions lourdes du pétrole jusqu'à quelques centaines de parties par million (ppm). On les retrouve dans les résines et les asphaltènes. Une partie de ces molécules constitue la famille des porphyrines où le motif de base est constitué par un ensemble de quatre cycles pyrroliques, le métal étant chélaté au centre de cet ensemble (Figure 1-3).

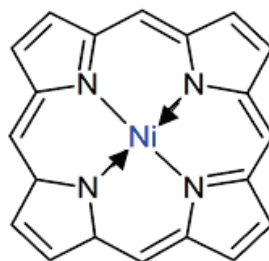


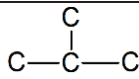
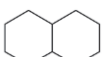
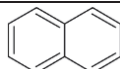
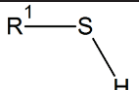
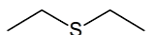
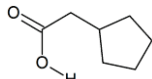
Figure 1-3 : Exemple de composés porphyriniques avec du nickel

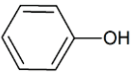
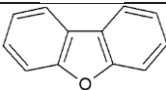
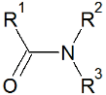
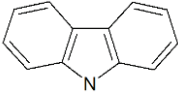
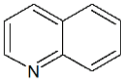
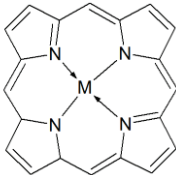
Lorsque le métal central d'une porphyrine est le vanadium, celui-ci se trouve systématiquement sous sa forme oxydée [4]. La présence de ces éléments métalliques dans les fractions lourdes du pétrole a un impact sur les procédés de conversion. En effet, ils sont

en partie responsables de la contamination et de la désactivation des catalyseurs utilisés dans les raffineries [5]. Ils peuvent être responsables par exemple des phénomènes de corrosion par formation de vanadates lors de la combustion. Ils sont aussi responsables du vieillissement des catalyseurs d'hydroconversion et d'hydrotraitement des fractions résiduelles dans la mesure où ils restent sur le catalyseur et recouvrent petit à petit les sites actifs. Ces métaux sont également présents dans des structures autres que porphyriniques qui n'ont pas été identifiées à ce jour. Il a de plus été récemment démontré que les porphyrines métalliques jouaient un rôle important dans l'agrégation des asphaltènes en étant piégées d'une certaine manière par ces molécules à haut poids moléculaire [6].

Le Tableau 1-1 résume les différentes familles de composés chimiques susceptibles de se retrouver dans les pétroles bruts.

Tableau 1-1 : Exemples de structures moléculaires présentes dans les produits pétroliers

Famille	Nom	Structure moléculaire
Hydrocarbures saturés	Méthane	CH ₄
	Ethane	C-C
	n-Butane	C-C-C-C
	Isobutane	
	Cyclopentane	
	Cyclohexane	
	Cyclane	
Hydrocarbures insaturés	Benzène	
	Naphtalène	
	Oléfines	
Composés soufrés	Thiol	
	Sulfure	
	Thiophène	
Composés oxygénés	Acide naphténique	

	Phénol	
	Furane	
	Benzofurane	
Composés azotés	Amide	
	Amines	
	Carbazole	
	Pyridine	
	Quinoléine	
Composés organométalliques	Porphyrine	

III. FRACTIONNEMENT DES PETROLES BRUTS

Les fractions les plus lourdes du pétrole ne sont, à l'heure actuelle, pas décrites avec un détail moléculaire, même si de nombreuses études sont en cours pour caractériser au mieux ces fractions. En raison de la complexité des produits pétroliers lourds, il est courant de les séparer en fonction de leur polarité et de leur solubilité pour obtenir 4 fractions communément appelées «SARA». Ces fractions sont constituées de composés **Saturés**, d'**Aromatiques**, de **Résines** et d'**Asphaltènes**. Les techniques analytiques telles que la chromatographie d'adsorption gravimétrique, la chromatographie en phase liquide haute performance, ou encore la chromatographie sur couche mince sont traditionnellement utilisées pour séparer ces différentes familles chimiques (Figure 1-4) [7].

hétéroatomiques ou non. Un repliement de la construction place les feuillets ou les cycles, selon le type de structure, en empilement dont la cohésion est assurée par les électrons π des doubles liaisons des cycles benzéniques. Finalement, les particules s'associent par attraction dipolaire pour former des agrégats de différentes tailles [10]. De ces agrégats résultent des propriétés comme l'auto-association, la floculation, la sédimentation et la précipitation [9]. Les asphaltènes sont concentrés en hétéroatomes : soufre, azote, nickel et vanadium [10]. Leur teneur est variable en fonction de l'origine des pétroles.

Les asphaltènes peuvent être séparés des autres constituants du pétrole (maltènes) par précipitation dans du n-heptane ou n-hexane en fonction des protocoles utilisés [11]. Les asphaltènes sont définis par leur insolubilité dans un solvant paraffinique donné (n-C₅ ou n-C₇) tandis que les maltènes, à l'inverse, sont définis par leur solubilité dans ce même solvant paraffinique du fait de leur caractère plus apolaire.

IV. PRINCIPAUX PROCÉDES DE CONVERSION DES FRACTIONS LOURDES DU PÉTROLE

Les réserves en pétrole conventionnels sont en nette diminution, un intérêt croissant est donc porté sur les réserves dites « non-conventionnelles » constituées de bruts lourds (originaire du Venezuela ou du Canada par exemple). Dans ces pétroles, la part de coupes lourdes peut atteindre 80 %. Étant donné la complexité de ces coupes, non ou peu distillables, et leur richesse en hétéroéléments et en métaux, des procédés de séparation ont été développés afin de les éliminer ou de les séparer du reste de la matrice d'hydrocarbures. Ils sont divisés en deux catégories : ceux avec rejets de carbone tels que le désasphaltage ou la cokéfaction, et ceux sans rejet de carbone comme les procédés de conversion sous pression d'hydrogène. Les procédés principalement utilisés à IFPEN sont des conversions sous forte pression d'hydrogène, ou hydroconversion.

1. Désasphaltage

Il s'agit d'une technique de séparation des asphaltènes et des maltènes d'un pétrole développée à l'échelle industrielle. Elle consiste à faire précipiter les asphaltènes en utilisant un solvant paraffinique léger (propane C₃, butane C₄, pentane C₅, hexane C₆, heptane C₇) [12]. Selon le nombre de carbone du solvant paraffinique utilisé pour le désasphaltage, on parlera d'asphaltènes C₃, C₄, C₅, C₆ ou C₇. En effet, l'addition d'un tel solvant casse l'équilibre entre les différentes entités asphaltènes (molécules isolées ou agrégats) et le reste de la matrice pétrolière. Ce procédé conduit donc à la formation d'une phase asphalte contenant les asphaltènes, d'une fraction plus ou moins importante, mais notable, des résines les plus polaires, et d'une huile désasphaltée (DAO pour De Asphalted Oil) ne contenant plus d'asphaltènes et formée de composés saturés, aromatiques et résines les moins polaires. Plusieurs paramètres ou conditions opératoires, tels que la nature du solvant utilisé, le ratio

entre le solvant d'extraction, la quantité d'échantillon à désasphalter ou encore le temps de contact, vont avoir une influence sur la séparation des phases asphaltes et des maltènes [13].

2. Procédés d'hydroconversion

Une alternative au procédé présenté précédemment est possible. En effet, la valorisation des fractions pétrolières lourdes ne nécessite pas systématiquement un fractionnement préalable tel que le désasphaltage. Des procédés dits d'hydroconversion/hydrotraitement ont pour objectif de traiter directement des charges de type résidu atmosphérique (RA) ou résidu sous vide (RSV) afin de les rendre valorisables en coupes légères ou de distillats moyens. Ces procédés fonctionnent sous forte pression d'hydrogène et en présence de catalyseurs sulfures adaptés. Ils mettent en jeu des réactions d'hydrosulfuration (HDS), d'hydrosulfatation (HSM), d'hydrosulfonation (HSN), d'hydrosulfonation des cycles aromatiques (HDAr, HDCCR), de conversion des asphaltènes (HDAC7), associés pour les plus convertissant à des réactions de craquage en présence d'hydrogène. Quel que soit le réacteur utilisé, le catalyseur se compose généralement d'oxydes de molybdène, cobalt, nickel ou tungstène sur un support d'alumine, de silice ou d'un mélange alumine/silice, et, est sulfuré pour être actif en hydrotraitement [12,14].

V. *DIFFICULTES RENCONTREES DANS LE CAS DE LA CONVERSION DES PRODUITS LOURDS*

Le choix du procédé de conversion nécessite donc une bonne connaissance de la charge à traiter. Pour déterminer le procédé qui sera le plus adapté à une charge donnée, il est important d'avoir une idée de la teneur en asphaltènes et en métaux de celle-ci. De plus, pour envisager une amélioration des procédés, afin d'augmenter la qualité des produits, la durée de vie des catalyseurs et les taux de conversion, il est indispensable de pouvoir apporter une explication précise au caractère réfractaire à la conversion de certaines charges. Les métaux s'adsorbent sur les catalyseurs en provoquant leur désactivation, une connaissance approfondie des produits métallés pourrait permettre d'expliquer de manière détaillée ce phénomène d'adsorption. Il serait alors possible d'améliorer la technologie des catalyseurs utilisés pour les procédés de conversion. Ce manque de connaissances des fractions lourdes utilisées en tant que charge a conduit à de nombreux développements analytiques [15]. La caractérisation des fractions les plus lourdes (asphaltènes) est particulièrement recherchée ; les espèces métallées, en grande majorité présentes dans ces coupes asphaltènes, sont notamment au centre de beaucoup de projets analytiques [16].

VI. *CARACTERISATION CHIMIQUE DES COUPES PETROLIERES LOURDES*

D'une manière générale, la **chromatographie en phase gazeuse** reste la technique de choix pour l'analyse détaillée des distillats pétroliers. Le développement de la chromatographie en phase gazeuse mono et bidimensionnelle a d'ailleurs permis, grâce à son

haut pouvoir séparatif, d'acquérir une connaissance détaillée des coupes pétrolières légères (essences, kérosènes, gazoles) et une approche par grandes familles pour les coupes pétrolières plus lourdes (distillats sous vide). Cependant, la grande polydispersité en masse moléculaire des coupes lourdes de type RSV, leur faible volatilité (point d'ébullition supérieur à 550°C) et le fait qu'elles contiennent des molécules pouvant s'agréger, limitent l'utilisation des techniques habituellement utilisées. La chromatographie en phase gazeuse [3] ne suffit pas à fournir un détail moléculaire suffisant. Grâce au développement de phases stationnaires résistantes à de très hautes températures, des composés lourds peuvent tout de même être désormais élués en HT-GC. De ce fait, des alcanes linéaires contenant jusqu'à 68 atomes de carbone ($n\text{-C}_{68}$) ont pu être observés à IFPEN lors d'analyses en HT-GC×GC, ainsi que des composés contenant jusqu'à 7 cycles aromatiques tels que le coronène [17].

La **RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire)** peut aussi être utilisée pour obtenir une quantification des différentes macro-familles (saturés et aromatiques) en vue de calculer des ratios C/H aliphatiques et C/H aromatiques, et ce grâce à la RMN du proton. De même, la RMN du carbone permet de distinguer les carbones aromatiques des carbones aliphatiques des fractions pétrolières. Enfin, les fonctions chimiques comprenant des hétéroatomes, notamment des fonctions acides, peuvent être distinguées par RMN [18].

La **Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)** fournit une information sur les fonctions chimiques présentes dans les fractions pétrolières. Grâce à cet outil analytique, il est possible de mettre en évidence des fonctions oxygénées telles que des acides carboxyliques, des phénols, des cétones ou des esters. Pour les produits lourds du pétrole, l'information sur le caractère aromatique et aliphatique, de même que les longueurs et les ramifications des chaînes alkyles, sont aussi déterminées par FTIR. De ce fait, cette technique est complémentaire à la RMN pour la description des fonctions chimiques présentes dans les fractions pétrolières lourdes [19–21].

Afin d'acquérir plus d'informations sur les hétéroéléments majoritairement présents dans les fractions pétrolières lourdes (S, N, Ni et V), des techniques aux **rayons X** ont été largement employées. La technique **XANES (« X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy »)** permet d'étudier la structure électronique de ces hétéroéléments. Elle a permis notamment de mettre en évidence les différentes formes chimiques du soufre présentes dans les asphaltènes (thiophènes, sulfures, sulfones, sulfoxydes), mais aussi de l'azote (structures pyridiniques et pyrroliques) [22,23]. La technique **EXAFS (« Extended X-ray Fine Structure »)** fournit de l'information sur les atomes voisins d'un élément particulier (distances interatomiques avec les voisins et nombre de ses voisins). Elle a permis, avec la technique XANES, de découvrir l'environnement chimique du nickel et du vanadium [50,51]. L'existence de structures porphyriniques a ainsi été mise en évidence. Ces deux techniques démontrent aussi l'existence de structures non porphyriniques, mais dont la nature est toujours inconnue actuellement. La technique **XPS (« X-ray Photoelectron Spectroscopy »)** est une analyse de surface par irradiation qui permet notamment de connaître la composition élémentaire de

matériaux et l'état d'oxydation des éléments détectés. Cette technique est très utile pour apporter une explication aux phénomènes d'adsorption des asphaltènes sur les surfaces métalliques, adsorption qui complique les étapes de production et de transport d'un pétrole lourd [24,25]. L'XPS est aussi utilisé pour déterminer les différentes formes que peut prendre le soufre (sulfures, thiophènes...) dans les produits lourds [26].

La **Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)** est une technique dont le principe est similaire à celui de la RMN, à la différence qu'en RPE, ce sont les spins des électrons qui sont excités et non ceux des noyaux atomiques. Pour être détecté par RPE, un élément doit alors être paramagnétique (posséder au moins un électron non apparié) : il sera donc possible de détecter le vanadium (degré d'oxydation IV) par RPE, mais le nickel ne sera pas détecté dans son degré d'oxydation II (degré d'oxydation au sein des porphyrines). La technique a permis de déterminer l'environnement chimique moyen du vanadium dans les pétroles bruts [27,28].

La **Spectrométrie de masse (MS)** est utilisée dans le but de détecter des composés spécifiquement en fournissant, dans le cas d'une résolution suffisante, leur masse exacte permettant d'accéder à leur formule brute. Elle permet un détail moléculaire que ne permettent pas les techniques citées précédemment. Le choix de la source d'ionisation est l'étape principale de l'optimisation d'une détection par spectrométrie de masse. Afin d'obtenir le maximum d'informations, un analyseur de type FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) est le plus souvent choisi pour sa très grande résolution. Ce type d'analyseur est généralement associé à une source ESI (Electrospray Ionisation) et permet de distinguer plus de 10 000 composés en fournissant leur formule brute [29–31].

La **Fluorescence X (FX)** est largement utilisée dans l'industrie pétrolière pour étudier l'ensemble des produits pétroliers mais aussi pour analyser les catalyseurs. L'échantillon est soumis à un rayonnement X primaire. Sous l'effet de ce rayonnement, des électrons des couches internes sont arrachés. Les « trous » occasionnés par ces départs sont comblés par des électrons venant des couches supérieures. Ce réarrangement électronique s'accompagne d'une émission de rayons X dits secondaires dont les longueurs d'onde sont caractéristiques d'un élément présent. Cette technique est utilisée pour le dosage des métaux tels que le nickel, le vanadium, le fer, ainsi que le plomb [3,32].

La **Combustion** est une technique d'analyse permettant le dosage du soufre du carbone, de l'hydrogène et de l'azote dans les produits pétroliers. La substance à analyser est introduite dans un four chauffé à 1050 °C, balayé par un mélange d'hélium et d'oxygène. Les produits de combustion passent sur un oxydant (Cr_2O_3 , Co_3O_4 ...) où ils sont alors transformés en CO_2 , H_2O et oxydes d'azote NO_x , puis entraînés par le gaz inerte. Le mélange passe sur du cuivre chauffé à 650°C qui va réduire les NO_x en N_2 . Les gaz sont ensuite séparés par une colonne de chromatographie gazeuse équipée d'un détecteur catharométrique. D'autres techniques d'analyse peuvent se substituer à la chromatographie gazeuse, comme la

gravimétrie après absorption sur différents pièges [3]. L'analyse par combustion des produits soufrés peut aussi être réalisée sur les produits pétroliers. L'échantillon est pyrolysé dans un courant d'oxygène-azote (80/20) vers 1050-1110 °C, les gaz de combustion peuvent être dosés par iodométrie, ou encore par fluorescence UV [3].

Enfin, l'**ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)** est une technique d'analyse élémentaire employée pour l'analyse des fractions pétrolières. Dans ce cas, les molécules de l'échantillon sont dans un premier temps atomisées, puis excitées, et enfin ionisées grâce à un plasma d'argon à 8000 °C. L'ICP-MS permet de détecter et quantifier les isotopes des éléments présents dans la matrice étudiée. Cette technique a été employée pour l'analyse des métaux tels que le vanadium et le nickel pour des fractions lourdes du pétrole [11]. Cette technique de détection peut être accompagnée d'une méthode de séparation en amont comme **la chromatographie d'exclusion stérique (SEC ou GPC)**, permettant de séparer les espèces en fonction de leur masse moléculaire. Ces analyses sont appelées, analyses de « spéciation » et permettent d'obtenir des informations en fonction des différentes formes chimiques d'un élément, dans un environnement donné [33]. Ce type d'analyses réalisées avec une seule dimension de séparation est le plus souvent employé pour accéder à l'analyse de spéciation élémentaire des éléments Ni et V [34–39]. En raison de la grande complexité de ces matrices, des études sont d'autre part consacrées à la simplification des coupes lourdes en amont des analyses de GPC [40] et ce par extraction liquide-liquide par exemple. Enfin, trois revues ont été publiées à ce jour concernant les analyses de spéciation réalisées sur les produits pétroliers lourds [11,16,41]. Au vu de ces études, il s'avère que certains auteurs utilisent deux dimensions de séparation en amont de la détection ICP-MS. **La chromatographie à polarité de phase normale (NP)**, sur phase stationnaire silice, est utilisée par *Caumette et al.* [42] pour apporter une dimension de séparation supplémentaire à la GPC. La phase normale est choisie ici pour permettre la solubilisation des matrices dans la phase mobile, un gradient de solvant xylène/THF est réalisé. La chromatographie d'exclusion stérique n'est pas le seul mécanisme de rétention employé pour l'analyse des constituants du pétrole. C.B. Duyck et al. [43] et F.G. Wandekoken et al. [44] se sont intéressés au couplage unidimensionnel de **la chromatographie à polarité de phases inversées (RPLC)** avec l'ICP-MS, pour l'analyse de structures porphyriniques dans le cas du vanadium et/ou du nickel. Pour cela une phase stationnaire silice greffée C₁₈ est employée, communément à ces deux articles. En revanche, les phases mobiles utilisées diffèrent quelque peu. Elles sont respectivement composées d'un mélange méthanol/chloroforme ou encore d'un mélange méthanol/toluène.

Toutefois, ces caractérisations semblent insuffisantes pour comprendre au mieux les comportements de ces matrices au sein des unités de raffinage. En effet, les profils SEC seuls ne permettent pas d'expliquer pourquoi certaines matrices sont plus difficiles à convertir que d'autres, une dimension de séparation additionnelle pourrait permettre de mieux comprendre les phénomènes présents au sein des unités de conversion et de lever un certain nombre de verrous analytiques.

VII. CONCLUSION

Les produits pétroliers sont donc des matrices d'une grande complexité de par le nombre de molécules qui les composent. Ainsi, du fait de leurs propriétés chimiques et physiques, les outils analytiques qui peuvent être utilisés pour caractériser ces coupes lourdes ne permettent pas actuellement d'obtenir le détail moléculaire et élémentaire souhaité. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils possédant un grand pouvoir de séparation. Au vu de la littérature, le couplage unidimensionnelle SEC-ICP-MS/MS est largement utilisé pour la caractérisation des fractions lourdes du pétrole d'un point de vue élémentaire, mais ne permet pas d'obtenir une vision complète des espèces présentes dans ces matrices. La chromatographie liquide bidimensionnelle apparaît être une technique de choix qui pourrait permettre de lever un certain nombre de verrous analytiques. Le couplage avec une détection ICP-MS/MS va permettre d'obtenir des informations à l'échelle élémentaire concernant les éléments soufre, vanadium et nickel, responsables d'un certain nombre de problèmes au sein des unités de raffinage. Ainsi le développement de la chromatographie liquide bidimensionnelle couplée à l'ICP-MS/MS est envisagé, cette technique pouvant s'adapter à la grande complexité des matrices d'intérêts. Les points d'attention d'un tel couplage sont détaillés dans la suite de ce chapitre : (i) mise en place de l'analyse bidimensionnelle, (ii) interface de couplage entre la LC et l'ICP-MS/MS dans le cas des matrices organiques, et enfin (ii) utilisation d'un analyseur triple quadripôle ICP-MS/MS.

B. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE

I. PRINCIPE GENERAL

En chromatographie en phase liquide unidimensionnelle, on ne peut guère espérer séparer plus de 200 à 500 pics [45,46]. Il faut noter que ce nombre important ne peut être atteint qu'avec des phases stationnaires et des phases mobiles possédant un haut pouvoir résolutif pour les composés à séparer et au prix d'une durée d'analyse significative (de quelques heures à quelques dizaines d'heures), en utilisant des colonnes très longues [47]. Ces performances ne sont pas suffisantes pour des mélanges très complexes tels que ceux que nous souhaitons étudier (pouvant contenir plus de 40 atomes de carbones [48]). La mise en place d'une séparation bidimensionnelle permet d'augmenter le nombre de pics qu'il est possible de séparer pour un temps d'analyse donné. La chromatographie liquide bidimensionnelle permet d'effectuer deux séparations successives d'un même échantillon. Un changement de sélectivité entre les deux dimensions permet de séparer en seconde dimension des composés qui coéluent dans la première dimension.

Il existe plusieurs modes possibles en chromatographie bidimensionnelles, chacun présentant des avantages et des inconvénients. Avec le mode « **heart-cutting** », noté LC-LC, une seule fraction de l'échantillon est injectée dans la deuxième dimension. Cette approche est adaptée lorsqu'un groupe spécifique de composés doit être analysé. Il permet d'éviter d'envoyer dans le détecteur le reste de la matrice [49].

En revanche, quand l'objectif de l'analyse est de caractériser la totalité d'un échantillon, le couplage bidimensionnel de type « **comprehensive** » sera plus adapté. Dans cette configuration, notée LCxLC, tous les constituants du mélange traversent les deux dimensions de séparation. L'intégralité du flux sortant de la première dimension sera réinjectée par tranches successives pour subir une seconde séparation sur la deuxième dimension. Ainsi, du fait des mélanges très complexes à analyser et dont la connaissance reste limitée, un tel système est à privilégier pour les problématiques des produits pétroliers lourds. Par la suite, nous nous intéresserons essentiellement à la chromatographie liquide bidimensionnelle comprehensive pour maximiser le pouvoir de séparation.

Un système multidimensionnel est dit **hors-ligne (off-line)**, lorsque les deux dimensions de l'analyse bidimensionnelle sont réalisées de manière indépendante. Dans ce cas, l'effluent de la première colonne est collecté en un nombre variable de fractions, selon la vitesse de collecte. Puis les fractions sont injectées indépendamment dans la seconde dimension. Avec ce type d'analyse il existe un risque de contamination ou de perte de l'échantillon et les temps d'analyses sont relativement longs, en revanche les capacités de pics obtenues peuvent être très élevées [50].

Au contraire, un système multidimensionnel est dit **en-ligne (on-line)**, lorsque le transfert de l'effluent de la première dimension vers la seconde dimension se fait avec une modulation en continu. Entre les deux colonnes des deux dimensions se trouve une interface permettant ce transfert, comme le montre la Figure 1-5. Un tel système est complètement automatisé et permet donc des analyses dans un temps relativement court en comparaison du mode hors-ligne.

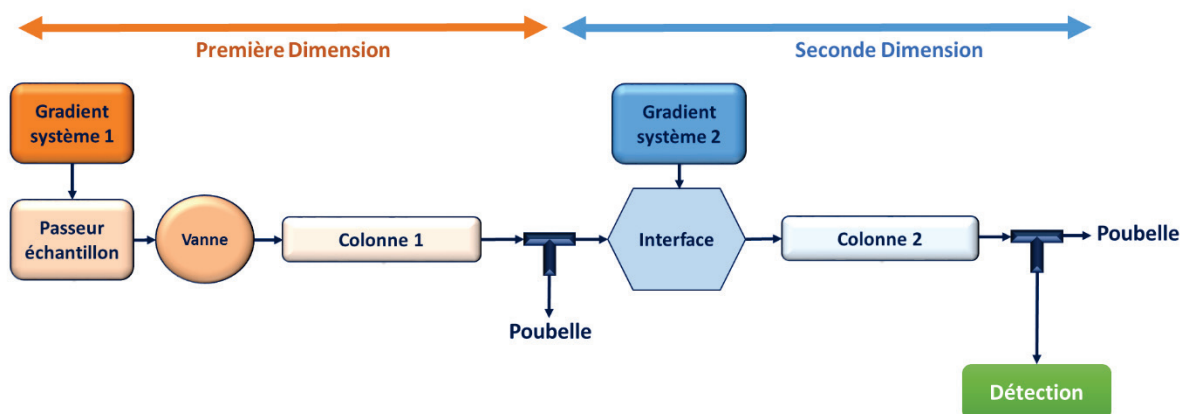


Figure 1-5 : Schéma de l'instrumentation en chromatographie liquide bidimensionnelle en-ligne

II. TRAITEMENT DES DONNEES

Le traitement des données est un défi, car une analyse bidimensionnelle génère une quantité importante de données, ce à quoi se rajoute en général, la troisième dimension apportée par la détection [51].

1. Prétraitement des données

En mode en-ligne, la première dimension est échantillonnée et chacune des fractions est analysée dans les conditions de la deuxième dimension, en un temps égal au temps d'échantillonnage. Un long chromatogramme est généralement obtenu à l'issue de la seconde dimension. Celui-ci est découpé en autant de chromatogrammes qu'il y a de fractions [51]. En revanche, dans le cas d'analyses bidimensionnelles hors-ligne, l'analyse de chaque fraction de seconde dimension donne lieu à un seul chromatogramme, la reconstitution d'une matrice de données est donc possible pour permettre l'exploitation des résultats.

S'ensuit une étape de transformation de la représentation graphique dans le but d'aligner les chromatogrammes de toutes les fractions pour faciliter la visualisation en 2D. Cette étape consiste en l'alignement des temps de rétention. En effet, il existe en chromatographie, des décalages incontrôlés qui peuvent être dus à des variations de température, de pression, ou encore à des effets de matrice [51]. Ce phénomène est d'autant plus vrai qu'il peut avoir lieu dans chacune des deux dimensions. Dans le cas de certains systèmes commerciaux, s'ajoutent à ceci, des décalages contrôlés qui sont eux, liés à

d'éventuels chemins additionnels présents au niveau de l'interface entre les deux dimensions [51]. Vient ensuite l'étape d'affectation des pics de deuxième dimension à un pic de première dimension. En effet, de par l'échantillonnage des pics de première dimension, plusieurs pics de seconde dimension correspondent au même composé et doivent être regroupés pour permettre l'exploitation des données [52,53]. Enfin, la correction du bruit de fond est nécessaire lors du prétraitement, afin d'améliorer la représentation finale. En effet, certains phénomènes peuvent venir perturber la ligne de base des chromatogrammes de seconde dimension comme :

- le changement d'indice de réfraction du milieu, lié à l'introduction du solvant de la seconde dimension qui va former un pic très intense en début de chromatogramme dans le cas d'un de l'utilisation d'un détecteur UV [54],
- l'utilisation des gradients qui vont provoquer une dérive de la ligne de base [51],
- un retour rapide aux conditions initiales qui va perturber le signal.

Très peu de logiciels dédiés au retraitement des données sont commercialement disponibles. De plus, les logiciels comme LC-Image (Zoex) ne permettent pas toujours de traiter les données comme souhaité, et les laboratoires qui réalisent ce type d'analyses ont souvent dû développer leur propre logiciel de retraitement, via le plus souvent l'utilisation de Matlab.

2. Représentation des données

La matrice de données obtenue permet, après retraitement, de visualiser les chromatogrammes sous deux formes différentes :

- tracé de contour en 2D : les axes d'abscisses et d'ordonnées représentent le temps dans chacune des dimensions de la séparation, la couleur des tâches représente l'intensité des pics (Figure 1-6),

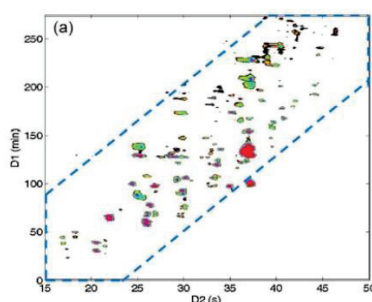


Figure 1-6 : Visualisation des données obtenues en 2D-LC en 2D (adapté de [55])

- tracé en 3D : les abscisses et les ordonnées représentent le temps dans chacune des dimensions, un troisième axe vertical représente l'intensité du signal (Figure 1-7).

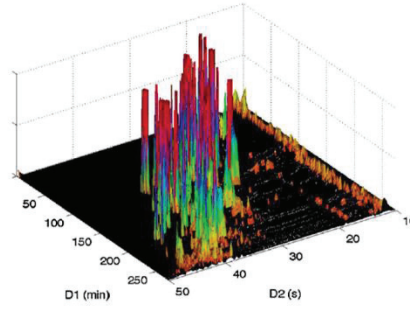


Figure 1-7 : Visualisation des données obtenues en 2D-LC en 3D (adapté de [55])

III. ASPECTS THEORIQUES : CAPACITE DE PICS

Historiquement, la capacité de pics a été introduite par Giddings [56], comme le nombre de pics, qui peuvent être placés côte à côte entre le premier pic (souvent représenté par le temps mort, t_0) et le dernier pic d'intérêt, avec une résolution constante. Cette résolution est généralement fixée à 1 ce qui correspond à un écart de 4σ entre les temps de rétention pour deux pics gaussiens. La capacité de pics d'un échantillon, n_c , telle qu'elle a été définie par Dolan [57], est donnée par la relation [58] :

$$n_c = 1 + \int_{t_1}^{t_n} \frac{1}{4\sigma} dt \quad (1)$$

Avec, t_1 et t_n , respectivement les temps de rétention du composé le moins retenu et du plus retenu, et σ l'écart type en unité de temps.

Dans le cas de séparations effectuées en isocratique, σ n'est pas constant et varie selon l'équation suivante [59] :

$$\sigma = \frac{t}{\sqrt{N}} \quad (2)$$

Le nombre de plateaux, N , est supposé constant tout au long du chromatogramme et l'équation (1) devient [59] :

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \int_{t_1}^{t_n} \frac{1}{t} dt = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln\left(\frac{t_n}{t_1}\right) \quad (3)$$

Dans le cas de séparations effectuées en mode gradient, une solution possible à l'équation générale (1) existe dans le cas où le gradient suit le modèle LSS (« Linear Solvent Strength ») développé par Snyder [60]. Dans ce cas précis la capacité de pics devient [61] :

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{1}{2.3b + 1} \cdot \ln \left(\frac{2.3b + 1}{2.3b} \cdot e^{2.3S\Delta C_e} - \frac{1}{2.3b} \right) \quad (4)$$

Où ΔC_e est la gamme de composition en solvant organique à l'élution, N est le nombre de plateaux théoriques, S est la pente du modèle de rétention, et le paramètre b est la pente du modèle LSS donné par [60] :

$$b = S \cdot \frac{\Delta C}{t_G} \cdot t_0 \quad (5)$$

t_G étant la durée de la montée linéaire du gradient et t_0 le temps mort de la colonne. ΔC étant la plage de composition du gradient linéaire.

En théorie la capacité de pics pour un système bidimensionnel est donnée par le produit des capacités de pics des deux dimensions :

$$n_{théorique} = {}^1n \cdot {}^2n \quad (6)$$

Où 1n et 2n sont respectivement les capacités de pics des dimensions 1 et 2.

Cette équation théorique suppose que la totalité de l'espace de séparation est accessible aux composés analysés, qu'il n'y a pas de perte de séparation ni en première dimension du fait du sous-échantillonnage, ni en deuxième dimension du fait de l'élargissement possible des pics avec l'injection de larges volumes. Cependant, ces conditions ne sont jamais totalement respectées. C'est pourquoi, pour se rapprocher de la réalité, 3 facteurs de correction sont à prendre en considération :

- (i) α : facteur de correction de la capacité de pics de première dimension prenant en compte le sous-échantillonnage des pics. Dans le cas d'une analyse bidimensionnelle en-ligne, l'interface entre les deux dimensions est constituée d'une vanne multiport. Ces vannes sont équipées de 2 boucles identiques qui assurent un transfert continu de la première dimension à la seconde dimension. Si l'on veut maintenir la résolution obtenue en première dimension, un certain nombre de fractions doivent être collectées pour chaque pic de première dimension. Trois fractions par pics permettent de conserver 75 % de la capacité de pics de première dimension. Le facteur de correction, α , lié à la fréquence d'échantillonnage, tend vers 1 au-delà de 3 fractions [62]. Dans le cas d'une analyse bidimensionnelle hors-ligne, α peut-être proche de 1. En effet, le temps d'analyse de seconde dimension n'est pas lié au temps de première dimension, les deux séparations n'étant pas effectuées consécutivement. Le nombre de fractions peut donc être suffisamment élevé pour ne pas affecter la capacité de pics théorique au détriment du nombre de runs qui lui peut devenir très important.

- (ii) β : facteur de correction de la capacité de pics de seconde dimension prenant en compte l'élargissement des pics en général, majoritairement dû aux effets à l'injection. Étant donné les contraintes liées au dimensionnement du système bidimensionnel lorsque le couplage est réalisé en-ligne, des volumes importants sont souvent injectés en seconde dimension. La différence de force éluante entre les deux dimensions doit être contrôlée pour éviter des élargissements voire des dédoublements de pics, dans le cas où la phase mobile de première dimension est constituée de solvants forts par rapport à la seconde dimension [63]. Dans le cas d'un couplage hors-ligne, les effets à l'injection, et donc l'impact de β , peuvent être minimisés (β proche de 1). En effet, il est tout à fait possible de retraiter les fractions entre les deux dimensions et donc de s'affranchir des incompatibilités de solvants.
- (iii) γ : facteur de correction prenant en compte l'occupation de l'espace de séparation 2D. Ce terme dépend de la sélectivité des deux dimensions mises en jeu et est fonction de la gamme de composition dans la deuxième dimension [64].

Ces 3 facteurs α , β , γ , sont compris entre 0 et 1. La capacité de pics effective est donc [61] :

$$n_{2D, effective} = \alpha \cdot (1 - \gamma) \cdot n_1 + \alpha \cdot \beta \cdot \gamma \cdot n_1 \cdot n_2 \quad (7)$$

Sous certaines conditions (γ proche de 1), la relation précédente (7) peut être simplifiée de la façon suivante :

$$n_{2D, effective} = \alpha \cdot \beta \cdot \gamma \cdot n_1 \cdot n_2 \quad (8)$$

IV. MISE EN PLACE D'ANALYSES BIDIMENSIONNELLES

1. Séparation rapide en deuxième dimension

Dans le cas d'un couplage hors-ligne, les analyses de première et seconde dimensions sont décorréliées, il n'y a donc aucune contrainte sur le temps d'analyse de seconde dimension. En revanche, il est important de minimiser le temps d'analyse totale pour éviter des analyses trop consommatrices en solvant et peu applicables au domaine industriel.

En revanche, lorsque le couplage des deux dimensions est effectué en-ligne, les séparations de seconde dimension doivent être réalisées en un temps très court. En effet, le temps d'analyse de seconde dimension correspond au temps de fractionnement de première dimension. La diminution du temps d'analyse va permettre de réduire le volume injecté et de maximiser la capacité de pics par unité de temps, en évitant un élargissement de pics liés aux effets à l'injection. Le volume injecté peut être adapté en fonction du diamètre de colonne de

première dimension ou à l'aide d'un split entre les deux dimensions. Les techniques **UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)** combinées avec la haute température **HT-UPLC (High Temperature Liquid Chromatography)** permettent de réduire les temps d'analyse tout en maintenant la capacité de pics [65]. En effet, l'utilisation d'appareils UHPLC permet d'atteindre des pressions plus importantes par rapport à des systèmes conventionnels (1200 bar contre 400 bar en HPLC) et donc d'utiliser des particules de faible diamètre (sub 2 μm) pour un gain en efficacité à des débits élevés de phases mobiles. L'utilisation des hautes températures en HTLC réduit la viscosité de la phase mobile et donc augmente les coefficients de diffusion, permettant ainsi de travailler avec des débits plus élevés sans perte d'efficacité.

2. Dimensionnement des analyses bidimensionnelles

Lors de l'optimisation d'une analyse 2D, les objectifs sont de maximiser le pouvoir de séparation, tout en minimisant le temps d'analyse, et la limite de détection. Dans le cas des analyses bidimensionnelles hors-ligne, le dimensionnement des deux dimensions de séparation est fait de façon indépendante. En revanche, dans le cas d'analyse en-ligne un certain nombre de paramètres sont à prendre en considération (longueur de colonne, diamètre de particules, température, ratio de split, etc...). En effet, ces différents paramètres étant liés les uns aux autres, le développement de méthodes est beaucoup plus complexe [66]. Le choix des conditions chromatographiques doit donc être fait en veillant à trouver un optimum à ces trois descripteurs. Pour faciliter l'optimisation, plusieurs approches ont été décrites dans la littérature. Le dimensionnement peut alors se baser sur les courbes de Poppe en ¹D [67] ou encore sur une méthode Pareto [66,68]. Cette dernière approche s'adapte à des optimisations simultanées de différents paramètres et est plus générale.

V. DIFFERENTS COUPLAGES LCxLC POUR L'ANALYSE DE MATRICES PETROLIERES

La chromatographie bidimensionnelle en phase gazeuse est majoritairement employée pour l'analyse des matrices pétrolières [69,70]. En revanche, certains auteurs s'intéressent depuis peu au potentiel de la chromatographie liquide bidimensionnelle pour l'analyse des fractions lourdes du pétrole ou pour l'analyse de composés à haut poids moléculaire [71]. Plusieurs types de couplage sont décrits dans la littérature.

1. Couplage RPLCxRPLC

La chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC) utilise une phase stationnaire apolaire (par exemple une colonne de silice greffée C₁₈ ou C₈) et une phase mobile polaire (contenant le plus souvent de l'eau et un solvant organique). Ce type de couplage présente de nombreux avantages :

- pas d'incompatibilité de solvants entre les deux dimensions,

- une modification du solvant de phase mobile suffit parfois à obtenir une orthogonalité de séparation intéressante, sans changer les phases stationnaires entre la première et la seconde dimension [72],
- un très grand nombre de phases stationnaires commercialement disponibles,
- des mécanismes de rétention connus et prédictibles notamment grâce au modèle LSS.

Ce type de couplage a été récemment utilisé, par *Schoenmakers et al.* [73], pour l'analyse moléculaire d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou encore pour l'analyse des fractions maltènes du pétrole. Des phases stationnaires cyanopropyl et silice greffées C₁₈ ont été utilisées comme première et seconde dimension respectivement pour l'analyse de standards HAP, alors que dans le cas de l'analyse des maltènes, la première dimension de séparation est remplacée par une colonne biphenyl. La détection des composés est effectuée à l'aide d'un détecteur UV et d'un CAD. Au vu de la méthode développée dans ces travaux, et comme le montre la Figure 1-8, aucun pic n'a pu être séparé, mais les enveloppes obtenues sur les contours plots 2D sont comparées pour chacune des fractions aromatiques, saturés et résines.

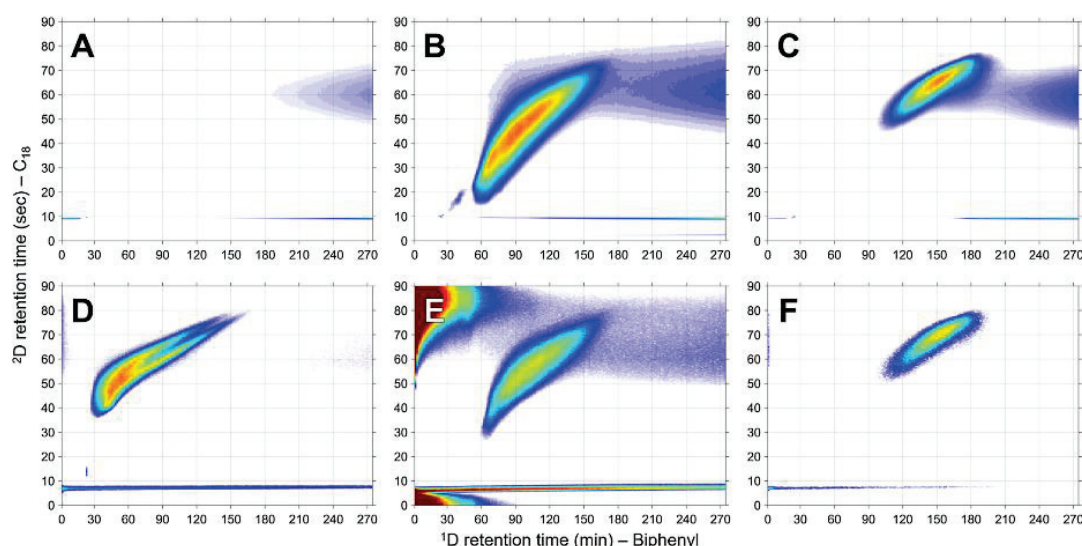


Figure 1-8 : Analyse LCxLC-UV pour la séparation de (A) fraction saturé, (B) fraction aromatique et (C) fraction résine, obtenues à 340 nm et analyse LCxLC-CAD pour la séparation de (D) fraction saturé, (E) fraction aromatique et (F) fraction résine [73].

2. Couplage NPLCxNPLC

En 2010, le potentiel du couplage NPLCxNPLC a été envisagé pour des molécules modèles soufrées, azotées ou encore oxygénées, contenues dans les pétroles (pyrroles, pyridine, sulfure, thiophène, furane...) [74]. Les différences de sélectivité de trois colonnes Hypercrosslinked (5-HGN, HC-C₈ et HC-Tol) sont évaluées par les auteurs. Les structures des phases stationnaires HC-C₈ et HC-Tol utilisées sont représentées Figure 1-9. Les phases mobiles utilisées sont composées de 25 % de dichlorométhane dans un solvant hexane.

Aucune analyse bidimensionnelle sur échantillon réel n'est abordée dans ces travaux, seule la modélisation des facteurs de rétention des standards, pour chacune des phases stationnaires utilisées, est discutée.

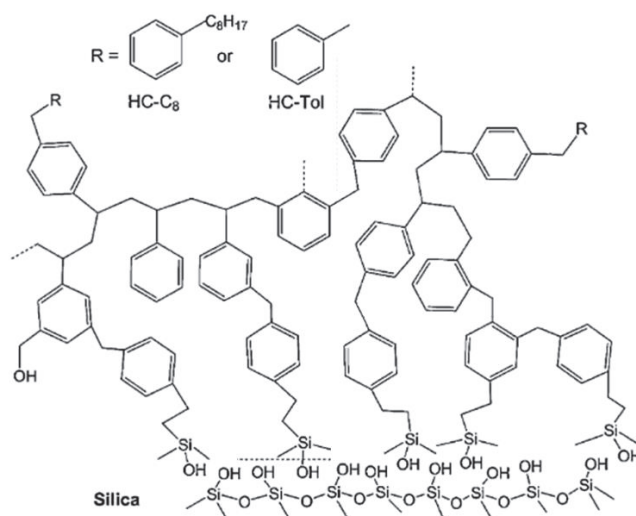


Figure 1-9 : Structure des phases stationnaires des colonnes HC-C₈ et HC-Tol (adapté de [74])

3. Couplage SECxRPLC ou RPLCxSEC

En chromatographie d'exclusion stérique (SEC), les composés d'un mélange sont séparés en fonction de leur taille. La séparation est basée sur le trajet plus ou moins court que les molécules empruntent à travers les pores de la colonne : ainsi plus une molécule est petite, plus son trajet sera long, donc plus son temps d'élution sera grand. À priori, aucune rétention des composés sur la phase stationnaire n'est mise en jeu. Il arrive toutefois que certaines molécules d'un mélange s'adsorbent sur la phase stationnaire, ce qui représente une des difficultés de la SEC [75]. Cette technique est généralement couplée à un mécanisme de séparation en phase inverse et peut être utilisée en première ou en seconde dimension [76]. La chromatographie d'exclusion stérique a également été couplée à un mécanisme de séparation en phase normale, en mode en-ligne, dans le cas de l'analyse de polymères par exemple [76] (Figure 1-10). Dans ce cas précis, il est possible d'observer une diagonalisation des polystyrènes (PS) alors que les polystyrènes composés de groupe hydroxyle (PS-OH) eux ne sont pas diagonalisés et sont séparés grâce à la phase normale.

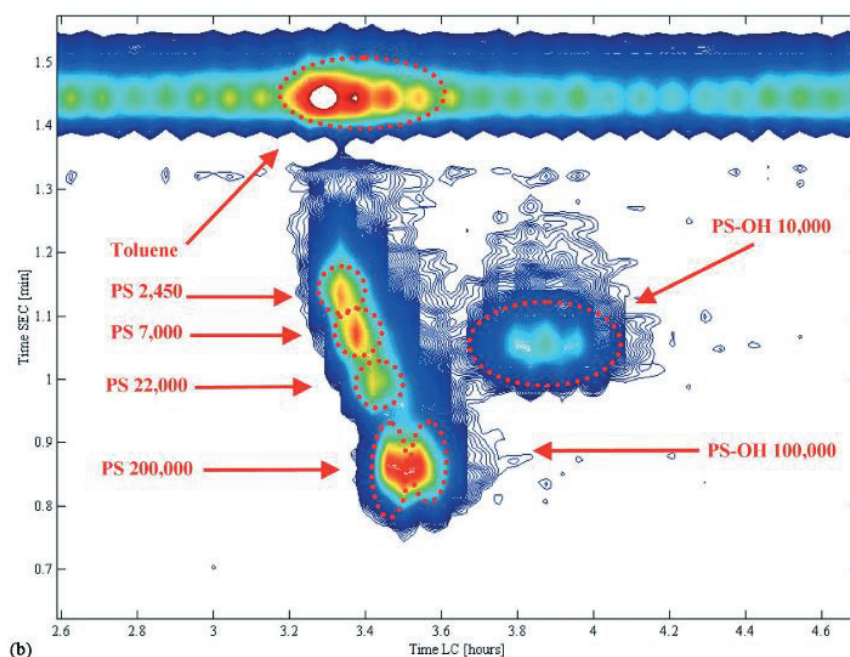


Figure 1-10 : Analyse NPxSEC obtenue sur un mélange standard de polymères PS ($M_w = 2450 ; 7000 ; 22\,000 ; 200\,000$) et PS-OH ($M_w = 10\,000$ et $100\,000$) dans des conditions critiques pour PS. μ LC-colonne : 250×1.0 mm I.D. $3\,\mu\text{m}$; $120\,\text{\AA}$ silice vierge ; 42/58 % THF-hexane $4\,\mu\text{L}/\text{min}$ ($55\,^\circ\text{C}$). SEC colonne : 75×4.6 mm I.D. Mixed-C; 100 % THF $0.6\,\text{mL}/\text{min}$ [76]

VI. CONCLUSION

L'engouement récent pour la LC $\times$ LC, s'explique par son gain en pouvoir de séparation comparé aux analyses unidimensionnelles. Au vu de la littérature, les dimensions de séparation envisageables pour l'analyse de produits pétroliers lourds sont la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et la chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC) et ce en mode hors-ligne ou en-ligne. Dans le cas du mode hors-ligne, même si ces analyses sont généralement plus longues et difficiles à introduire dans un contexte industriel, car non automatisées, les deux dimensions peuvent être optimisées de façon indépendante pour obtenir une capacité de pics très élevée ce qui rend le développement de méthode accessible, sans outil dédié. En revanche, ce mode présente un risque de contamination des fractions entre les deux dimensions ou encore une perte de l'échantillon. D'autre part, en mode en-ligne de nombreux paramètres sont à optimiser et nécessitent l'utilisation d'outils prédictifs [66], dans le but de maximiser la capacité de pics tout en minimisant la durée de l'analyse et le facteur de dilution. Au vu de l'état de l'art réalisé, il s'avère que très peu d'études sont reportées dans le cas de l'analyse de coupes lourdes du pétrole par chromatographie liquide bidimensionnelle.

Enfin, le couplage de la chromatographie liquide bidimensionnelle avec une détection spécifique est un couplage inédit à ce jour. Les contraintes instrumentales ainsi que le système de détection envisagé pour un tel couplage sont détaillés dans la suite de ce chapitre.

C. COUPLAGE LC-ICP-MS/MS

I. PRINCIPE GENERAL ICP-MS/MS

La spectrométrie de masse à couplage inductif (ICP-MS) est une technique d'analyse inorganique permettant l'atomisation, l'excitation et l'ionisation des espèces présentes, à l'aide d'un plasma induit à haute fréquence. Le système d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS est constitué d'un nébuliseur et d'une chambre de nébulisation. Le nébuliseur transforme l'échantillon qui est sous forme liquide en sortie de colonne en un aérosol dense, composé de très fines gouttelettes. La chambre de nébulisation quant à elle limite la charge en solvant dans le plasma et pour cela homogénéise l'aérosol formé, en limitant la taille des gouttelettes et en réduisant la vitesse de l'aérosol. La source d'ionisation fonctionnant à pression atmosphérique et à température élevée et le quadripôle fonctionnant sous vide et à température ambiante, une interface constituée de deux cônes successifs est nécessaire. Enfin, un système de lentille focalise les ions à l'entrée du quadripôle. Les ions sont filtrés en fonction de leur rapport masse/charge et sont ensuite détectés.

II. DISPERSION LIEE AUX SYSTEMES D'INTRODUCTION

Les systèmes d'introduction d'échantillon dans l'ICP-MS commercialement disponibles sont nombreux sur le marché. Une étude approfondie a été menée sur les nébuliseurs et chambres de nébulisation constituant l'interface de couplage, en mode hydro-organique. L'objectif de ces travaux est d'évaluer la perte d'efficacité que peuvent générer de tels montages. 55 publications (de 1997 à 2017) ont servi de point de comparaison pour le couplage LC-ICP-MS.

Cette partie fait l'objet d'une publication publiée dans le journal *Journal of Chromatography A (JCA)*.

“Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 Theoretical and experimental considerations on solute dispersion”

M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. 1565 (2018) 68–80. doi:10.1016/j.chroma.2018.06.024



Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 Theoretical and experimental considerations on solute dispersion

Marie Bernardin^{a,b}, Frédérique Bessueille-Barbier^a, Agnès Le Masle^b, Charles-Philippe Lienemann^b, Sabine Heinisch^{a,*}

^a Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, ENS Lyon, 5 rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, France

^b IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360, Solaize, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2018

Received in revised form 7 June 2018

Accepted 9 June 2018

Available online 15 June 2018

Keywords:

Speciation

Liquid chromatography

Inductively coupled plasma

Extra-column dispersion

Sample introduction system

LC-ICP-MS – flow splitting

ABSTRACT

Liquid chromatography (LC) hyphenated to a specific detection such as inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) is a technique of choice for elemental speciation analysis. However, various instrumental limitations may considerably reduce the expected sensitivity of the technique. Among those, we were interested by the solute dispersion into the interface located between LC and ICP-MS. The interface consists of a Sample Introduction System (SIS) and a possible flow-splitter prior to SIS. Flow splitting can be required in case of organic matrices to reduce the organic solvent amount entering plasma which may lead to plasma instabilities.

Although extra-column dispersion is usually well taken into account with conventional UV detection it has been little studied in the context of LC-ICP-MS and moreover never quantified. Our objective is to assess the loss in column plates and hence in both separation quality and sensitivity which may be generated by the coupling of LC and ICP-MS in the specific case of organic matrices. In this first study, this is done (1) from a theoretical approach; (2) from 55 experimental studies reported in LC-ICP-MS and (3) from our experimental results highlighting the critical impact of the flow splitter on extra-column dispersion depending on both flow-rate and split ratio. It turns out by evaluating the 55 reported studies by means of theoretical calculations, that the loss in plates due to extra-column dispersion was most of the time beyond 50% and even often beyond 90%. Moreover, from our experiments, it has been shown that a very low split ratio (1:50) could generate an additional variance around $200 \mu\text{L}^2$ which induces a loss in theoretical plate of 90% for ultra-high performance LC (UHPLC) column ($5 \text{ cm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$).

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The need for determining elemental species concentrations rather than total element concentrations has grown within the past decades. According to Templeton et al. [1,2] speciation analysis consists in identifying and quantifying different chemical species of a particular element in a given sample. It has become an important field of research over the past few years in several areas including biochemistry, environmental chemistry, ecotoxicology, pharmaceuticals, petrochemicals, and nutrition science [3].

Nowadays hyphenated techniques such as Liquid Chromatography (LC) hyphenated with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC-ICP-MS) are widely used both to obtain elemental information and to discriminate species in a given matrix. LC techniques, including ion exchange chromatography (IEC) [4], reversed-phase liquid chromatography (RPLC) [5], ion-pairing chromatography (IPC) [6], size exclusion chromatography (SEC) [7,8] and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) [9,10], have been used for speciation analysis [11]. Different hyphenated techniques can be combined together to achieve more exhaustive characterization of complex matrices. For example, LC-ESI-MS can be associated to LC-ICP-MS to obtain both structural information and elemental information [5,12–14].

Most speciation analyses are performed in aqueous matrices by using ion-exchange chromatography and deal with environmental

* Corresponding author.

E-mail address: sabine.heinisch@univ-lyon1.fr (S. Heinisch).

samples [15]. In this specific case, the mobile phase is not critical for the coupling of both techniques since the amount of organic solvent in the mobile phase is limited (small percentage of organic modifier sometimes added, usually without disturbing plasma stability). However, when using RPLC [16–28] or HILIC [9,10,29–34], a large amount of organic solvent is introduced into the plasma. The problems involved by this introduction was thoroughly discussed by Leclercq et al. [35,36] in a recent review.

Some key issues have to be considered for coupling LC to ICP-MS in case of organic matrices [3]: (i) metal contamination from the chromatographic system and/or the stationary phase and/or the mobile phase [3], (ii) plasma instabilities due to the solvent load, especially in case of organic mobile phases [3], (iii) signal fluctuations in gradient elution depending on plasma parameters [37] and (iv) solute dispersion into the interface located between LC and ICP-MS. The interface is made of a sample introduction system (SIS) and a possible flow splitter prior to SIS which may be required, in case of organic matrices, to reduce the amount of solvent entering plasma and hence to decrease plasma instabilities [3]. The solute dispersion in the interface unit is a critical issue because that can result in additional solute band broadening and hence in significant loss in both sensitivity and separation quality. Although extra-column dispersion is usually well taken into account with conventional UV detection, it has been little studied in the context of LC-ICP-MS. In the present study, we made therefore an attempt to assess the extent to which the interface contributes to solute band broadening. This was done by (i) estimating from published studies the likely loss in plates due to solute dispersion in the interface and (ii) showing the critical impact of the flow splitter on extra-column dispersion depending on both flow-rate and split ratio. To support the first approach, a synoptic table has been built (Table 2) which summarizes 55 studies carried out on organic matrices in LC-ICP-MS and gives, for each study, an estimation of the interface contribution to solute band broadening. A further second part of our study will be dedicated to the comparison of a large number of commercially available SIS regarding the extra-column dispersion.

2. Theoretical considerations

Solute dispersion can be assessed by the peak variance. The total solute dispersion (total variance, σ_{total}^2) comes from both dispersion inside the column (column variance, σ_{col}^2) and extra-column dispersion (extra-column variance, σ_{ext}^2).

Extra-column dispersion results from the injection process ($\sigma_{injection}^2$), the different tubing (σ_{tubing}^2) and the detection ($\sigma_{detector}^2$) [38].

Because variances can be added if the corresponding dispersion process are independent of each other, the total peak variance can be written as

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2 \quad (1)$$

Similarly, the extra-column variance is the sum of individual contributions according to

$$\sigma_{ext}^2 = \sigma_{injection}^2 + \sigma_{tubing}^2 + \sigma_{detector}^2 \quad (2)$$

For Gaussian peaks, the total peak variance in volume units can be given by the measured peak width at half peak height ($w_{0.5}$) according to

$$\sigma_{total,v}^2 = \frac{F^2 w_{0.5}^2}{5.54} \quad (3)$$

Where F is the mobile phase flow-rate.

For asymmetrical peaks, the second order central moment has to be used to provide a reliable variance value. These latter, in volume units, is given by

$$\sigma_{total,v}^2 = F^2 \frac{\int_0^\infty (t - t_R)^2 I(t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt} \quad (4)$$

Where t_R is the mean residence time and $I(t)$ the intensity as a function of time.

Extra-column variance can be approximated by removing the column and replacing it by a zero dead volume union connector. In this case, extra-column variance is calculated from Eq. (3).

The column variance, expressed in length units ($\sigma_{col,x}^2$) is related to both the column length and the column plate height, H_{col} , by

$$\sigma_{col,x}^2 = L H_{col} \quad (5)$$

H_{col} varies with the mobile phase linear velocity, u , and its variation may be fitted by the van Deemter equation [39] or by the Knox equation [40] using reduced parameters h_{col} (H_{col}/d_p) and ν ($u d_p/D_m$, d_p being the average particle diameter and D_m the molecular diffusion coefficient of the solute in the mobile phase). At the minimum of the curve, typical values for h_{col} and ν are 3 and 5 respectively.

Considering the solute linear velocity at the time the solute is eluted from the column ($u/(1+k_e)$, k_e being the retention factor at elution), the column variance can be expressed in volume units according to

$$\sigma_{col,v}^2 = \frac{V_0^2 (1+k_e)^2 H_{col}}{L} \quad (6)$$

V_0 is the column dead volume, related to the column length, the internal diameter, d_i and the column porosity, ε_t by

$$V_0 = \pi L \varepsilon_t (d_i^2/4) \quad (7)$$

Under isocratic conditions, k_e depends on the retention volume and is given by

$$k_e = \frac{V_R}{V_0} - 1 \quad (8)$$

Under gradient conditions, k_e depends on both the gradient conditions and the solute properties. However a rough estimation of k_e can be made when the linear solvent strength theory (LSST) can be applied and the solvent strength parameter, S is known [41,42], using the following relation

$$k_e = \frac{1}{2.3 S t_0 \frac{\Delta C}{t_G}} \quad (9)$$

With t_0 the column dead time, ΔC the gradient composition range, and t_G the gradient time. Typical values of S (S being the absolute value of the slope of the linear relationship between the logarithm of the retention factor and the stronger solvent volume fraction) are 4 for small molecules, 20 for peptides and much higher for larger molecules [42].

Thus, From Eqs. (6) and (7), the column variance for a given peak in a given chromatogram can be estimated provided that the column geometry is known, and the retention factor can be determined.

Similarly to Eq. (6), the total variance in volume units can be written

$$\sigma_{total,v}^2 = \frac{V_0^2 (1+k_e)^2 H_{total}}{L} \quad (10)$$

Where H_{total} is the total plate height resulting from the two dispersion processes.

The ratio, β^2 , between column and total variances corresponds to the ratio between the two plate heights and hence to the ratio between effective and column plate numbers according to

$$\beta^2 = \frac{\sigma_{col}^2}{\sigma_{total}^2} = \frac{H_{col}}{H_{total}} = \frac{N_{effective}}{N_{col}} \quad (11)$$

Where $N_{effective}$ and N_{col} are effective and column plate numbers respectively.

The term, β^2 represents the fraction of remaining plates for a given solute, in given chromatographic and instrumental conditions.

The peak height and the resolution between two peaks are inversely proportional to the peak standard deviation (σ). As a result, the fractions of remaining peak height and remaining resolution are given by β .

The mobile phase flow-rate is related to the reduced linear velocity by

$$F = v \frac{V_0}{L} \frac{D_m}{d_p} \quad (12)$$

From Eqs. (6) and (12), Table 1 gives an overview of optimum flow-rates and corresponding column variances ($k_e = 3$) depending on both column internal diameter and particle size.

Depending on SIS, the flow entering the plasma source is expected to be a critical parameter regarding the performance of ICP-MS. According to Table 1, the internal diameter has to be chosen in accordance with the required flow-rate. However as shown in Fig. 1, any decrease in column internal diameter leads to a severe decrease in column variance, and hence to a huge decrease in both plate number and sensitivity if the dispersion in SIS is significant. The percentage of remaining plates was calculated from Eq. (11) as a function of extra-column variance for different column internal diameters and two different particle sizes (5 and 1.7 μm). The calculations were performed for a k_e value of 3 and a column length providing 10,000 plates (Fig. 1a. 15 cm with 5 μm and 5 cm with 1.7 μm) and 30,000 plates (Fig. 1b 15 cm with 1.7 μm). Extra-column variance was considered in the range 0.1 to 1000 μL^2 that covers current LC-UV instruments except nanoLC instruments. With the aim of maintaining more than 80% of the plates ($\beta^2 > 0.8$) and hence more than 90% of the peak height ($\beta > 0.9$), it appears that the maximum allowable values for the extra-column variance are (1) 1000 and 100 μL^2 for conventional columns (4.6 mm i.d.) packed with 5 μm and 1.7 μm particles respectively; (2) 50 and 5 μL^2 for narrow bore columns (2.1 mm i.d.) packed with 5 μm and 1.7 μm particles respectively; 3 and 0.3 μL^2 for micro bore columns (1 mm i.d.) packed with 5 μm and 1.7 μm particles respectively. These values are slightly higher for 30,000 plates with 1.7 μm particles (Fig. 1b). With capillary columns (300 μm i.d.), the extra-column variance should be much lower than 0.1 μL^2 . This figure also highlights the range of extra-column variance covered by commercially available HPLC and UHPLC instruments with UV detection. With the objective of reaching 10,000 plates, it appears that HPLC-UV instruments are not suitable for conventional columns packed with 1.7 μm particles and that most UHPLC-UV instruments cannot be used with narrow bore columns packed with 1.7 μm particles. Furthermore, even very efficient UHPLC-UV instrument (i.e. extra-column variance as low as 5 μL^2) are not suitable for micro bore columns.

In this context, it is of prime importance to assess the additional extra-column variance brought by the interface between LC and ICP-MS. Considering the curve shapes in Fig. 1, it appears that, in any case, the remaining plates might decrease from 80% to 70%, 50%, and 30% by increasing the extra-column variance by a factor of 2, 5 and 10 respectively.

As previously discussed, the interest for LC-ICP-MS in case of organic matrices has significantly grown during the past few years. In our opinion, instrument performances are often not considered enough, methods being developed without prior evaluation of the interface contribution to solute dispersion. To assess the additional dispersion brought by the interface in LC-ICP-MS, 55 studies reported in the area of organic matrix speciation have been reviewed and discussed in term of extra-column dispersion in the next section. With a view to reducing the flow entering SIS, an alternative to the reduction of internal diameter may be the use of a flow-splitter prior to SIS. A T-union was indeed used for quantification with online isotopic dilution [25,43–48]. However such unit may lead to significant additional extra-column band broadening. The contribution of flow splitting to extra-column dispersion is therefore studied in the last section.

3. LC-ICP-MS interface

Peak band broadening is rarely taken into consideration even when the sample matrix becomes complex. Most of the time, authors work with only a few standards instead of a complex mixture to optimize the separation techniques and even less often on a real sample. For instance, Raber et al. [49] focused on eleven arsenic species using an LC separation prior to ICP-MS detection but, as can be seen, the peaks were poorly resolved. A low measured plate number with respect to the theoretical column plate number, can be due to (i) solute dispersion in the chromatographic system (injection system, tubing, UV-detection), (ii) a loss in column plates (depending on the history of the column), or (iii) an additional dispersion generated by the interface between LC and ICP-MS. The interface consists in a Sample Introduction System (SIS) and a possible flow-splitter prior to SIS which can be required, in case of organic matrices, to reduce the amount of solvent entering plasma and hence to decrease plasma instabilities. SIS is usually divided into two devices, the nebulizer, and the spray chamber. The nebulizer converts the liquid from the separation technique into a heterogeneous aerosol made of different droplet sizes. The aerosol is then usually sorted out in a spray chamber. Larger droplets are carried to the waste while smaller ones are sent to the plasma source for atomization/excitation/ionization [35]. Nebulizers, spray chambers, and flow-splitters represent critical devices for ensuring a high-performance coupling. Particular attention must be paid both to the quality of the aerosol produced through the nebulizer/spray chamber [50] and to the contribution of the whole interface to peak band broadening [3,44,45,51–53], both features being able to significantly affect the sensitivity. A well-documented summary of SIS devices was reported by Leclercq et al. [36]. Major advantages and drawbacks were discussed in terms of sensitivity and ease of use, but other analytical performances such as efficiency, resolution, sensitivity or extra-column solute dispersion, were not taken into account to compare the different devices. In the present work, this feature has been subjected to a broad exploratory study on 55 published studies (from 1995 to 2017) dealing with the speciation of organic matrices. The corresponding analytical conditions, including LC conditions, type of nebulizers, type of spray chambers and use or not of a flow-splitter, are listed in Tables 2 and S1 of Supplementary Information, depending on whether enough data were available or not. When data were available (Table 2), an evaluation of the total solute dispersion (total variance, $\sigma_{total,v}^2$) was made from Eq. (3) by considering the most retained peak (symmetrical peaks only). The column variance, $\sigma_{col,v}^2$ was evaluated from Eq. (6). The extra-column variance, $\sigma_{ext,v}^2$ was estimated from Eq. (1). To easily compare the percentage of remaining plates (β^2), this value was systematically determined for a retention factor of 3, by column variance rescaling using Eq. (6). Corresponding β^2 values

Table 1

Optimum flow-rates (F_{opt}), column plate number (N_{col}), column variance (σ^2_{col}) depending on column internal diameter (d_i) and particle diameter (d_p). Calculations performed with $k_e = 3$; $D_m = 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$; $L = 150 \text{ mm}$; $\nu = 5$; $h = 3$; $\epsilon_t = 0.7$, using Eqs. (5)–(12).

	d_i (mm)	$d_p = 5 \mu\text{m}$		$d_p = 1.7 \mu\text{m}$	
		$N_{col} = 10,000$		$N_{col} = 30,000$	
		F_{opt} ($\mu\text{L}/\text{min}$)	σ^2_{col} (μL^2)	F_{opt} ($\mu\text{L}/\text{min}$)	σ^2_{col} (μL^2)
Conventional	4.6	698	4867	2052	1655
Narrow bore	2.1	145	211	428	72
Micro bore	1	33	11	97	4
Capillary	0.3	3	0.088	9	0.03
Nano bore	0.075	0.2	0.00034	0.5	0.00012

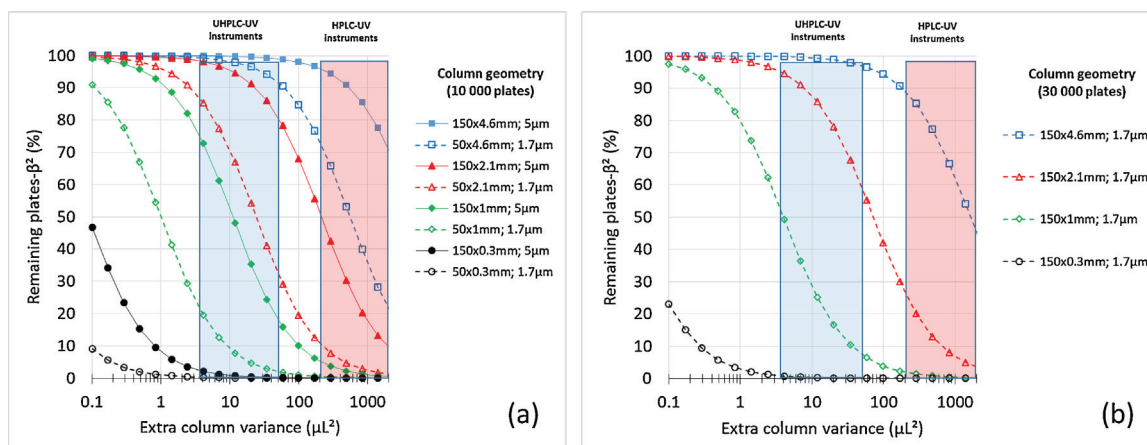


Fig. 1. Percentage of remaining plates (β^2) as a function of extra-column variance for different column geometries providing (a) 10,000 and (b) 30,000 plates. Calculations from Eqs. (6) and (7) with $k_e = 3$; $h = 3$ and $\epsilon_t = 0.7$.

are given in Table 2. The reasons for low β^2 values can be strongly related to the instrument characteristics including the type of interface but also the level of matching between the column geometry and the LC instrument.

Fig. 2 illustrates the relative distribution of nebulizers and spray chambers used for speciation in LC-ICP-MS in case of organic solvent matrices regarding the dimension of the column used. In many studies, it was difficult to draw relevant conclusions because of a lack of information about SIS and/or the column particle diameter and/or even sometimes, the mobile phase flow-rate. However when the calculations were possible, the following comments can be provided depending on whether the column was conventional, narrow-bore, micro-bore or capillary:

3.1. Conventional columns

According to Fig. 2, three different nebulizers have been used: pneumatic micro-concentric nebulizer (50%) operated with flow-rates in the range 40–1000 $\mu\text{L}/\text{min}$, pneumatic concentric nebulizer (10%) operated with flow-rates higher than 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ and hydraulic high-pressure nebulizer (10%). With the first and second ones [17,20,22,24,25], the liquid is introduced through a horizontal capillary and the gas conducted through an external tube around the liquid capillary. With the third one [54], the liquid is forced through a highly turbulent hydraulic nozzle. Similarly, three different spray chambers are used in association with the preceding nebulizers: cyclonic spray chambers (30%), double pass spray chamber (20%) and desolvation units (10%). With cyclonic spray chambers, the aerosol is tangentially introduced and first impacts against the front walls generate thinner aerosol which is transported towards the injector [50]. The double pass spray chambers is composed of two concentric tubes, the external one promoting droplet elimination through impacts against the wall

and reducing aerosol fluctuation due to pump pulsing, the internal one eliminating coarse droplets and inducing a laminar flow aerosol [50]. Finally, desolvation units are designed to reduce the solvent amount into the plasma with either a desolvation membrane to remove organic/hydro-organic matrices in association with a micro-concentric nebulizer [16,54,55] or an ultrasonic nebulizer [56]. The main drawback of desolvation systems is the possible loss of analytes through the desolvation membrane. As reported, the sensitivity achieved with a desolvation micro-concentric nebulizer was dependent on the analyte structure [55,57].

When calculations were possible, the calculated percentage of remaining plates (β^2) was found to be lower than 35% (i.e. 24 [17], 16% [24], 31% [20], 14% [25], 34% [58]) except in one case (i.e. 86% [26]). Unfortunately, in this latter case, the information about the interface was not available and as a result, no relevant conclusion could be drawn. As seen in Fig. 2 and mentioned earlier, in many cases, the necessary information about nebulizer (30%) and spray chamber (40%) was not provided. It is important to note that, with conventional columns leading to high column variance values, the measured loss in plates is likely due either to the interface or to column ageing or to both, but probably not to the contribution of LC instrument to extra-column solute dispersion. As a result, it can be concluded that, in most cases, the separation achieved in the column was partially or completely lost in the interface. As examples, with a micro-concentric nebulizer in association with a Peltier Cooled Cyclonic spray chamber PC³ (supplied by Elemental Scientific), only 24% of the plates remained [17] and 14% in association with a double pass spray chamber [25]. It can be noticed that only one study deals with the use of low cyclonic spray chamber among the 55 publications reported [52]. Finally, in association with a desolvation unit, the very bad peak shapes did not allow to conclude about the impact of the interface [54].

[Ref] (Figure)	Sample	LC conditions (Elution mode, column dimension, gradient)	Nebulizer	Spray chamber	β^2 (%)
----------------	--------	--	-----------	---------------	---------------

[Ref] (Figure)	Sample	LC conditions (Elution mode, column dimension, gradient)	Nebulizer		Spray chamber		β^2 (%)
			Type	Brand	Type	Brand	
Conventional column [17] (Fig. 3)	Standards, urine, faeces from dog and rat. ^{14}C	RPLC, C18, (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ Gradient (Phase A: 0.1 M ammonium acetate pH 7.5, Phase B: 10 % 1 M ammonium acetate pH 7.5–45 % MeOH–45 % ACN)	Micro-concentric	PFA-LC	Cyclonic	PC ³	24
			Micro-concentric	ES-2050 microflow PFA-LC	Cyclonic	PC ³	16
			Micro-concentric	MicroMist	nd	nd	31
([24], Fig. 2)	Antituberculosis drug. ⁸¹ Br	RPLC, C18 (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ Gradient (Phase A: 0.1 mol/L ammonium acetate buffer, Phase B: 10 % 1 mol/L ammonium acetate, 45 % MeOH, 45 % ACN)	Micro-concentric	PFA-LC	Cyclonic	PC ³	16
			Micro-concentric	MicroMist	nd	nd	31
([20], Fig. 1)	Standards Fish, Hg	RPLC, C18 (100 $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm), 450 $\mu\text{L}/\text{min}$ Isocratic (55 % MeOH + 0.1 % mercaptoethanol + 45 % 60 mM ammonium acetate, pH 4.0)	Micro-concentric	PFA-LC	Cyclonic	PC ³	24
			Micro-concentric	MicroMist	nd	nd	31
([25], Fig. 1)*	Urine and bile in rat. ^{12/71}	RPLC, C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 3 μm), 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ Isocratic (30 % ACN + 0.1 % formic acid for analysis of 3- and 4-iodobenzoic acid metabolites or 20 % ACN + 0.1 % formic acid for analysis of 2-iodobenzoic acid metabolites)	Micro-concentric	PFA-LC	Double pass	nd	14
			Micro-concentric	PFA-LC	Double pass	nd	14
([58], Fig. 2)	Human hair, fish sample, Hg	RPLC, C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ Isocratic (35 % MeOH + 40 % ACN + 25 % water containing 1.0 $\times$ 10 ⁻⁴ mol/L)	nd	nd	nd	nd	34
			nd	nd	nd	nd	34
([26], Fig. 1)	Standards, Hg	RPLC, C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 700 $\mu\text{L}/\text{min}$ Isocratic (90 % (v/v) MeOH–10 % (v/v) water containing DDTC 1.0 $\times$ 10 ⁻⁴ mol/L)	nd	nd	nd	nd	86
			nd	nd	nd	nd	86
Narrow bore column ([59], Fig. 1)	Standard Fish tissue and hair, Hg.	RPLC, C18 (150 $\times$ 3.2 mm, 3 μm), 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ Isocratic (50 % MeOH + 50 % water (v/v) with 0.01 % 2-mercaptoethanol)	Micro-concentric	Microflow PFA	nd	nd	59
			Micro-concentric	Microflow PFA	nd	nd	59
([60], Fig. 3)	Standards from pharmaceutical companies, Gd	HILIC, (150 $\times$ 2.1 mm, 3 μm), 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ Isocratic (Phase A: 50 mmol/L aqueous ammonium formate, Phase B: ACN, 30 % A and 70 % B)	Micro-concentric	PFA microflow ST	Cyclonic	nd	<5
			Micro-concentric	PFA microflow ST	Cyclonic	nd	<5

([60], Fig. 4)	Standards from pharmaceutical companies, Gd	HILIC, (150 × 2.1 mm, 3 μ m), 250 μ L/min Isocratic (Phase A: 50 mmol/L aqueous ammonium formate, Phase B: ACN, 30 % A and 70 % B)	Micro-concentric	PFA microflow ST	Desolvat-ation unit	APEX Q	–5 °C	<5
([66], Fig. 2)	Blood plasma, Fe,	HILIC, (150 × 2.1 mm, 3 μ m), 250 μ L/min Isocratic (Phase A: 25 mmol/L aqueous ammonium acetate, Phase B: ACN, 30 % A and 70 % B)	Micro-concentric	PFA microflow ST	Cyclonic	nd	–5 °C	18
([33], Fig. 1)	Standards Xylem sample, ⁵⁴ Fe	HILIC, (150 × 2.1 mm, 5 μ m), 100 μ L/min Gradient (Phase A: 10 mM ammonium acetate in water Phase B: 10 mM ammonium acetate in MeOH)	nd	nd	nd	nd	nd	14
([63], Fig. 2)	Human serum, ²⁰² Hg	RPLC, C5 (150 × 2.1 mm, 5 μ m), 300 μ L/min Gradient (Phase A: 0.1 % formic acid in water, Phase B: ACN)	Concentric	Meinhard nebulizer TR-30-A3	nd	PC3	nd	8
([64], Fig. 4)	Carbonic anhydrase, ²⁰² Hg thimerosal,	RPLC, C18 (150 × 2.1 mm, 5 μ m), 300 μ L/min Gradient (Phase A: 0.1 % acid formic in water, Phase B: ACN)	Micro-concentric	PFA MicroFlow	Cyclonic	nd	–5 °C	8
([9], Fig. 1)	Standards Human cell, Pt	HILIC, (150 × 2.1 mm, 5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (70 % DMF+ 30 % 20 mM ammonium acetate or 70 % ACN+ 30 % 20 mM ammonium acetate)	Parallel path	MiraMist	Cyclonic	nd	5 °C	11
([52], Fig. 2)	Standards Arsenosugars in algal extract, As	Anion Exchange, (100 × 2.1 mm, 5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (60 mM aqueous ammonium dihydrogen phosphate of pH 5.9)	Micro-concentric	PFA-ST (Dead volume 13 μ L)	Cyclonic	Cinnabar (20 mL)	nd	70
([29], Fig. 1)	Standards, ⁷⁵ As	HILIC, (50 × 2.1 mm, 3.5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (70 % ACN+ 20 % 125 mM ammonium acetate pH 8.3)	Micro-concentric	Micro-concentric	Scott double pass	nd	nd	<5
([19], Fig. 4)	Standards, Sn	RPLC, C18 (150 × 2 mm, 5 μ m), 200 μ L/min Isocratic (70 % (v/v) MeOH + 29 % (v/v) water + 1 % (v/v) glacial acetic acid and 4 mM ion pair reagent (1-pentansulfonic acid sodium salt 1-hydrate))	nd	nd	nd	nd	nd	17
([28], Fig. 1)	Rat hepatocyte, ⁸² Se	RPLC, C18 (250 × 2 mm, 5 μ m), 200 μ L/min Gradient (Phase A: 0.1 % formic acid 2 % MeOH, Phase B: 0.1 % formic acid in 50 % MeOH)	Micro-concentric	MicroMist	Cyclonic	PC3	4 °C	50

Table 2 (Continued)

[Ref] (Figure)	Sample	LC conditions (Elution mode, column dimension, gradient)	Nebulizer		Spray chamber		β^2 (%)
			Type	Brand	Type	Brand	
Microbore column ([31], Fig. 3)	Standards, ¹²⁷ I	RPLC, (250 × 2 mm, 5 μ m), 300 μ L/min Isocratic (22 % (v/v) ACN ; 0.08 % (v/v) trifluoroacetic acid). Before going to the ICP-MS using make-up solution 2 % (v/v) HNO ₃ ; (0.7 ml/min)	Cross-flow	Gem Tip (Perkin Elmer)	Double pass	Ryto	6
		HILIC, (150 × 1 mm, 3 μ m), 90 μ L/min Gradient (Phase A: 95 % ACN, 5 % water, 0.05 % formic acid, Phase B: 5 % ACN, 95 % water, 0.05 % formic acid	Micro-concentric	PFA-ST nebulizer	Cyclonic	PC3	<5
	Fish liver and muscle, Hg, Pb	RPLC, C18 (150 × 1 mm, 5 μ m), 120 μ L/min Isocratic (0.2 % (v/v) 2-mercaptoethanol, 174.2 mg/L SPS, 12 % (v/v) MeOH and 1 mg/L EDTA, pH 2.8)	Total consumption nebulizer	DIHEN-170-AA			<5
		Anion Exchange, (150 × 1 mm, 5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (20 mM mono-ammonium dihydrogen phosphate acid and diammonium hydrogen phosphate buffer)	Total consumption nebulizer	DIN (Microneb 2000)			<5
	Arsenic species Urine, As	Anion exchange, (150 × 1 mm, 5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (20 mM mono-ammonium dihydrogen phosphate acid and diammonium hydrogen phosphate buffer)	Micro-concentric	Micro-concentric nebulizer (MCN-100)	Double pass	Scott Ryton	<5
([71], Fig. 1)	Arsenic species Urine, As	Anion exchange, 5 (150 × 1 mm, 5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (20 mM mono-ammonium dihydrogen phosphate acid and diammonium hydrogen phosphate buffer)	Cross flow	nd	Double pass	Scott Ryton	<5
		RPLC, C18 (50 × 1 mm, 3.5 μ m), 100 μ L/min Isocratic (Cobalamin: 25 mM ammonium acetate, 10 % ACN, Organomercury and lead: 7.5 mM PIC-B5, 20 % ACN)	Total consumption nebulizer	DIHEN (reduce by inserting a 0.008 in id tubing into the nebulizer			<5
([55], Fig. 3)	Standards, Hg, Pb, Co	RPLC, C18 (250 × 0.3 mm, 5 μ m), 116 μ L/min Gradient (Phase A: 100/0.065 water/TFA, Phase B: 80/20/0.05 ACN/water/TFA)	Total consumption nebulizer	Modified DIHEN			<1
		RPLC, C18 (250 × 0.3 mm, 5 μ m), 116 μ L/min Gradient (Phase A: 100/0.065 water/TFA, Phase B: 80/20/0.05 ACN/water/TFA)	Micro-concentric	PFA-LC	Cyclonic	PFA	<1
Capillary column ([67], Fig. 5) ^a	Standards Synthetic phospho-peptide, ²³⁸ U, ¹¹⁵ In, ¹²⁷ I, ³¹ P	RPLC, C18 (250 × 0.3 mm, 5 μ m), 116 μ L/min Gradient (Phase A: 100/0.065 water/TFA, Phase B: 80/20/0.05 ACN/water/TFA)	Micro-concentric	PFA-LC	Cyclonic	PFA	<1

nd: not determined or not found in the literature.

^a Use of flow splitting.

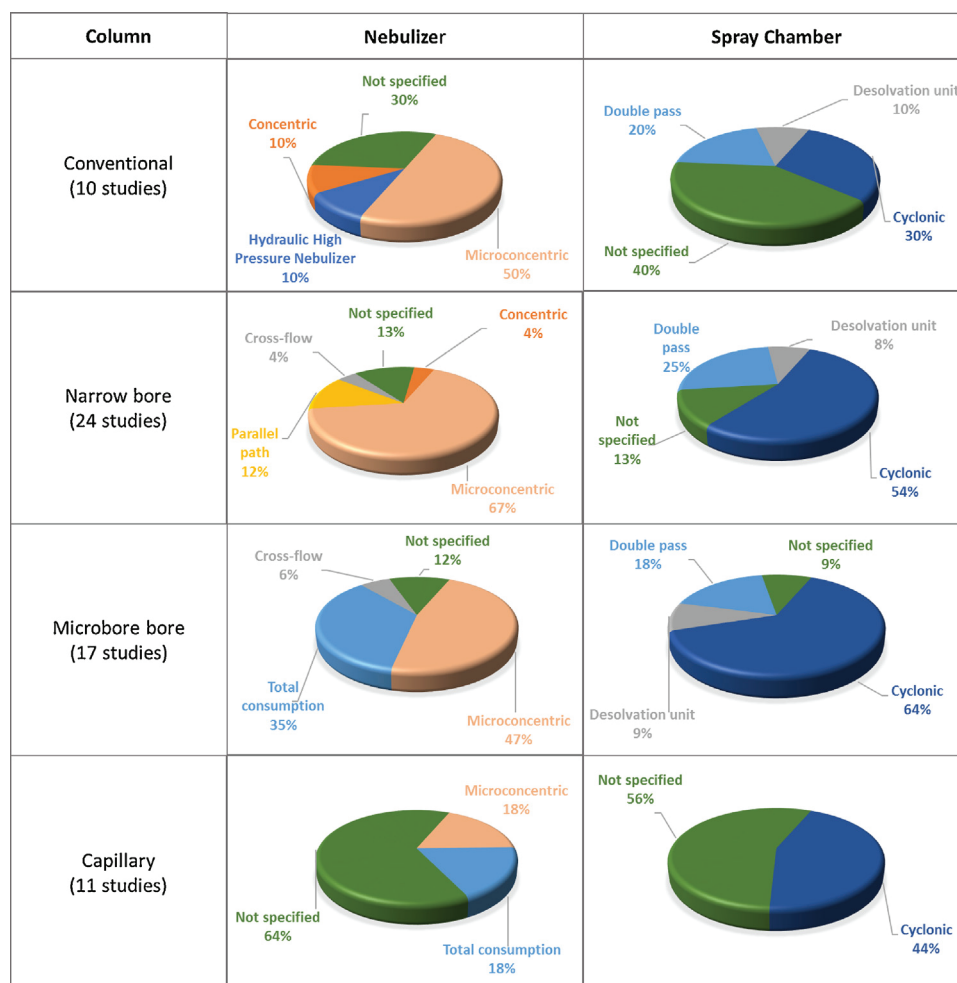


Fig. 2. Relative distribution of nebulizers and spray chambers depending on the column inner diameter. Based on 55 reported studies dealing with LC-ICP-MS for organic matrices (from 1995 to 2017).

3.2. Narrow bore columns

The distribution of the nebulizers was different from that for conventional columns with four different ones used: microconcentric nebulizers (67%), parallel path nebulizers (12%) with the liquid interacting with the high-velocity gas stream coming tangentially into contact with it [50], cross-flow nebulizers (4%) with liquid and gas outlets perpendicularly mounted on a polymer body and concentric nebulizers (4%). Most of the time, micro-concentric nebulizers [9,19,21,23,27–29,33,34,47,52,54,59–64] were associated to a cyclonic spray chamber (54% of the spray chambers used). A specific micro-concentric nebulizer (i.e. microflow PFA-ST or PFA-LC nebulizer supplied by Elemental scientific) was used in several studies [59,61,64]. It is made of a copolymer, with an internal capillary more recessed than other micro-concentric nebulizers [50]. However, very low percentages of remaining plates were estimated in these cases. The highest value was 70% [52] while all other ones were below 20% and even some of them below 5% [29,60]. In the particular study of Vidler et al. [59], the calculated retention factor was found to be lower than 1 (i.e. about 0.5) leading to 16% of remaining plates only. In this study a micro concentric nebulizer was used, unfortunately, the spray chamber was not mentioned. However, considering a retention factor of 3, the calculated fraction of remaining plates is tremendously improved (i.e. 59%), suggesting that, in this particular case, the loss in plates was likely due to LC system volumes rather to the interface. Interestingly, the use of two different detectors, ICP-MS and ESI-TOF [33] allowed us to indi-

rectly assess the extra-column dispersion induced by the interface between LC and ICP-MS, assuming no dispersion in both ESI-TOF and ICP-MS. From our calculations, the total variance was $1360 \mu\text{L}^2$ with LC-ICP-MS against $490 \mu\text{L}^2$ with LC-ESI-MS, thereby leading to an impressive peak variance of $870 \mu\text{L}^2$ for the interface alone, far too high considering the expecting narrow-bore column variance (i.e. $< 200 \mu\text{L}^2$ as shown in Table 1). Unfortunately, no information about the interface was available [33] which could have permitted to draw some interesting trends.

3.3. Micro bore and capillary columns

When the column internal diameter is further decreased, the trend is towards the use of total consumption nebulizers (35% and 18% for microbore and capillary columns respectively) at the expense of micro-concentric ones (67%, 47% and 18% for narrow-bore, microbore and capillary columns respectively) (Fig. 2). Total consumption nebulizers do not require spray chambers or desolvation systems and can work with low flow-rates (typically a few tens of $\mu\text{L}/\text{min}$). The primary aerosol is entirely sent to the plasma. Two different total consumption nebulizers were used with organic/hydro-organic matrices, namely Direct Injection Nebulizer (DIN, supplied by CETAC Technologies) and Direct Injection High-Efficiency Nebulizer (DIHEN, supplied by Meinhard). DIN has been used since 1992 [65] and was often adapted before use [16,65]. Despite its low volume, highly recommended for hyphenated techniques, its main drawback is its small internal capillary (i.e. $60 \mu\text{m}$)

which can be easily clogged [36,50]. Moreover, finding the correct distance between the tip and the plasma is not easy considering the capillary thinness. For the above reasons, this nebulizer is no more commercialized [66]. DIHEN is a pneumatic nebulizer in glass or quartz, working with liquid flow-rates between 1 and 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. It is characterized by a larger dead volume than DIN. It is therefore always used with an inserted capillary to reduce its dead volume [36,44,45,51,67–69]. The optimum flow-rate for total consumption nebulizers is a few $\mu\text{L}/\text{min}$, which is also the range of flow-rates adapted to capillary LC (i.e. $< 10 \mu\text{L}/\text{min}$ as seen in Table 1). Nevertheless in all studied cases (see Table 2), the estimated percentage of remaining plates was lower than 5%.

Finally, two different SIS (a total consumption nebulizer and a micro-concentric nebulizer combined with a cyclonic spray chamber) were compared for a given capillary column while keeping the same separation conditions [67]. In both cases, the estimated percentage of remaining plates was found to be lower than 1%, highlighting once again the importance of extra-column band broadening, especially in case of thin columns and the necessity of trying to ensure the lowest possible contribution of the interface.

In summary, it has been pointed out that it is essential that the interface is optimized in relation to the separation conditions and especially to the column geometry. In most cases among 26 published chromatograms, the estimated percentage of remaining plates (calculated with a retention factor of 3) were found to be lower than 50%, 20%, 5% and 1% for conventional, narrow-bore, micro-bore and capillary columns respectively. These low percentage values clearly show that interfaces are mostly inappropriate. Moreover, it is important to point out that the extra column dispersion is never considered. Further investigations were carried out in our Lab to compare commercially available SIS with respect to extra-column dispersion. These results will be extensively discussed in Part II.

Adapting the flow-rate before entering SIS can be a good option when using a total consumption nebulizer designed to work at low flow-rates to limit the amount of organic solvent entering the plasma. A zero-dead volume T-union along with suitable tubing can be used to adjust the flow-rate just prior entering SIS [12,25,44,45,67]. Nonetheless, such device is also expected to give rise to additional extra-column dispersion. Zoorob et al. [45] indeed showed that a split ratio of 1:20 generated more dispersion in the interface than DIN alone. However, most authors, using a flow splitter did not consider the additional dispersion generate by such devices [24,25,44,67]. However, it was evaluated under fast separation conditions by injecting, without column, 20 μL of a potassium iodide solution [47]. Flow splitting was used to reduce the acetonitrile concentration and hence to improve ICP-MS performance. The authors visually compared peak shapes with and without flow splitting and deduced that the T-connection did not have a significant impact on the dispersion. However, the comparison was qualitative and not quantitative. To the best of our knowledge, no quantitative study on additional variance brought by flow splitting depending on both flow-rate and split ratio has been reported. This issue is addressed in the next section.

4. Determination of peak variance resulting from flow splitting

The aim of the present study was to quantify the additional peak variance due to the presence of a flow-splitter. As discussed above, total consumption spray chambers can be used with low flow-rates (up to a few tens of $\mu\text{L}/\text{min}$) to reduce the solvent load into the plasma. However, such flow-rates are much too low when using narrow bore columns (i.e. 2.1 mm i.d.) and sub 2 μm particles as usually done in UHPLC. A flow-splitter can be used to solve

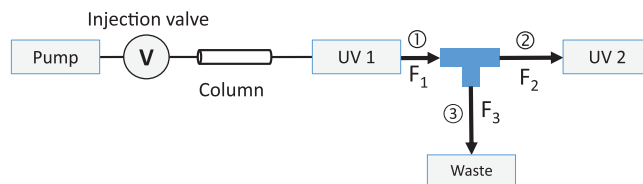


Fig. 3. Schematic representation of the instrument set-up for peak variance measurement. F_1 is the total flow-rate delivered by the pump, F_2 is the flow-rate towards UV Detector 2, and F_3 is the flow-rate sent to the waste. Tubing geometry is given in Table 3.

this problem. It consists in a zero-dead volume T-union located between the column outlet and the detector and intended to divide the main flow into two different flows, the highest being directed to the waste and the lowest to the detector, thereby significantly reducing the flow entering the plasma source. The difficulty may stem from the volumes involved by additional tubing and from the split itself as both may lead to significant additional band broadening, especially when a low split ratio has to be considered. This issue is addressed below by assessing the extra-column variance induced by such device depending on flow-rate, internal diameter of tubing and split ratio.

4.1. Material and reagents

Methanol was HPLC grade from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Water was obtained from Elga water purification system (Veolia water STI, Le Pless Robinson, France). Methylparaben was used as test compound and supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

4.2. Apparatus

The instrument used was an Acquity UPLC I-Class 2DLC liquid chromatography system. It includes two high-pressure binary solvent manager with a maximum delivery of 2 mL/min, an autosampler with a 5 μL injection sample loop, a column oven with a maximum temperature of 90 $^{\circ}\text{C}$ and two different detectors (TUV and PDA) with identical flow-cells, leading to identical signal intensity. They can be used one after the other with or without flow-splitter between both. The wavelength was set at 254 nm with a sampling rate of 40 Hz. The instrument control was performed by Mass Lynx software. The maximum backpressure allowed in the first detector cell was 1000 psi.

4.3. Procedure and methods

The mobile phase was a mixture of 50/50 Water/MeOH (v/v). Methylparaben was diluted in the same mixture with a concentration of 75 ppm. This study was carried out without column. All peak variances were calculated from the second order central moment of the peak, Eq. (4), using in-house calculation tool. The injected volume was 1 μL A P-727 (0.57 μL) T-union was used for flow splitting (from Upchurch, Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France). This T-union was chosen according to a previous study on different commercially available T-unions which concluded that this one was the best adapted to low dispersion [70]. The set-up used to measure the peak variance due to flow splitting is shown in Fig. 3. Tube #1 was located between UV-detector #1 and the T-union, Tube #2, between the T-union and UV Detector #2 (replacing ICP-MS detection for this study) and Tube #3 between the T-union and the waste. Four different settings were considered. The corresponding tubing geometries are given in Table 3. The theoretical split ratio, z_{th} , is

Table 3

Tubing geometry and split ratio (calculated and measured) for Setting A, B, C, D and E (see Fig. 3 for instrument set-up). Split ratio were calculated from Eq. (13).

	Setting A	Setting B	Setting C	Setting D	Setting E
Tube 1			60 cm × 100 μm		
Tube 3	–	62 cm × 100 μm	44.5 cm × 65 μm	24 cm × 100 μm	132 cm × 127 μm
Tube 2	–	29 cm × 65 μm	6 cm × 25 μm	56 cm × 65 μm	9 cm × 25 μm
Calculated split ratio	1:1	1:3.6	1:7.4	1:14	1:45
Measured split ratio	1:1	1:4.8	1:4.8	1:9.4	1:50

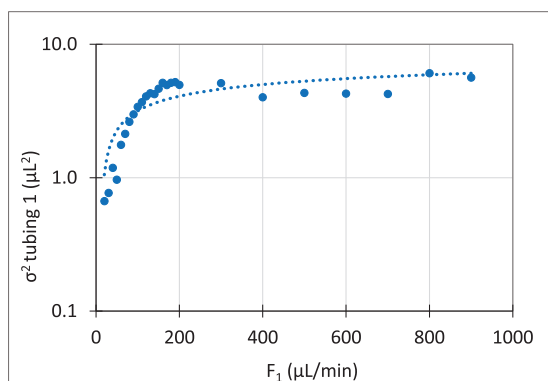


Fig. 4. Variation of the variance due to the tube 1 ($\sigma^2_{\text{tubing 1}}$) as a function of F_1 . See Table 3 for tubing geometry and Fig. 3 for instrument set-up. Solute: methylparaben (75 ppm in 50/50 Water/MeOH v/v). 1 μL injected. No column. Mobile phase: 50/50 water/MeOH v/v. 254 nm.

calculated from the Poiseuille law, considering the dimensions of Tube #2 and #3, Eq. (13):

$$z_{th} = \frac{R_3}{R_3 + R_2} \text{ with } R_i = \frac{L_i}{d_i^4} \quad (13)$$

L_i and d_i being the length and the internal diameter of Tube #“i” respectively.

The measured split ratio, z_{meas} , was obtained from the measured flow-rate, F_2 , in Tube #2 ($z_{\text{meas}} = F_2/F_1$). In the absence of flow splitting (Setting #A), the split ratio was 1. The difference between calculated and measured values in Table 3 may be imputed to internal diameter irregularity.

The peak variance due to flow splitting (σ^2_{split}) was assessed by subtracting the sum of the peak variance measured with Detector #1 (σ^2_{D1}) and that due to Tube #1 ($\sigma^2_{\text{tubing 1}}$) from the peak variance measured with Detector #2 (σ^2_{D2}), Eq. (14).

$$\sigma^2_{\text{split}} = \sigma^2_{D2} - \sigma^2_{D1} - \sigma^2_{\text{tubing 1}} \quad (14)$$

$\sigma^2_{\text{tubing 1}}$ was measured in the absence of flow splitting with Detector #1 and 2 in series ($\sigma^2_{\text{tubing 1}} = \sigma^2_{D2} - \sigma^2_{D1}$). It should be noted that σ^2_{D2} corresponds to the total extra-column variance (σ^2_{ext} in Eq. (2)).

4.4. Results and discussion

Throughout this study, five different settings were studied (Table 3), which differentiated themselves from their measured split ratio and/or their tubing geometry. For the five settings, the dimensions of Tube #1 were the same and hence the variation of $\sigma^2_{\text{tubing 1}}$ with the total flow-rate (F_1). F_1 was varied in the range 50–700 μL/min, 20–150 μL/min, 50–100 μL/min and 100–400 μL/min with settings B, C, D and E respectively. The experimental variation of $\sigma^2_{\text{tubing 1}}$ with F_1 is given in Fig. 4. It could be fitted with an exponential function. As highlighted in Fig. 4, the variance increases linearly with the flow-rate up to a value of nearly 200 μL/min and is almost unchanged beyond (i.e. around 8 μL²). This is in good agreement with reported studies, showing that peak

variance values deviate from linearity at high flow-rates with non ideal tubing (i.e. short, coiled and/or rugged tubing) [71].

Similarly, the variation of σ^2_{split} with F_1 and hence with F_2 was studied in the presence of the T-union (Fig. 5). Two different situations were considered to assess to what extent the peak variance may vary: a decrease in the internal diameter of Tube #2 while keeping the split ratio nearly constant (Setting B and C (Fig. 5a)) and a strong decrease in the split ratio while keeping the internal diameter of Tube #2 constant (Setting C–E (Fig. 5b)).

The impact of the internal diameter of Tube #2 was investigated with two different internal diameters, 65 μm (setting B) and 25 μm (setting C). As shown in Fig. 5a, the curves, representing the variation of the peak variance with F_2 , are very similar in both cases with only 2 μL² difference between both curves, indicating that the internal diameter of Tube #2 has little or no impact on the dispersion generated by the split. On the other hand, the impact of the split ratio was found to be very significant as highlighted in Fig. 5b. Considering the same resulting F_2 value (e.g. 8 μL/min), the measured peak variance increased from 6 to 34 μL² with a split ratio decreasing by a factor of about 2 (1:4.–1:9.4), and up to 200 μL² with a split ratio decreasing by a factor of 10. The impact of the flow splitter on the dispersion can also be visually assessed by comparing the peaks obtained with the different settings. The x-axis is expressed in volume units to have a better comparison of peak broadening. For a given mobile phase flow-rate of 0.1 mL/min, Fig. 6a shows the degradation of the peak shape when the split ratio decreased from 1:1 (no flow splitting) to 1:50 (only 2 μL/min sent to UV-Detector 2). In this latter case, the variance due to the split reached 77 μL². When considering a low F_2 value of 10 μL/min (Fig. 6b), the degradation is even more important with 208 μL² obtained when the split ratio is decreased down to 1:50. In addition to peak broadening, Fig. 6 clearly points out the problem of sensitivity that can be encountered if the interface and in particular the split device are not carefully chosen.

According to Fig. 1a, a total extra-column variance of only 100 μL² is sufficient to lose more than 70% of the column plates in UHPLC conditions. Consequently, these results clearly underline the importance of finding the best trade-off between the split ratio which must be high enough, the flow entering ICP-MS which must be low enough and the column flow-rate which must be adapted to UHPLC conditions (typically in the range 400–1000 μL/min). In any case, the additional extra-column dispersion brought by flow splitting should be carefully evaluated. Micro-concentric nebulizers can be considered as a good option for the coupling of UHPLC with ICP-MS since they avoid the need for low split ratios. Such nebulizers usually work with flow-rates of around hundreds μL/min as those required with narrow bore columns. On the other hand, the use of a flow splitter in association with a total consumption spray chamber operated at around 10 μL/min, seems inappropriate for UHPLC purposes.

5. Conclusion and future trends

Within the last number of decades, analytical techniques have evolved from the simple determination of the total amount of a metal element to the determination of its chemical species. In

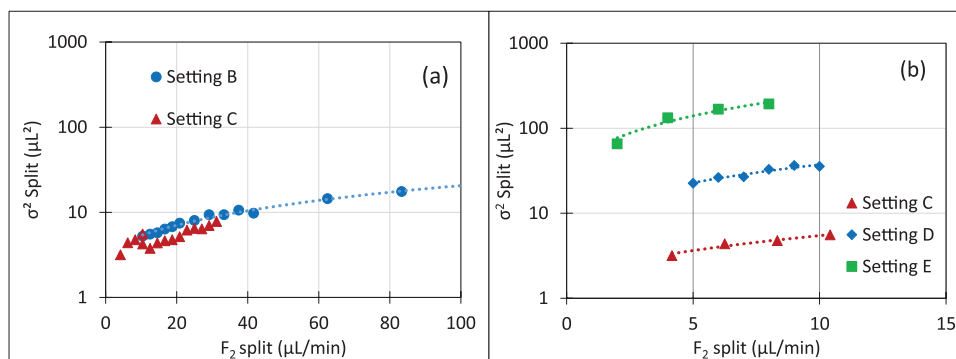


Fig. 5. Variation of the variance due to the split (σ^2_{split}) with F_2 . (a) effect of the tube i.d. (25 μm and 65 μm) considering the same split ratio (1:4.8). (b) effect of the split ratio (1:4.8, 1:9.4 and 1:50). Same other conditions as in Fig. 4.

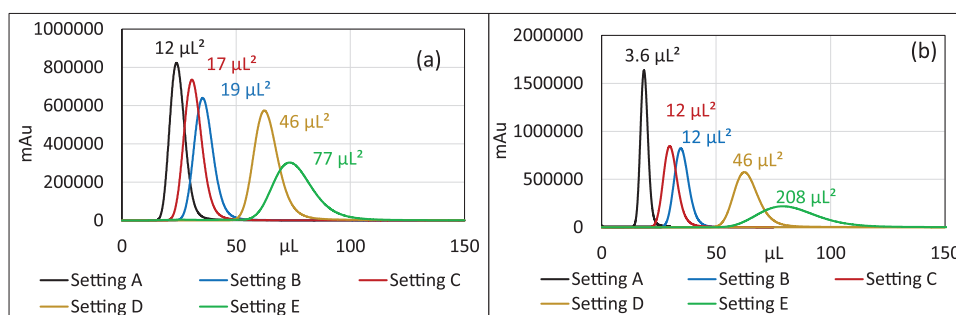


Fig. 6. Overlay of the peaks obtained in Detector 2 with settings A, B, C, D and E. (a) Same F_1 (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) resulting in different F_2 (100, 20.8, 20.8, 10.6, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectively) and (b) different F_1 (10, 50, 50, 100, 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ respectively) resulting in same F_2 (10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Measured extra-column variance (σ^2_{ext}) is indicated at peak apex. Same other conditions as in Fig. 4.

speciation studies, ICP-MS is now routinely coupled with liquid chromatography (LC-ICP-MS).

Most applications are performed in an aqueous solvent and are therefore much easier to implement than those needing the introduction of a large amount of organic solvent into the plasma source. Unfortunately, very few analysts pay enough attention to the chromatographic aspects when coupling LC and ICP-MS. During method development, special attention should be focused on extra-column dispersion to minimize it, avoiding excessive dead volume. In view of this article, it clearly appears that efforts need to be made in this specific area before analyzing complex matrix. Indeed, the benefit of method development performed to enhance the analytical performance (resolution and sensitivity) could be lost if solute dispersion in the interface, located between separation and detection devices, is not minimized. A special attention must be paid to a better description of Sample Introduction System since it seems to be the critical part of the coupling and its characteristics are not always specified by the authors. For speciation analysis, it is highly recommended to thoroughly characterize the interface by evaluating extra column dispersion induced by SIS and ensuring that less than 20% plates are loss. This will be extensively discussed in Part II.

Flow splitting can be used with total consumption spray chambers to reduce the flow-rate prior to the sample introduction system but it must be sized properly. As shown in this study, a low split ratio can significantly increase solute dispersion and hence solute dilution. Micro-concentric nebulizers are expected to be more appropriate with possible flow-rates of around hundreds $\mu\text{L}/\text{min}$, thus without the need of flow splitting. Such nebulizers will be compared in the second part of this study which will be devoted to the comparison of commercially available Sample Introduction Systems in term of extra-column dispersion.

A last interesting point, in our view, is the impact of extra-column peak broadening on the whole analytical performance when using more complex hyphenated techniques such as 2D-LC-ICP-MS. In the future, if online comprehensive two-dimensional separations are more extensively developed, a particular attention should be paid to the set-up so that every additional dead volume could be assessed in terms of additional dispersion.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.024>.

References

- [1] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for Terms Related to Chemical Speciations and Fractionation of Elements: Definitions, Structural Aspects, and Methodological Approaches (IUPAC Recommendations 2000), 2000.
- [2] B. Michalke, Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2003) 122–139, [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00056-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00056-3).
- [3] M. Grotti, A. Terol, J.I. Todolí, Speciation analysis by small-bore HPLC coupled to ICP-MS, *Trends Anal. Chem.* 61 (2014) 92–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.009>.
- [4] A.A. Ammann, Arsenic speciation by gradient anion exchange narrow bore ion chromatography and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2111–2116, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.086>.
- [5] K.O. Amayo, A. Petursdottir, C. Newcombe, H. Gunnlaugsdottir, A. Raab, E.M. Krupp, J. Feldmann, Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICPMS and high-resolution electrospray MS without species-specific standards, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3589–3595, <http://dx.doi.org/10.1021/ac2005873>.
- [6] R. Lohmayer, G.M.S. Reithmaier, E. Bura-Nakić, B. Planer-Friedrich, Ion-pair chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry

- (IPC-ICP-MS) as a method for thiomolybdate speciation in natural waters, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3388–3395, <http://dx.doi.org/10.1021/ac5046406>.
- [7] S.F. Boulyga, V. Loreti, J. Bettmer, K.G. Heumann, Application of SEC-ICP-MS for comparative analyses of metal-containing species in cancerous and healthy human thyroid samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 198–203, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2699-6>.
 - [8] V. Vargas, J. Castillo, R. Ocampo Torres, B. Bouysiere, C.-P. Lienemann, Development of a chromatographic methodology for the separation and quantification of V, Ni and S compounds in petroleum products, *Fuel Process. Technol.* 162 (2017) 37–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2017.03.027>.
 - [9] Y. Nygren, P. Hemström, C. Åstot, P. Naredi, E. Björn, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) utilizing a mobile phase with a low-volatile organic modifier for the determination of cisplatin, and its monohydrolyzed metabolite, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 948–954, <http://dx.doi.org/10.1039/B716093C>.
 - [10] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, Retention of arsenic species on zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 817–825, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900738>.
 - [11] J. Delafiori, G. Ring, A. Furey, Clinical applications of HPLC-ICP-MS element speciation: a review, *Talanta* 153 (2016) 306–331, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.035>.
 - [12] L. Beuvier, Développement d'une méthode de séparation chromatographique couplée aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) : application à l'analyse de spéciation des lanthanides, phdthesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 2015 (Accessed 20 October 2016) <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01381095/document>.
 - [13] É.R. Pereira, J.F. Kopp, A. Raab, E.M. Krupp, Jdel C. Menoyo, E. Carasek, B. Welz, J. Feldmann, Arsenic containing medium and long chain fatty acids in marine fish oil identified as degradation products using reversed-phase HPLC-ICP-MS/ESI-MS, *J. Anal. Spectrom.* 31 (2016) 1836–1845, <http://dx.doi.org/10.1039/C6JA00162A>.
 - [14] B. Frindt, J. Mattusch, T. Reemtsma, A.G. Griesbeck, A. Rehorek, Multidimensional monitoring of anaerobic/aerobic azo dye based wastewater treatments by hyphenated UPLC-ICP-MS/ESI-Q-TOF-MS techniques, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24 (12) (2016) 10929–10938, <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7075-5>.
 - [15] K.L. Sutton, J.A. Caruso, Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 243–258, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00580-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00580-4).
 - [16] L. Bendahl, B. Gammelgaard, Sample introduction systems for reversed phase LC-ICP-MS of selenium using large amounts of methanol—comparison of systems based on membrane desolvation, a spray chamber and direct injection, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 410–416, <http://dx.doi.org/10.1039/B415717F>.
 - [17] L.I.L. Balcaen, B. De Samber, K. De Wolf, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, Hyphenation of reverse-phase HPLC and ICP-MS for metabolite profiling—application to a novel antituberculosis compound as a case study, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 777–786, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1303-2>.
 - [18] K.D. Wolf, L. Balcaen, E.V.D. Walle, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, A comparison between HPLC–dynamic reaction cell-ICP-MS and HPLC–sector field-ICP-MS for the detection of glutathione-trapped reactive drug metabolites using clozapine as a model compound, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 419–425, <http://dx.doi.org/10.1039/B921638C>.
 - [19] K.L. Ackley, K.L. Sutton, J.A. Caruso, A comparison of nebulizers for microbore LC-ICP-MS with mobile phases containing methanol, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1069–1073, <http://dx.doi.org/10.1039/B000986P>.
 - [20] S. Döker, İ.İ. Boşgelmez, Rapid extraction and reverse phase-liquid chromatographic separation of mercury(II) and methylmercury in fish samples with inductively coupled plasma mass spectrometric detection applying oxygen addition into plasma, *Food Chem.* 184 (2015) 147–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.067>.
 - [21] S. Trümpler, S. Nowak, B. Meermann, G.A. Wiesmüller, W. Buscher, M. Sperling, U. Karst, Detoxification of mercury species—an in vitro study with antidotes in human whole blood, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1929–1935, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-0073-2>.
 - [22] F. Moreno, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Simultaneous speciation and preconcentration of ultra trace concentrations of mercury and selenium species in environmental and biological samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 43–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.083>.
 - [23] B. Klencsár, E. Bolea-Fernandez, M.R. Flórez, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Determination of the total drug-related chlorine and bromine contents in human blood plasma using high performance liquid chromatography–tandem ICP-mass spectrometry (HPLC–ICP-MS/MS), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 112–119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.019>.
 - [24] B. Meermann, A. Hulstaert, A. Laenen, C. Van Looveren, M. Vliegen, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, HPLC/ICP-MS in combination with “Reverse” online isotope dilution in drug metabolism studies, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2395–2401, <http://dx.doi.org/10.1021/ac203165p>.
 - [25] B.P. Jensen, C.J. Smith, C. Bailey, C. Rodgers, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, Application of inductively coupled plasma mass spectrometry and high-performance liquid chromatography–with parallel electrospray mass spectrometry to the investigation of the disposition and metabolic fate of 2-, 3- and 4-iodobenzoic acids in the rat, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 809 (2004) 279–285, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.038>.
 - [26] H. Chen, J. Chen, W. Jin, D. Wei, Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1282–1287, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.134>.
 - [27] C. Gabel-Jensen, K. Lunø, K.G. Madsen, J. Bendix, C. Cornett, S. Stürup, H.R. Hansen, B. Gammelgaard, Separation and identification of the selenium-sulfur amino acid S-(methylseleno)cysteine in intestinal epithelial cell homogenates by LC-ICP-MS and LC-ESI-MS after incubation with methylseleninic acid, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 727–732, <http://dx.doi.org/10.1039/B715899H>.
 - [28] C. Gabel-Jensen, J. Odgaard, C. Skonberg, L. Badolo, B. Gammelgaard, LC-ICP-MS and LC-ESI-MS identification of Se-methylselenocysteine and selenomethionine as metabolites of methylseleninic acid in rat hepatocytes, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2008) 69–75, <http://dx.doi.org/10.1039/B807805J>.
 - [29] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, Separation of organoarsenicals by means of zwitterionic hydrophilic interaction chromatography (ZIC[®]-HILIC) and parallel ICP-MS/ESI-MS detection, *Eng. Life Sci.* 8 (2008) 582–588, <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200800041>.
 - [30] J. Far, H. Preud'homme, R. Lobinski, Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion–microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection, *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 175–190, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jca.2009.10.040>.
 - [31] T. Falta, G. Koellensperger, A. Standler, W. Buchberger, R.M. Mader, S. Hann, Quantification of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP-SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1336–1342, <http://dx.doi.org/10.1039/B907011G>.
 - [32] T. Grevenstuck, P. Flis, L. Ouerdane, R. Lobinski, A. Romano, Identification of the tri-Al tricitrate complex in plantago almoravensis by hydrophilic interaction LC with parallel ICP-MS and electrospray orbitrap MS/MS detection, *Metallomics* 5 (2013) 1285–1293, <http://dx.doi.org/10.1039/C3MT00101F>.
 - [33] R. Rellán-Álvarez, J. Giner-Martínez-Sierra, J. Orduna, I. Orera, J.A. Rodríguez-Castrillón, J.L. García-Alonso, J. Abadía, A. Álvarez-Fernández, Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: New insights into plant iron long-distance transport, *Plant Cell Physiol.* 51 (2010) 91–102, <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcp170>.
 - [34] J. Vidmar, A. Martinčič, R. Milačič, J. Ščančar, Speciation of cisplatin in environmental water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 138 (2015) 1–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.008>.
 - [35] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercouter, F. Chartier, Tutorial: introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: a tutorial review, Part I Theor. Consid. Anal. Chim. Acta 885 (2015) 33–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jca.2015.03.049>.
 - [36] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercouter, F. Chartier, Tutorial: introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: a tutorial review, Part II Pract. Consid. Anal. Chim. Acta 885 (2015) 57–91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jca.2015.04.039>.
 - [37] B. Klencsár, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Development and validation of a novel quantification approach for gradient elution reversed phase high-performance liquid chromatography coupled to tandem ICP-mass spectrometry (RP-HPLC-ICP-MS/MS) and its application to diclofenac and its related compounds, *Anal. Chim. Acta* 974 (2017) 43–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jca.2017.04.030>.
 - [38] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 108 (1975) 229–241, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)84666-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)84666-X).
 - [39] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289, [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509\(56\)80003-1](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1).
 - [40] J.H. Knox, M. Saleem, Kinetic conditions for optimum speed and resolution in column chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 7 (1969) 614–622, <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/7.10.614>.
 - [41] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems, *J. Chromatogr. A* 165 (1979) 3–30, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85726-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85726-X).
 - [42] A. D'Attoma, C. Grivel, S. Heinisch, On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: orthogonality and practical peak capacity considerations, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 148–159, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.028>.
 - [43] M. Wind, A. Eisenmenger, W.D. Lehmann, Modified direct injection high efficiency nebulizer with minimized dead volume for the analysis of biological samples by micro- and nano-LC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 21–26, <http://dx.doi.org/10.1039/B108153P>.
 - [44] Z. Stefánka, G. Koellensperger, G. Stinger, S. Hann, Down-scaling narrowbore LC-ICP-MS to capillary LC-ICP-MS: a comparative study of

- different introduction systems, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 86–89, <http://dx.doi.org/10.1039/B511629E>.
- [45] G. Zoorob, M. Tomlinson, J. Wang, J. Caruso, Evaluation of the direct injection nebulizer in the coupling of high-performance liquid chromatography to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 853–858, <http://dx.doi.org/10.1039/JA9951000853>.
- [46] P. Giusti, D. Schaumlöffel, J.R. Encinar, J. Szpunar, Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 1101–1107, <http://dx.doi.org/10.1039/B506620D>.
- [47] S.S. Kannamkumarath, R.G. Wuilloud, A. Stalcup, J.A. Caruso, H. Patel, A. Sakr, Determination of levothyroxine and its degradation products in pharmaceutical tablets by HPLC-UV-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 107–113, <http://dx.doi.org/10.1039/B307970H>.
- [48] L. Rottmann, K.G. Heumann, Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 221–227, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00322473>.
- [49] G. Raber, R. Raml, W. Goessler, K.A. Francesconi, Quantitative speciation of arsenic compounds when using organic solvent gradients in HPLC-ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 570–576, <http://dx.doi.org/10.1039/B921881E>.
- [50] J.-L. Todoli, J.-M. Mermet, *Liquid Sample Introduction in ICP Spectrometry: A Practical Guide*, Elsevier Science, Amsterdam, 2008.
- [51] B.W. Acon, J.A. McLean, A. Montaser, A direct injection high efficiency nebulizer interface for microbore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 852–857, <http://dx.doi.org/10.1039/B103085J>.
- [52] J.L. Todoli, M. Grotti, Fast determination of arsenosugars in algal extracts by narrow bore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 1217 (2010) 7428–7433, n.d.
- [53] K.E. Lokits, P.A. Limbach, J.A. Caruso, Interfaces for capillary LC with ICPMS detection: a comparison of nebulizers/spray chamber configurations, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 528–534, <http://dx.doi.org/10.1039/B820121H>.
- [54] Juan Manuel Marchante-Gayo, Christoph Thomas, Ingo Feldmann, Norbert Jakubowski, Comparison of different nebulizers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision an react cell ICP-MS, *J. Anal. Spectrom.* 15 (2000) 1093–1102, <http://dx.doi.org/10.1039/b002372h>.
- [55] L.H. Møller, A. Macherius, T.H. Hansen, H.M. Nielsen, C. Cornett, J. Østergaard, S. Stürup, B. Gammelgaard, Quantification of pharmaceutical peptides in human plasma by LC-ICP-MS sulfur detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1877–1884, <http://dx.doi.org/10.1039/C6JA00132G>.
- [56] B.-O. Axelsson, M. Jörnten-Karlsson, P. Michelsen, F. Abou-Shakra, The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry detection for high-performance liquid chromatography combined with accurate mass measurement of organic pharmaceutical compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 375–385, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.238>.
- [57] B.P. Jensen, B. Gammelgaard, S.H. Hansen, J.V. Andersen, Comparison of direct injection nebulizer and desolvating microconcentric nebulizer for analysis of chlorine-, bromine- and iodine-containing compounds by reversed phase HPLC with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 891–896, <http://dx.doi.org/10.1039/B304651F>.
- [58] J. Chen, H. Chen, X. Jin, H. Chen, Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction preconcentration, *Talanta* 77 (2009) 1381–1387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.021>.
- [59] D.S. Vidler, R.O. Jenkins, J.F. Hall, C.F. Harrington, The determination of methylmercury in biological samples by HPLC coupled to ICP-MS detection, *Appl. Organomet. Chem.* 21 (2007) 303–310, <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.1173>.
- [60] M. Birka, C.A. Wehe, L. Telgmann, M. Sperling, U. Karst, Sensitive quantification of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in surface waters using hydrophilic interaction liquid chromatography and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1308 (2013) 125–131, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.017>.
- [61] L. Telgmann, C.A. Wehe, J. Künemeyer, A.-C. Bültner, M. Sperling, U. Karst, Speciation of Gd-based MRI contrast agents and potential products of transmetalation with iron ions or parenteral iron supplements, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2133–2141, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6404-x>.
- [62] P. Hemström, Y. Nygren, E. Björn, K. Irgum, Alternative organic solvents for HILIC separation of cisplatin species with on-line ICP-MS detection, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 599–603, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200700480>.
- [63] S. Trümpler, W. Lohmann, B. Meermann, W. Buscher, M. Sperling, U. Karst, Interaction of thimerosal with proteins—ethylmercury adduct formation of human serum albumin and β -lactoglobulin A, *Metallomics* 1 (2009) 87–91, <http://dx.doi.org/10.1039/B815978E>.
- [64] J. Hogeback, M. Schwarzer, C.A. Wehe, M. Sperling, U. Karst, Investigating the adduct formation of organic mercury species with carbonic anhydrase and hemoglobin from human red blood cell hemolysate by means of LC/ESI-TOF-MS and LC/ICP-MS, *Metallomics* 8 (2016) 101–107, <http://dx.doi.org/10.1039/C5MT00186B>.
- [65] S.C. Shum, R. Neddersen, R.S. Houk, Elemental speciation by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization, *Analyst* 117 (1992) 577–582.
- [66] G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdrignac, H. Paucot, B. Bouysiere, R. Lobinski, Sensitivity improvement in ICP MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow nebulizer and heated spray chamber sample introduction, *Talanta* 80 (2009) 1039–1043, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.08.017>.
- [67] M. Wind, A. Eisenmenger, W.D. (analytic) Lehmann, Modified direct injection high efficiency nebulizer with minimized dead volume for the analysis of biological samples by micro- and nano-LC-ICP-MS, *J. Anal. Spectrom.* Print 17 (2002) 21–26.
- [68] R.G. Brennan, S.-A.E.O. Murdock, M. Farmand, K. Kahen, S. Samii, J.M. Gray, A. Montaser, Nano-HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1199–1205, <http://dx.doi.org/10.1039/B703257A>.
- [69] L. Bendahl, B. Gammelgaard, O. Jøns, O. Farver, S.H. Hansen, Interfacing capillTotal consumption nebulizerary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry by direct injection nebulization for selenium speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2003) 38–42, <http://dx.doi.org/10.1039/B007137O>.
- [70] A. D'Attoma, Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés, 1, 2013, Lyon <http://www.theses.fr/2013LYO10214> (Accessed 28 April 2016).
- [71] Kurt Hofmann, István Halasz, Mass transfer in ideal and geometrically deformed open tubes. I. Ideal and coiled tubes with circular cross section, *J. Chromatogr. A* 173 (1979) 211–228, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92292-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92292-1).

Supplementary information for

Suitable interface for coupling Liquid Chromatography to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 theoretical and experimental considerations on solute dispersion.

Marie Bernardin^{1,2}, Frédérique Bessueille-Barbier¹, Agnès Le Masle², Charles-Philippe Lienemann², Sabine Heinisch^{*1}

(1) Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, ENS Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

(2) IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize France

* Corresponding author : Tel : +33 437 423 551 ;

E-mail address : sabine.heinisch@univ-lyon1.fr (Sabine Heinisch)

Table S1. Reported LC-ICP-MS studies on organic matrices, corresponding to those for which the evaluation of the percentage of remaining plates (β^2) was not possible. Explanations are given by letters (b) , (c), (d) or (e). Other studies are listed in Table 2 of the main manuscript.

[Ref] Figure	S,ample	LC conditions (Elution mode, column dimension, gradient)	Nebulizer		Spray chamber			β^2 (%)
			Type	Brand	Type	Brand	Cooling	
Conventional column								
[1] (Fig 2) ^(e)	Standards and water sample, Se, Hg	RPLC, C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m), F = nd Gradient (Phase A: 0.14 %(v/v) 2-mercaptoethanol in 50 mM ammonium acetate at pH 4.6, Phase B: MeOH)	Micro-concentric	MicroMist	nd	nd	nd	nc
[2] ^(b)	Standards Crude oil, As, ⁵¹ V, ⁶⁰ Ni	RPLC, C18 (125 x 4 mm, 5 μ m), 1000 μ L/min 3 Gradients (Phase A: MeOH, Phase B: CHCl ₃ or DCM or THF)	Concentric nebulizer	nd	Cyclonic	nd	-5°C	nc
[3] ^(b)	Commercial tablet, chinese tea, ⁸⁰ Se, ⁷⁸ Se, ⁷⁷ Se	RPLC, C18 (250 x 4 mm, 5 μ m), 750 μ L/min Isocratic (30 mM ammonium formate, pH 3, 5 % v/v MeOH)	nd	Meinhard nebulizer	Double pass	nd	nd	nc
[3] ^(b)			HHPN	nd	Desolvation unit	nd	nd	nc
Narrow bore column								
[4] ^(c)	Blood plasma, Fe	RPLC, Hypercarb (150 x 3 mm, 3 μ m), 250 μ L/min Isocratic (Phase A: 25 mmol/L aqueous ammonium acetate, Phase B: ACN, 30 % A and 70 % B)	Micro-concentric	PFA microflow ST	Cyclonic	nd	-5°C	nc
[5] ^(b)	Human blood plasma Diclofenac-	RPLC, C18 (50 x 3 mm, 3.5 μ m), 1000 μ L/min 2 isocratic steps (Phase A: 0.5 % formic acid in water, Phase B: 0.5 % formic acid in MeOH)	Micro-concentric	PFA-LC	Scott Double pass	nd	nd	nc

[Ref] Figure	S,ample	LC conditions (Elution mode, column dimension, gradient)	Nebulizer		Spray chamber			β^2 (%)
			Type	Brand	Type	Brand	Cooling	
	sodium, Cl, Br							
[6] ^(d)	Standards, ⁷⁵ As	Anion exchange, (150 x 2.1 mm, 5 μ m), 400 μ L/min Gradient (Phase A: 20 mM phosphate buffer Phase B: 20 mM phosphate containing 50 %)	Parallel Path	Burgener AriMist HP	Double pass	nd	nd	nc
[7] ^(c)	Drug metabolite Clozapine, Cl, S	RPLC, C18 (50 x 2.1 mm, 3 μ m), 200 μ L/min Gradient (Phase A: 0.1 mol/L NH ₄ Ac, Phase B: 10 % 1 mol/L NH ₄ Ac, 90 % CH ₃ OH)	Micro-concentric	PFA-LC	Cyclonic	PC3	2°C	nc
[8] ^(e)	Cisplatin Water sample, ¹⁹⁵ Pt	HILIC, (nd x 2.1 mm, nd), 300 μ L/min Gradient (Phase A: 95 % n-propanol + 5 % 20 mM ammonium formate, Phase B: 50 % n-propanol + 50 % 20 mM ammonium formate Phase C: 100 mM ammonium acetate)	Micro-concentric	Micromist	Scott double pass	nd	nd	nc
[3] (Fig 1) ^(e)	Standards, ⁸⁰ Se	RPLC, C18 (250 x 2.1 mm, nd), 175 μ L/min Isocratic (30 mM ammonium formate, pH 3, 5 % v/v MeOH)	Micro-concentric	MCN-600	Desolvation unit	nd	nd	nc
[9] ^(c)	Standards, ⁷⁵ As	HILIC, (150 x 2.1 mm, 3.5 μ m), 50-500 μ L/min Isocratic (ACN/H ₂ O (85/15) or (75/25) + AA (0 - 37.5 mM) + FA (0-37.5 mM))	Micro-concentric	nd	Scott type	nd	nd	nc
[10] ^(c)	Standards, Pt	HILIC (150 x 2.1 mm, nd), 100 μ L/min Isocratic (80 % ACN/20 % 25 mM ammonium acetate, pH 6.5)	Parallel path	MiraMist	Cyclonic	nd	5°C	nc
[11] ^(c)	Standards, Pt	RPLC, (150 x 2.1 mm, 3 μ m), 250 μ L/min Isocratic (10 mM ammonium formate containing 2 % v/v % MeOH)	Micro-concentric	PFA-ST	Cyclonic	nd	nd	nc
[12] ^(d)	Eptihelial cells, ⁸² Se	RPLC, C18 (100 x 2 mm, 3 μ m), 200 μ L/min Isocratic (0.1 % formic acid in 10 % MeOH) Gradient (Phase A: 0.1 % formic acid 2 % MeOH, Phase B: 0.1% formic acid in 50 % MeOH)	Micro-concentric	MicroMist	cyclonic spray chamber	PC3	4°C	nc
[13] ^(b)	Human blood plasma Hg	RPLC, C18 (30 x 2 mm, 2.2 μ m), 300 μ L/min Gradient (Phase A: 0.1 % formic acid Mobile phase B: MeOH)	nd	Meihnard nebulizer	nd	PC3	nd	nc
Microbore column								
[11] ^(c)	Standards, Pt	RPLC, (150 x 1 mm, 3 μ m), 60 μ L/min Isocratic (10 mmol/L ammonium formate (pH 3.75) containing 2 % v/v % MeOH)	Micro-concentric	PFA-ST	Cyclonic	nd	nd	nc
			Micro-concentric	PFA-ST	nd	MCN6000	nd	nc
			nd	AriMist	Cycloni	nd	nd	nc
			Total consumption nebulizer Direct injection nebulizer					nc
[14] ^(b)	Root and leaf, ²⁷ Al, ³¹ P, ⁵⁶ Fe	HILIC, (250 x 1 mm, nd), 50 μ L/min Gradient (Phase A: 10 mM ammonium formate, Phase B: ACN)	Micro-concentric	MicroMist Userie	Cyclonic	Cinnabar	nd	nc
[15] ^(b)	Standards Dolphin liver, ²⁰² Hg, ⁶³ Cu, ⁶⁴ Zn, ¹¹¹ Cd	HILIC, (250 x 1 mm, 5 μ m), 50 μ L/min Gradient (Phase A: ACN, Phase B: 5 mM ammonium acetate)	Micro-concentric	MicroMist nebulizer	Cyclonic	IsoMist Cinnabar	2°C	nc
[16] (Fig 2) ^(e)	Standards, ⁷⁹ Br, ¹²⁷ I	RPLC, C18 (100 x 1 mm, 3 μ m), F = nd Emulation of a gradient by changing the conditions and the type of solvent	Total consumption nebulizer Direct injection nebulizer					nc

[Ref] Figure	S,ample	LC conditions (Elution mode, column dimension, gradient)	Nebulizer		Spray chamber			β^2 (%)
			Type	Brand	Type	Brand	Cooling	
[17] ^(b)	Strain of Saccharom yces cerevisiae Selenized yeast, ⁸⁰ Se, ⁷⁸ Se, ⁷⁷ Se	HILIC, (150 x 1 mm, 5 μ m), 50 μ L/min Isocratic (80 % ACN + 20 % 1 mM ammonium acetate in water + 10 mM acetic acid)	Modified total consumption nebulizer with a low dead volume vaporization chamber					nc
		NP, (300 x 1 mm, 5 μ m), 50 μ L/min Isocratic (80 % ACN + 20 % 2.5 mM ammonium acetate in water + 25 mM acetic acid)	nd	Meinhard nebulizer	Cyclonic	nd	nd	nc
[18] ^(c)	Standards Biological sample Yeast from saccaharo myces cerevisiae culture, ⁷⁷ Se	RPLC, C18 and C4 300 Å (150 x 1 mm, 5 μ m), 50 μ L/min Gradient	Micro-concentric nebulizer	laboratory made	Desoltation unit	Cetac U-6000 AT	nd	nc
			Micro-concentric nebulizer	laboratory made	cyclonic spray chamber	nd	25°C	nc
			Total consumption nebulizer DIN					nc
Capillary column								
[11] ^{(a), (c)}	Standards, Pt	RPLC, (150 x 0.32 mm, 3 μ m), 63 μ L/min Isocratic (10 mmol/L ammonium formate (pH 3.75) containing 2 % v/v % MeOH)	nd	PFA005	Cyclonic	nd	nd	nc
			nd	PFA005	Micro-Cyclonic	nd	nd	nc
			nd	PFA005	nd	MCN600	nd	nc
			nd	CEI100	nd	nd	nd	nc
			nd	AriMist	Cyclonic	nd	nd	nc
[19] ^(b)	Standards, As	RPLC, C18 (50 x 0.3 mm,3.5 μ m), 0.9 μ L/min Isocratic (5.0 mM TBAP, pH 5.9)	Total consumption nebulizer d-DIHEN home made					nc
[20] (Fig 2) ^(e)	Standards, ⁶ Li, ⁸⁹ Y, ²⁰⁵ Tl, ³¹ P, ³² S	RPLC, C18 (100 x 0.3 mm, 3.5 μ m), 8 μ L/min Isocratic (50 % 50 mM HFIP (hexafluoro-2-propanol)/8 mM TEA (triethylamine)/water, pH 8.3 + 50 % 50 mM HFIP/8 mM TEA/ MeOH, pH 8.3)	Micro-concentric	Meinhard 90-HEN	In-House chamber single pass	nd	nd	nc
[21] ^(b)	Tryptic protein digest Beta casein digest, ³¹ P	RPLC, C18 (150 x 0.3 mm, 3.5 μ m), 3 μ L/min Gradient (Phase A: H ₂ O, 0.05 % TFA, Phase B: 20 % H ₂ O, 80 % MeOH, 0.05 % TFA	nd	nd	nd	nd	nd	nc
		RPLC, C18 (150 x 0.1 mm, 3.5 μ m), 0.5 μ L/min Gradient (Phase A: H ₂ O, 0.05 % TFA, Phase B: 20 % H ₂ O, 80 % MeOH, 0.05 % TFA)	nd	nd	nd	nd	nd	nc

nd : not determined or found in the literature

^(a) Flow splitting

^(b) poor peak shape

^(c) no chromatogram available

^(d) chromatogram clarity not sufficient

^(e) some required conditions not specified

References

- [1] F. Moreno, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Simultaneous speciation and preconcentration of ultra trace concentrations of mercury and selenium species in environmental and biological samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1300 (2013) 43–50. doi:10.1016/j.chroma.2013.02.083.
- [2] C.B. Duyck, T.D. Saint’Pierre, N. Miekeley, T.C.O. da Fonseca, P. Szatmari, High performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry for V and Ni quantification as tetrapyrroles, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 66 (2011) 362–367. doi:10.1016/j.sab.2011.05.002.
- [3] Juan Manuel Marchante-Gayo, Christoph Thomas, Ingo Feldmann, Norbert Jakubowski, Comparison of different nebulisers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision an react cell ICP-MS, *J Anal Spectrom.* 15 (2000) 1093–1102. doi:DOI: 10.1039/b002372h.
- [4] L. Telgmann, C.A. Wehe, J. Künemeyer, A.-C. Bülter, M. Sperling, U. Karst, Speciation of Gd-based MRI contrast agents and potential products of transmetalation with iron ions or parenteral iron supplements, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2133–2141. doi:10.1007/s00216-012-6404-x.
- [5] B. Klencsár, E. Bolea-Fernandez, M.R. Flórez, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Determination of the total drug-related chlorine and bromine contents in human blood plasma using high performance liquid chromatography–tandem ICP-mass spectrometry (HPLC–ICP-MS/MS), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 112–119. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.019.
- [6] G. Raber, R. Raml, W. Goessler, K.A. Francesconi, Quantitative speciation of arsenic compounds when using organic solvent gradients in HPLC-ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 570–576. doi:10.1039/B921881E.
- [7] K.D. Wolf, L. Balcaen, E.V.D. Walle, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, A comparison between HPLC-dynamic reaction cell-ICP-MS and HPLC-sector field-ICP-MS for the detection of glutathione-trapped reactive drug metabolites using clozapine as a model compound, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 419–425. doi:10.1039/B921638C.
- [8] J. Vidmar, A. Martinčič, R. Milačič, J. Ščančar, Speciation of cisplatin in environmental water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*. 138 (2015) 1–7. doi:10.1016/j.talanta.2015.02.008.
- [9] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, Retention of arsenic species on zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 817–825. doi:10.1002/jssc.200900738.
- [10] P. Hemström, Y. Nygren, E. Björn, K. Irgum, Alternative organic solvents for HILIC separation of cisplatin species with on-line ICP-MS detection, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 599–603. doi:10.1002/jssc.200700480.
- [11] Z. Stefánka, G. Koellensperger, G. Stingeder, S. Hann, Down-scaling narrowbore LC-ICP-MS to capillary LC-ICP-MS: a comparative study of different introduction systems, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 86–89. doi:10.1039/B511629E.
- [12] C. Gabel-Jensen, K. Lunøe, K.G. Madsen, J. Bendix, C. Cornett, S. Stürup, H.R. Hansen, B. Gammelgaard, Separation and identification of the selenium-sulfur amino acid S-

- (methylseleno)cysteine in intestinal epithelial cell homogenates by LC-ICP-MS and LC-ESI-MS after incubation with methylseleninic acid, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 727–732. doi:10.1039/B715899H.
- [13] S. Trümpler, S. Nowak, B. Meermann, G.A. Wiesmüller, W. Buscher, M. Sperling, U. Karst, Detoxification of mercury species—an in vitro study with antidotes in human whole blood, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1929–1935.
- [14] T. Grevenstuck, P. Flis, L. Ouerdane, R. Lobinski, A. Romano, Identification of the tri-Al tricitrate complex in *Plantago almogravensis* by hydrophilic interaction LC with parallel ICP-MS and electrospray Orbitrap MS/MS detection, *Metallomics*. 5 (2013) 1285–1293. doi:10.1039/C3MT00101F.
- [15] Z. Pedrero, L. Ouerdane, S. Mounicou, R. Lobinski, M. Monperrus, D. Amouroux, Identification of mercury and other metals complexes with metallothioneins in dolphin liver by hydrophilic interaction liquid chromatography with the parallel detection by ICP MS and electrospray hybrid linear/orbital trap MS/MS, *Metallomics*. 4 (2012) 473–479. doi:10.1039/C2MT00006G.
- [16] B.P. Jensen, B. Gammelgaard, S.H. Hansen, J.V. Andersen, Comparison of direct injection nebulizer and desolvating microconcentric nebulizer for analysis of chlorine-, bromine- and iodine-containing compounds by reversed phase HPLC with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 891–896. doi:10.1039/B304651F.
- [17] J. Far, H. Preud'homme, R. Lobinski, Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection, *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 175–190. doi:10.1016/j.aca.2009.10.040.
- [18] L. Bendahl, B. Gammelgaard, Sample introduction systems for reversed phase LC-ICP-MS of selenium using large amounts of methanol—comparison of systems based on membrane desolvation, a spray chamber and direct injection, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 410–416. doi:10.1039/B415717F.
- [19] R.G. Brennan, S.-A.E.O. Murdock, M. Farmand, K. Kahen, S. Samii, J.M. Gray, A. Montaser, Nano-HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1199–1205. doi:10.1039/B703257A.
- [20] K.E. Lokits, P.A. Limbach, J.A. Caruso, Interfaces for capillary LC with ICPMS detection: A comparison of nebulizers/spray chamber configurations, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 528–534. doi:10.1039/B820121H.
- [21] D. Pröfrock, P. Leonhard, W. Ruck, A. Prange, Development and characterisation of a new interface for coupling capillary LC with collision-cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 194–204. doi:10.1007/s00216-004-2930-5.

III. CONTRAINTES LIEES A L'INTRODUCTION DE SOLVANTS ORGANIQUES DANS LE PLASMA

L'introduction de solvants organiques dans le plasma est un défi instrumental. En effet, l'appareillage communément utilisé, employé dans le cas de matrices aqueuses, doit être adapté, afin de maximiser la sensibilité et de veiller à la robustesse du plasma [77]. La suite de cette section décrit les solutions qui peuvent être envisagées lors de l'introduction de solvants organiques pour améliorer la stabilité du plasma, éviter le dépôt de carbone sur les cônes et conserver une bonne sensibilité.

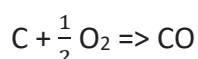
1. Stabilité du plasma

La stabilité du plasma va décroître lors de l'introduction de matrices organiques, par rapport aux matrices aqueuses, ce qui est dû à la grande volatilité des solvants organiques et à leur faible tension de surface [78]. Lors de la mise en place de ce type de couplage il est nécessaire de minimiser la quantité de solvant entrant dans le plasma par unité de temps (solvent load) [77]. En effet, une trop grande quantité de solvant dans le plasma peut, en plus d'impacter sa stabilité, provoquer une extinction complète de celui-ci. Plusieurs solutions sont envisageables pour pallier un tel problème :

- une réduction du débit de phase mobile dans le plasma, soit en utilisant des colonnes chromatographiques de faibles diamètres internes [79,80], soit en utilisant un diviseur de débit (split) en entrée du nébuliseur [79],
- l'utilisation d'un nébuliseur micro-concentrique associé à une membrane de désolvatation pour réduire la quantité de solvant entrant dans le plasma. En revanche, cette association présente l'inconvénient d'être parfois discriminante en fonction des analytes étudiés [77],
- l'utilisation d'un nébuliseur à injection directe où de très faibles débits de phases mobiles sont nécessaires [77].

2. Dépôt de carbone sur les cônes

Les espèces riches en carbone, contenues dans les solvants organiques, se retrouvent dans le plasma : C, C₂, CH. Celui-ci est caractérisé généralement par des propriétés réductrices qui vont conduire à la formation d'un dépôt de carbone sur : l'injecteur, les cônes écorceurs et échantillonneurs, ainsi que sur les lentilles. Malheureusement, les cônes sont donc susceptibles de se boucher en présence de ce dépôt et de provoquer l'extinction du plasma. Pour éviter la formation de charbon et éviter le dépôt sur les cônes de l'ICP-MS/MS, l'ajout d'oxygène va permettre la formation d'un plasma légèrement oxydant et ainsi la combustion du carbone, selon la réaction :



O₂ est aussi parfois appelé gaz « optionnel » ou encore gaz « additionnel ». Pour mieux résister à ce plasma oxydant, le matériau des cônes doit donc être modifié par rapport à celui utilisé en présence de matrices aqueuses (cônes en nickel). Dans ce cas précis, des cônes de platine sont utilisés, le platine étant plus inerte que le nickel et plus résistant aux conditions oxydantes. D'autre part, le platine présente un bon compromis entre conductibilité thermique et point de fusion, par rapport à d'autres métaux utilisés parfois en ICP (nickel, cuivre ou encore aluminium). Avec une conductibilité thermique élevée de 720 W/m°C par rapport à celle du nickel, du cuivre, et de l'aluminium, respectivement 91 W/m°C, 401 W/m°C, 237 W/m°C, il est possible de mieux refroidir les cônes au contact du plasma. Le platine possède de plus une température de fusion assez élevée (de l'ordre de 1770 °C) qui confère aux cônes un assez bon maintien dans le temps.

En revanche, une trop grande concentration d'oxygène peut mener à la formation d'espèces polyatomiques conduisant à des interférences et peut endommager les cônes en platine. La quantité d'oxygène à ajouter va varier avec le type de solvant utilisé et particulièrement avec la longueur de sa chaîne carbonée. Ainsi, plus la chaîne est longue, plus la quantité d'oxygène nécessaire pour éviter le dépôt de carbone sera importante. L'oxygène peut être introduit dans le système via plusieurs types d'instrumentation [77] :

- une connexion en T, entre la sortie de la chambre de nébulisation et l'entrée de l'injecteur [81],
- un mélange effectué au niveau de l'arrivée de gaz dans le nébuliseur [82].

Plusieurs techniques visuelles ont été reportées à ce jour dans la littérature pour optimiser le débit de ce gaz [77] :

- inspection du dépôt de carbone sur les différents instruments (cônes, injecteur),
- visualisation du plasma pour éviter la formation d'une zone verte correspondant à l'émission de C₂ [77].

Il est important de noter que dans la littérature, les voies d'introduction de ce gaz additionnel ne sont pas toujours correctement décrites ou pas toujours mentionnées. Une autre solution proposée dans la littérature pour éviter la formation d'un tel dépôt de carbone est la réduction du débit de phase mobile avec les mêmes solutions que celles citées précédemment [77] (utilisation de nébuliseurs micro-concentriques, utilisation d'un diviseur de débit en amont du nébuliseur).

3. Conservation de la sensibilité

La sensibilité de la méthode est une contrainte à prendre en compte lors de la réalisation d'un couplage LC-ICP/MS et l'optimisation de certains paramètres va permettre un gain en sensibilité dans le cas de l'introduction de matrices organiques : la puissance de la radiofréquence, les dimensions de l'injecteur, la distance entre l'injecteur et le plasma

(sampling depth), les débits de gaz de nébulisation (nebulizer gas flow rate) et de phase mobile (sample uptake rate), les débits de gaz additionnel (O_2), ainsi que la température de la chambre de nébulisation. Ces paramètres sont représentés sur la Figure 1-11.

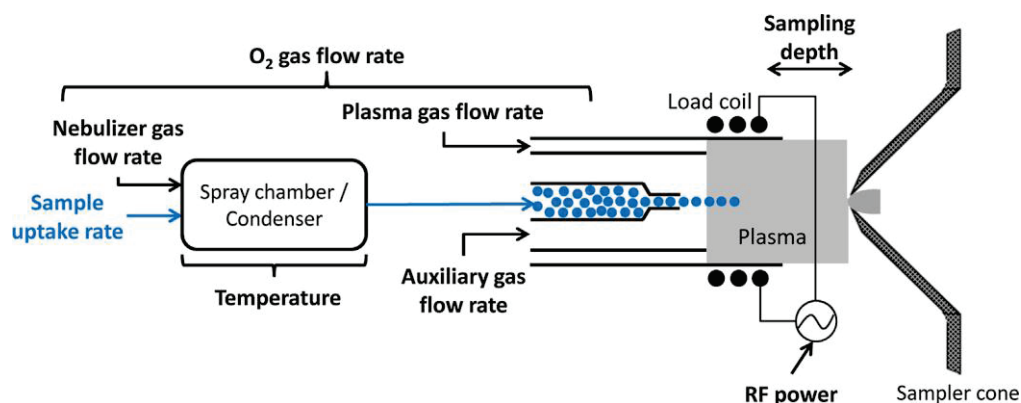


Figure 1-11 : Paramètres opératoires influants sur la sensibilité en ICP-MS
[84]

3.1. Puissance du générateur de radiofréquence

Le plasma, souvent considéré comme un quatrième état de la matière, peut être défini comme un gaz à haute température (6000 K), avec une forte densité d'ions et d'électrons libres, électriquement neutre. Le plasma à courant induit est maintenu par une énergie fournie sous forme de champ électrique par un générateur de radiofréquence. L'optimisation de ce paramètre va permettre l'obtention d'un plasma robuste avec un maximum de sensibilité. Il a été montré que dans le cas de l'ICP-MS, la tendance générale est de travailler entre 1.2–1.4 kW [77] dans le cas des applications en milieux organiques (une augmentation d'environ 500 W est à noter par rapport aux valeurs appliquées dans le cas des matrices aqueuses). Cette tendance peut être expliquée par le besoin de compenser la diminution de la température du plasma et l'augmentation de la densité du nombre d'électrons due à la dissociation des espèces carbonées dans le cas des matrices organiques [77,82,83].

3.2. Sampling depth et dimension de l'injecteur

L'injecteur est un constituant de la torche à plasma qui permet l'introduction de l'aérosol finement formé, en sortie de chambre de nébulisation, dans le plasma. La position de l'injecteur par rapport aux cônes ainsi que son diamètre interne sont des paramètres qui ont leur importance lors de l'optimisation des conditions de fonctionnement de l'ICP-MS mais qui sont étroitement liés à d'autres paramètres tels que la puissance du générateur de radiofréquence mais aussi le débit de gaz de nébulisation (Figure 1-12). En effet, lors de l'utilisation de matrices organiques, cette distance est à optimiser en fonction des applications. Aucune tendance n'a pu être tirée de la littérature car les choix dépendent des applications et du pourcentage de solvant organique introduit dans le plasma [77,78]. En

revanche, de faibles diamètres d'injecteur sont à envisager dans le cas des matrices organiques (1 mm) par rapport aux matrices aqueuses (2.5 mm) [82].

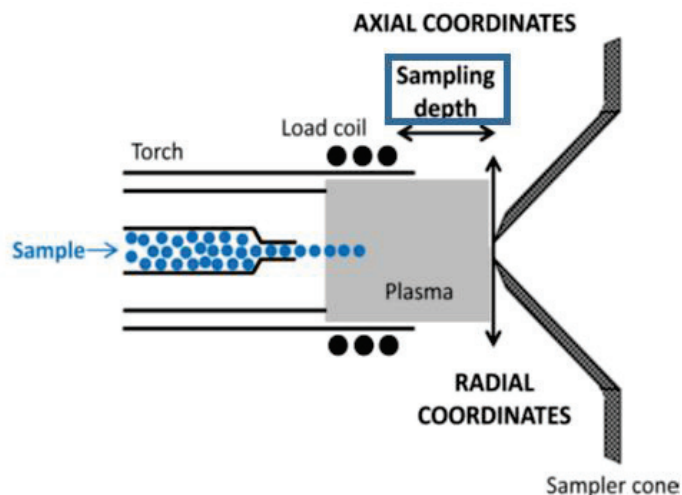


Figure 1-12 : Représentation schématisée de l'introduction de l'échantillon dans le plasma (sample depth) [84]

3.3. Débit du gaz de nébulisation

Plusieurs stratégies pour optimiser les conditions d'analyses en présence de matrices organiques sont référencées à ce jour dans la littérature [77]. La réduction de la quantité de solvant introduite dans le plasma et l'augmentation du temps de séjour de l'aérosol dans le plasma sont les paramètres mis en avant par les auteurs. Ces conditions peuvent être atteintes en modifiant soit le débit d'introduction de l'échantillon soit le débit du gaz de nébulisation.

Le débit de gaz de nébulisation est considéré comme un paramètre critique, et par conséquent nécessite une attention particulière. Généralement des faibles débits de nébulisation sont appliqués dans le cas des matrices organiques par rapport aux matrices aqueuses, en lien avec la réduction du diamètre de la torche à plasma. Il est admis qu'un faible débit de nébulisation (< 0.6 L/min) améliore les propriétés du plasma (robustesse) et ce par :

- une réduction de la vitesse de l'aérosol,
- une augmentation du temps de séjour dans le plasma [77,82].

3.4. Choix de la température de la chambre de nébulisation

Un autre paramètre à prendre en compte est la température de la chambre de nébulisation [85]. Dans le but de réduire la quantité de solvant entrant dans le plasma, il est important de noter que deux cas de figure sont reportés à ce jour dans la littérature [77] :

- (i) Une diminution de la température de la chambre de nébulisation va permettre de réduire la quantité de solvant entrant dans le plasma. Une chambre de nébulisation

refroidie va permettre d'éviter une discrimination des composés dans la chambre. Dans le cas des produits pétroliers par exemple, les composés légers sont envoyés en majorité dans le plasma si la chambre n'est pas refroidie, contrairement aux composés lourds qui vont avoir du mal à atteindre le plasma. Un tel refroidissement permet de limiter les différences de volatilité entre espèces. Dans le cas d'analyses de spéciation RPLC-ICP-MS, bien qu'une température négative permette une réduction drastique de la quantité de solvant introduite dans le plasma, la température conseillée est en général aux environs de 2 °C dans le but d'éviter la congélation de l'eau présente dans les mélanges de solvant utilisés en RPLC. En effet, la phase mobile dans le cas d'un couplage avec la chromatographie liquide en phase inverse étant au début du programme d'élution, en majorité en phase aqueuse, des températures négatives engendreraient la formation de glace dans la chambre de nébulisation [86].

- (ii) D'autre part, un chauffage important de la chambre de nébulisation est envisageable dans le but de volatiliser tous les composés et de les envoyer dans leur totalité dans le plasma (cas des produits pétroliers avec un instrument du type : h-TISIS constitué d'un nébuliseur, d'une chambre de nébulisation (Scott), et d'un injecteur). Chauffé entre 100 et 350 °C, ce système améliore en grande partie le transport de l'analyte, en augmentant la sensibilité et en diminuant les interférences non spectrales [77].

3.5. Gestion de la phase mobile hydro-organique

Les analyses de spéciation peuvent être effectuées en utilisant plusieurs techniques chromatographiques et en utilisant plusieurs mécanismes de rétention. La majorité de ces analyses sont réalisées en milieu aqueux et utilise la chromatographie d'échange d'ions sur des échantillons environnementaux [87]. Dans ce cas particulier, la phase mobile n'est pas un problème lors du couplage des deux techniques. En effet, la quantité de solvant organique dans la phase mobile est limitée. Cependant, lorsque l'on utilise la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) [86,88–99], la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) [100–107], une grande quantité de solvant organique peut être introduite dans le plasma et la quantité de solvant introduite peut varier au cours du temps. Les auteurs ont souligné les effets majeurs de la proportion en solvant organique, sur le signal ICP-MS, tout au long de l'élution en mode gradient [77,108,109]. Deux méthodes différentes ont été rapportées dans la littérature pour traiter ce problème. La première est une approche basée sur l'ajout d'un gradient d'oxygène optimisé, en parallèle à un gradient de solvants. Néanmoins, le développement de ce type de méthode est décrit, par les auteurs, comme empirique et fastidieux. En outre, le débit d'oxygène est crucial et toute modification de ce débit peut engendrer des changements significatifs en sensibilité [108]. L'objectif de la deuxième méthode proposée, est de maintenir constante la quantité de solvant organique atteignant le plasma, en introduisant dans la chambre de nébulisation un flux de solvant supplémentaire [109]. Cette méthode permet d'éviter les changements de sensibilité dus à la concentration variable de carbone dans le plasma.

IV. ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLE

1. Fonctionnement d'un quadripôle

Un quadripôle est composé de quatre électrodes parallèles hyperboliques. Les électrodes opposées sont séparées d'une distance $2r_0$, elles sont soumises deux à deux à une tension continue U et une tension alternative V . Un champ quadripolaire est ainsi créé dans la région se situant entre les quatre électrodes. Cet analyseur se comporte comme un filtre passe bande et permet la stabilisation d'un seul rapport m/z à la fois. Les ions sélectionnés à l'aide du quadripôle sont ensuite détectés par un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes qui fonctionne soit en mode comptage d'impulsions ioniques (pulse), soit en mode analogique lorsque l'intensité mesurée est trop élevée (analogue).

2. Triple Quadripôle

La spécificité de ce type d'analyseur est qu'il possède deux quadripôles et un octopôle [110]. Cet octopôle est aussi appelé cellule de collision/réaction. Lorsque l'analyse s'effectue avec de l'hélium, la cellule est dite de collision et lorsque l'analyse est effectuée avec de l'ammoniac, de l'hydrogène, ou de l'oxygène elle est dite de réaction. Un tel système permet de s'affranchir des interférences isobariques (dans le cas où deux éléments différents possèdent des isotopes de même rapport masse/charge) et polyatomiques (dans le cas où une combinaison d'ions possèdent le même rapport masse/charge que l'élément d'intérêt) via la cellule de réaction et les gaz employés [110].

En effet, le premier quadripôle sélectionne un ratio masse sur charge (m/z) spécifique qui va réagir dans la cellule de collision/réaction sous l'effet d'un gaz. Les produits de la réaction sont ensuite analysés par le second quadripôle qui peut lui aussi jouer le rôle de filtre m/z (Figure 1-13).

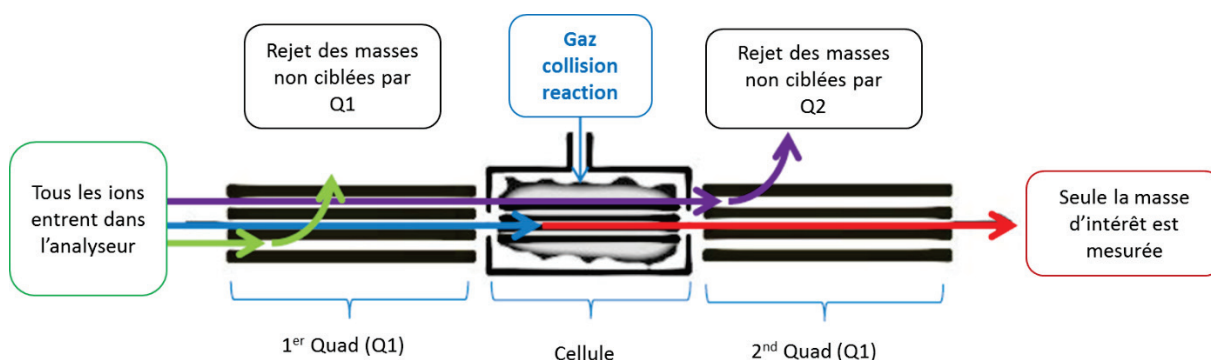


Figure 1-13 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse MS/MS fonctionnant en tandem [88]

3. Avantage du triple quadripôle

Dans le cas de l'analyse du soufre ($^{32}\text{S}^+$) et du phosphore ($^{31}\text{P}^+$), l'utilisation d'un spectromètre de masse à couplage inductif haute résolution (ICP-HRMS) permet de s'affranchir des interférences isobariques liées à ces éléments (par exemple : $^{32}\text{O}_2^+$). Malgré leur grand pouvoir de résolution ces instruments sont extrêmement coûteux et assez peu robustes [111]. Par conséquent, d'autres techniques moins onéreuses ont été envisagées pour pouvoir analyser ces éléments : l'ICP-MS muni d'un simple quadripôle en présence d'oxygène dans la cellule de réaction/collision. Malgré des résultats prometteurs deux problèmes restent non résolus : (i) la réactivité de la matrice et (ii) les interférences spectrales dues aux éléments $^{48}\text{Ti}^+$, $^{47}\text{Ti}^+$, $^{48}\text{Ca}^+$ qui ne peuvent pas être séparés des produits de réaction $^{47}\text{PO}^+$ et $^{48}\text{SO}^+$. La nouvelle utilisation d'instruments puissants tels que le triple quadripôle ICP-MS/MS a permis de s'affranchir de ces problèmes d'interférents via l'utilisation de la cellule de réaction en présence d'oxygène par exemple, comme le montre la Figure 1-14.

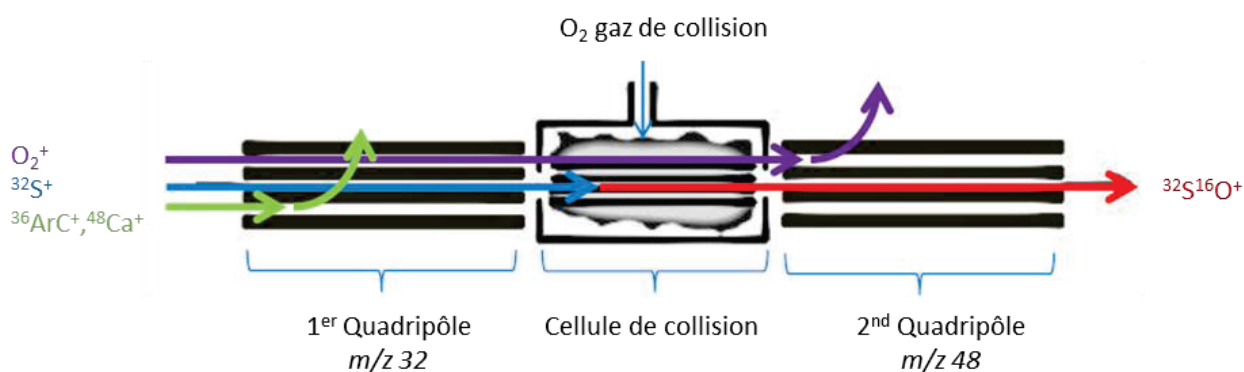


Figure 1-14 : Représentation schématique du mode MS/MS dans le cas du soufre (adapté de [88])

L'ICP-MS/MS est un outil de choix pour la détection des métaux dans des matrices complexes. En effet, la présence du premier quadripôle permet un meilleur contrôle des réactions se déroulant dans la cellule de réaction/collision. La possibilité de travailler avec plusieurs gaz de collision/réaction va permettre de s'affranchir d'un grand nombre d'interférents et de travailler sur des éléments qu'il n'était pas possible d'analyser en simple quadripôle comme le soufre par exemple.

V. CONCLUSION

L'étude de 55 publications, dans des milieux hydro-organique, a permis de mettre en évidence que le choix de l'interface du couplage LC-ICP-MS doit être effectué de façon raisonné. En effet, les dispersions extra-colonne peuvent induire une perte significative du nombre de plateaux théoriques et donc dégrader la séparation. D'autre part, l'introduction de solvants organiques dans le plasma requiert des précautions particulières pour assurer sa stabilité. Les débits de gaz de nébulisation, la température de la chambre de nébulisation, le

revêtement des cônes, etc... sont des paramètres à optimiser lors de l'introduction de matrices organiques. De plus, au vu de la littérature, l'ICP-MS/MS apparaît être un détecteur approprié à l'analyse des éléments soufre, vanadium et nickel dans le cas des matrices organiques ; l'analyseur de type triple quadripole et l'utilisation d'une cellule de réaction permettant de s'affranchir des possibles interférents présents dans le plasma.

D. CONCLUSION

Dans le cadre de la conversion de matrices pétrolières, l'une des problématiques est la caractérisation des contaminants pouvant empoisonner les catalyseurs dans les procédés de conversion. Les hétéroatomes et les éléments métalliques tels que le soufre, le nickel et le vanadium contenus dans les coupes lourdes du pétrole, peuvent se retrouver en importante quantité dans ces matrices. Ces espèces sont relativement peu décrites dans la littérature compte tenu de leur complexité et des contraintes instrumentales rencontrées pour les analyser. Dans la majorité des cas, les analyses sont menées avec une seule dimension de séparation, souvent, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC ou GPC) en association avec une détection spécifique, l'ICP-MS. Malheureusement, les analyses unidimensionnelles ne suffisent pas à caractériser la totalité de l'échantillon. La mise en place d'une méthode bidimensionnelle compréhensive (LCxLC) en amont d'une détection spécifique par ICP-MS/MS, permettrait d'augmenter la capacité de pics et d'améliorer ainsi la caractérisation de ces matrices pétrolières. Or, un tel couplage n'a encore jamais été réalisé à ce jour et présente un certain nombre de contraintes qui ressortent clairement de l'état de l'art réalisé. L'ICP-MS/MS quant à lui s'avère être un détecteur intéressant, dans le cas précis des éléments soufrés, qui va permettre de s'affranchir d'un certain nombre d'interférents tout en permettant dans un même temps, d'analyser les autres éléments d'intérêts (vanadium et nickel).

Ce chapitre a permis de mettre en évidence les différentes contraintes à prendre en compte lors du développement d'une analyse bidimensionnelle : (i) le choix du mode de couplage, hors-ligne ou en-ligne, (ii) le choix et l'ordre des dimensions de séparation pouvant avoir un impact important sur la capacité de pics totale, sur la sensibilité ainsi que sur le temps d'analyse.

Enfin, les contraintes liées au couplage de la 2D-LC avec l'ICP-MS/MS en milieu organique sont nombreuses. Au vu de la littérature, il s'avère que l'interface du couplage doit être évaluée avec beaucoup de précautions. En effet, un bilan exhaustif a permis de souligner le manque d'attention porté à l'optimisation de l'interface en terme de dispersion extra-colonne, ce point pouvant avoir des répercussions importantes dans le cadre d'une analyse bidimensionnelle sur la qualité de la séparation. Ainsi, il sera important d'optimiser l'ensemble du système dans l'objectif de minimiser la variance extra-colonne, afin de conserver un maximum des plateaux offerts par le système séparatif. L'introduction de solvants organiques impose un certain nombre de modifications de l'instrumentation couramment utilisée en milieu aqueux, pour s'assurer de la robustesse du plasma et maximiser la sensibilité du détecteur.

REFERENCES

- [1] Le pétrole, toutes les questions sur le pétrole, IFPEN, (n.d.). <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Espace-Decouverte/Les-cles-pour-comprendre/Les-sources-d-energie/Le-petrole> (accessed June 20, 2017).
- [2] E. Tocqué, C. Travers, Pétrole, in: *Techniques Ing.*, 2010: pp. 1–24.
- [3] J.-P. Wauquier, Raffinage du pétrole (Le). Tome 1. Pétrole brut. Produits pétroliers. Schémas de fabrication, Editions TECHNIP, 1998.
- [4] J. Goulon, A. Retournard, P. Friant, C. Goulon-Ginet, C. Berthe, J.-F. Muller, J.-L. Poncet, R. Guillard, J.-C. Escalier, B. Neff, Structural characterization by X-ray absorption spectroscopy (EXAFS/XANES) of the vanadium chemical environment in Boscan asphaltenes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1984) 1095. doi:10.1039/dt9840001095.
- [5] H. Santos Silva, A.C.R. Sodero, J.-P. Korb, A. Alfara, P. Giusti, G. Vallverdu, D. Begue, I. Baraille, Brice. Bouyssiere, The role of metalloporphyrins on the physical-chemical properties of petroleum fluids., *Fuel*. 188 (2017) 374–381. doi:10.1016/j.fuel.2016.10.065.
- [6] P. Zuo, S. Qu, W. Shen, Asphaltenes: Separations, structural analysis and applications, *J. Energy Chem.* 34 (2019) 186–207. doi:10.1016/j.jechem.2018.10.004.
- [7] K.K. (Adry) Bissada, J. Tan, E. Szymczyk, M. Darnell, M. Mei, Group-type characterization of crude oil and bitumen. Part I: Enhanced separation and quantification of saturates, aromatics, resins and asphaltenes (SARA), *Org. Geochem.* 95 (2016) 21–28. doi:10.1016/j.orggeochem.2016.02.007.
- [8] K.K. (Adry) Bissada, J. Tan, E. Szymczyk, M. Darnell, M. Mei, Group-type characterization of crude oil and bitumen. Part I: Enhanced separation and quantification of saturates, aromatics, resins and asphaltenes (SARA), *Org. Geochem.* 95 (2016) 21–28. doi:10.1016/j.orggeochem.2016.02.007.
- [9] I. Merdrignac, D. Espinat, Physicochemical Characterization of Petroleum Fractions: the State of the Art, *Oil Gas Sci. Technol. - Rev. IFP.* 62 (2007) 7–32. doi:10.2516/ogst:2007002.
- [10] Z. Rashid, C.D. Wilfred, N. Gnanasundaram, A. Arunagiri, T. Murugesan, A comprehensive review on the recent advances on the petroleum asphaltene aggregation, *J. Pet. Sci. Eng.* 176 (2019) 249–268. doi:10.1016/j.petrol.2019.01.004.
- [11] G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdrignac, B. Bouyssiere, R. Lobinski, Element speciation analysis of petroleum and related materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 263–276. doi:10.1039/B817888G.
- [12] J. Ancheyta, J.G. Speight, *Hydroprocessing of Heavy Oils and Residua*, CRC Press, 2007.
- [13] S. Chatila, M. Davidson, J.-F. Le page, *Resid and Heavy Oil Processing*, Editions TECHNIP, 1992.

- [14] A.-Y. Huc, *Heavy Crude Oils: From Geology to Upgrading : an Overview*, Editions TECHNIP, 2010.
- [15] G. Caumette, *Analyse de spéciation des métaux dans les produits lourds du pétrole par couplage LC-ICP MS (Chromatographie liquide - Spectromètre de masse à plasma induit)*, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2009.
- [16] S. Gutiérrez Sama, C. Barrère-Mangote, B. Bouyssière, P. Giusti, R. Lobinski, Recent trends in element speciation analysis of crude oils and heavy petroleum fractions, *TrAC Trends Anal. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.trac.2017.10.014.
- [17] L. Mahé, M. Courtiade, C. Dartiguelongue, J. Ponthus, V. Souchon, D. Thiébaud, Overcoming the high-temperature two-dimensional gas chromatography limits to elute heavy compounds, *J. Chromatogr. A.* 1229 (2012) 298–301. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.030.
- [18] K.D. Rose, M.A. Francisco, Characterization of acidic heteroatoms in heavy petroleum fractions by phase-transfer methylation and NMR spectroscopy, *Energy Fuels.* 1 (1987) 233–239. doi:10.1021/ef00003a001.
- [19] S. Moschopedis, J. Speight, Investigation of hydrogen bonding by oxygen functions in Athabasca bitumen, *Fuel.* 55 (1976) 187–192. doi:10.1016/0016-2361(76)90086-7.
- [20] J.G. Speight, S.E. Moschopedis, Anomalous Effects in the Character of the Carbonyl Absorption (ca. 1700 $\text{cm}^2/\text{sup} -1/$) in the Infrared Spectra of Petroleum Resins and Asphaltenes, *Am Chem Soc Div Pet Chem Prepr U. S.* 26:4 (1981). <https://www.osti.gov/scitech/biblio/6325575> (accessed September 13, 2017).
- [21] R.R. Coelho, I. Hovell, M.B. de Mello Monte, A. Middea, A. Lopes de Souza, Characterisation of aliphatic chains in vacuum residues (VRs) of asphaltenes and resins using molecular modelling and FTIR techniques, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 325–333. doi:10.1016/j.fuproc.2005.10.010.
- [22] M.L. Gorbaty, S.R. Kelemen, Characterization and reactivity of organically bound sulfur and nitrogen fossil fuels, *Fuel Process. Technol.* 71 (2001) 71–78. doi:10.1016/S0378-3820(01)00137-0.
- [23] S. Mitra-Kirtley, O.C. Mullins, J. Van Elp, S.J. George, J. Chen, S.P. Cramer, Determination of the nitrogen chemical structures in petroleum asphaltenes using XANES spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 252–258. doi:10.1021/ja00054a036.
- [24] A. Rudrake, K. Karan, J.H. Horton, A combined QCM and XPS investigation of asphaltene adsorption on metal surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 22–31. doi:10.1016/j.jcis.2008.12.052.
- [25] W.A. Abdallah, S.D. Taylor, Study of Asphaltenes Adsorption on Metallic Surface Using XPS and TOF-SIMS, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 18963–18972. doi:10.1021/jp804483t.

- [26] S.R. Kelemen, G.N. George, M.L. Gorbaty, Direct determination and quantification of sulphur forms in heavy petroleum and coals, *Fuel*. 69 (1990) 939–944. doi:10.1016/0016-2361(90)90001-7.
- [27] S. Niizuma, C.T. Steele, H.E. Gunning, O.P. Strausz, Electron spin resonance study of free radicals in Athabasca asphaltene, *Fuel*. 56 (1977) 249–256. doi:10.1016/0016-2361(77)90004-7.
- [28] J.G. Reynolds, W.R. Biggs, J.C. Fetzer, Characterization of Vanadium Compounds in Selected Crudes. II. Electron Paramagnetic Resonance Studies of the First Coordination Spheres in Porphyrin and Non-Porphyrin Fractions, *Liq. Fuels Technol.* 3 (1985) 423–448. doi:10.1080/07377268508915395.
- [29] K. Qian, W.K. Robbins, C.A. Hughey, H.J. Cooper, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Resolution and Identification of Elemental Compositions for More than 3000 Crude Acids in Heavy Petroleum by Negative-Ion Microelectrospray High-Field Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels*. 15 (2001) 1505–1511. doi:10.1021/ef010111z.
- [30] R.P. Rodgers, C.L. Hendrickson, M.R. Emmett, A.G. Marshall, M. Greaney, K. Qian, Molecular characterization of petroporphyrins in crude oil by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Can. J. Chem.* 79 (2001) 546–551. doi:10.1139/v00-153.
- [31] T. Dutriez, M. Courtiade, J. Ponthus, D. Thiébaud, H. Dulot, M.-C. Hennion, Complementarity of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and high temperature comprehensive two-dimensional gas chromatography for the characterization of resin fractions from vacuum gas oils, *Fuel*. 96 (2012) 108–119. doi:10.1016/j.fuel.2011.11.070.
- [32] L. Pacheco, L.E. Henao, J.M. Rincón., Assessment of quality of coal-heavy oil interaction products by means of fluorescence spectroscopy, in: *Coal Sci. Technol.*, Elsevier, 1995: pp. 1455–1458. doi:10.1016/S0167-9449(06)80080-7.
- [33] D. m. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L. g. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobínski, Guidelines for terms related to chemical speciations and fractionation of elements: definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), (2000).
- [34] V. Vargas, J. Castillo, R. Ocampo Torres, B. Bouyssiére, C.-P. Lienemann, Development of a chromatographic methodology for the separation and quantification of V, Ni and S compounds in petroleum products, *Fuel Process. Technol.* 162 (2017) 37–44. doi:10.1016/j.fuproc.2017.03.027.
- [35] A. Desprez, B. Bouyssiére, C. Arnaudguilhem, G. Krier, L. Vernex-Loiset, P. Giusti, Study of the Size Distribution of Sulfur, Vanadium, and Nickel Compounds in Four Crude Oils and Their Distillation Cuts by Gel Permeation Chromatography Inductively Coupled Plasma High-Resolution Mass Spectrometry, (2014). doi:10.1021/ef500571f.

- [36] G. Gascon, V. Vargas, L. Feo, O. Castellano, J. Castillo, P. Giusti, S. Acevedo, C.-P. Lienemann, B. Bouyssière, Size Distributions of Sulfur, Vanadium, and Nickel Compounds in Crude Oils, Residues, and Their Saturate, Aromatic, Resin, and Asphaltene Fractions Determined by Gel Permeation Chromatography Inductively Coupled Plasma High-Resolution Mass Spectrometry, *Energy Fuels*. 31 (2017) 7783–7788. doi:10.1021/acs.energyfuels.7b00527.
- [37] J.-I. Park, A. Al-Mutairi, A.M.J. Marafie, S.-H. Yoon, I. Mochida, X. Ma, The characterization of metal complexes in typical Kuwait atmospheric residues using both GPC coupled with ICP–MS and HT GC–AED, *J. Ind. Eng. Chem.* 34 (2016) 204–212. doi:10.1016/j.jiec.2015.11.011.
- [38] S. Acevedo, K. Guzmán, H. Labrador, H. Carrier, B. Bouysiere, R. Lobinski, Trapping of Metallic Porphyrins by Asphaltene Aggregates: A Size Exclusion Microchromatography With High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection Study, *Energy Fuels*. 26 (2012) 4968–4977. doi:10.1021/ef3002857.
- [39] S.G. Sama, A. Desprez, G. Krier, C.-P. Lienemann, J. Barbier, R. Lobinski, C. Barrere-Mangote, P. Giusti, B. Bouysiere, Study of the Aggregation of Metal Complexes with Asphaltenes Using Gel Permeation Chromatography Inductively Coupled Plasma High-Resolution Mass Spectrometry, (2016). doi:10.1021/acs.energyfuels.6b00559.
- [40] G. Gascon, J. Negrin, V. Garcia-Montoto, S. Acevedo, C.-P. Lienemann, B. Bouysiere, Simplification of Heavy Matrices by Liquid–Liquid Extraction: Part I—How to Separate LMW, MMW, and HMW Compounds in Maltene Fractions of V, Ni, and S Compounds, *Energy Fuels*. 33 (2019) 1922–1927. doi:10.1021/acs.energyfuels.8b03974.
- [41] T.A. Maryutina, A.R. Timerbaev, Metal speciation analysis of petroleum: Myth or reality?, *Anal. Chim. Acta*. 991 (2017) 1–8. doi:10.1016/j.aca.2017.08.036.
- [42] G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdrignac, B. Bouysiere, R. Lobinski, Fractionation and speciation of nickel and vanadium in crude oils by size exclusion chromatography-ICP MS and normal phase HPLC-ICP MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1123–1129. doi:10.1039/C003455J.
- [43] C.B. Duyck, T.D. Saint’Pierre, N. Miekeley, T.C.O. da Fonseca, P. Szatmari, High performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry for V and Ni quantification as tetrapyrroles, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 66 (2011) 362–367. doi:10.1016/j.sab.2011.05.002.
- [44] F.G. Wandekoken, C.B. Duyck, T.C.O. Fonseca, T.D. Saint’Pierre, Method for the quantification of vanadyl porphyrins in fractions of crude oils by High Performance Liquid Chromatography–Flow Injection–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 119 (2016) 1–9. doi:10.1016/j.sab.2016.03.001.
- [45] D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1168 (2007) 3–43. doi:10.1016/j.chroma.2007.08.054.

- [46] A. D'Attoma, Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés, Lyon 1, 2013. <http://www.theses.fr/2013LYO10214> (accessed April 28, 2016).
- [47] K. Horie, Y. Sato, T. Kimura, T. Nakamura, Y. Ishihama, Y. Oda, T. Ikegami, N. Tanaka, Estimation and optimization of the peak capacity of one-dimensional gradient high performance liquid chromatography using a long monolithic silica capillary column, *J. Chromatogr. A.* 1228 (2012) 283–291. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.088.
- [48] A.M. McKenna, J.M. Purcell, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Identification of Vanadyl Porphyrins in a Heavy Crude Oil and Raw Asphaltene by Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry, *Energy Fuels.* 23 (2009) 2122–2128. doi:10.1021/ef800999e.
- [49] K. Horváth, J. Fairchild, G. Guiochon, Optimization strategies for off-line two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2511–2518. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.064.
- [50] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, Implementations of two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1189 (2008) 109–168. doi:10.1016/j.chroma.2008.01.086.
- [51] J.T.V. Matos, R.M.B.O. Duarte, A.C. Duarte, Trends in data processing of comprehensive two-dimensional chromatography: State of the art, *J. Chromatogr. B.* 910 (2012) 31–45. doi:10.1016/j.jchromb.2012.06.039.
- [52] S. Peters, G. Vivó-Truyols, P.J. Marriott, P.J. Schoenmakers, Development of an algorithm for peak detection in comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1156 (2007) 14–24. doi:10.1016/j.chroma.2006.10.066.
- [53] I. Latha, S.E. Reichenbach, Q. Tao, Comparative analysis of peak-detection techniques for comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6792–6798. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.052.
- [54] C.E. Evans, J.G. Shabushing, V.L. McGuffin, Experimental and theoretical model of refractive index artifacts in absorbance detection, *J. Chromatogr. A.* 459 (1988) 119–138. doi:10.1016/S0021-9673(01)82021-5.
- [55] 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, *J. Chromatogr. A.* 1340 (2014) 90–98. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.020.
- [56] J.C. Giddings, Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1027–1028. doi:10.1021/ac60252a025.
- [57] 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, *J. Chromatogr. A.* 857 (1999) 1–20. doi:10.1016/S0021-9673(99)00765-7.
- [58] U.D. Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, *J. Chromatogr. A.* 1079 (2005) 153–161. doi:10.1016/j.chroma.2005.03.008.
- [59] N. Uwe Dieter, Peak capacity in unidimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 107–130. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.113.
- [60] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, Gradient elution in high-performance liquid chromatography : I. Theoretical basis for reversed-phase systems, *J. Chromatogr. A.* 165 (1979) 3–30. doi:10.1016/S0021-9673(00)85726-X.
- [61] M. Sarrut, G. Crétier, S. Heinisch, Theoretical and practical interest in UHPLC technology for 2D-LC, *TrAC Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 104–112. doi:10.1016/j.trac.2014.08.005.
- [62] J.M. Davis, D.R. Stoll, P.W. Carr, Effect of First-Dimension Undersampling on Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations, *Anal. Chem.* 80 (2008) 461–473. doi:10.1021/ac071504j.
- [63] J.C. Sternberg, Extracolumn contributions to chromatography band broadening, in: Giddings J.C, Keller R.A. (Eds.), *Advances in Chromatography*, Vol. 2, M. Dekker Inc., New York, 1966: p. 205.
- [64] A. D’Attoma, C. Grivel, S. Heinisch, On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations, *J. Chromatogr. A.* 1262 (2012) 148–159. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.028.
- [65] P.W. Carr, D.R. Stoll, X. Wang, Perspectives on Recent Advances in the Speed of High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1890–1900. doi:10.1021/ac102570t.
- [66] M. Sarrut, A. D’Attoma, S. Heinisch, Optimization of conditions in on-line comprehensive two-dimensional reversed phase liquid chromatography. Experimental comparison with one-dimensional reversed phase liquid chromatography for the separation of peptides, *J. Chromatogr. A.* 1421 (2015) 48–59. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.052.
- [67] P.J. Schoenmakers, G. Vivó-Truyols, W.M.C. Decrop, A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems, *J. Chromatogr. A.* 1120 (2006) 282–290. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.039.
- [68] G. Vivó-Truyols, S.J. van der Wal, P.J. Schoenmakers, Comprehensive Study on the Optimization of Online Two-Dimensional Liquid Chromatographic Systems Considering Losses in Theoretical Peak Capacity in First- and Second-Dimensions: A Pareto-Optimality Approach, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8525–8536. doi:10.1021/ac101420f.

- [69] B.J. Pollo, G.L. Alexandrino, F. Augusto, L.W. Hantao, The impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography on oil & gas analysis: Recent advances and applications in petroleum industry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 202–217. doi:10.1016/j.trac.2018.05.007.
- [70] P.K. Kanaujia, Gas Chromatography | Petroleum and Petrochemical Applications☆, in: P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró (Eds.), *Encycl. Anal. Sci.* Third Ed., Academic Press, Oxford, 2019: pp. 217–231. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14104-6.
- [71] K.D. Nizio, T.M. MGinitie, J.J. Harynuk, Comprehensive multidimensional separations for the analysis of petroleum, *J. Chromatogr. A.* 1255 (2012) 12–23. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.078.
- [72] T. Ikegami, T. Hara, H. Kimura, H. Kobayashi, K. Hosoya, K. Cabrera, N. Tanaka, Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions, *J. Chromatogr. A.* 1106 (2006) 112–117. doi:10.1016/j.chroma.2005.10.068.
- [73] F.T. van Beek, R. Edam, B.W.J. Pirok, W.J.L. Genuit, P.J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of heavy oil, *J. Chromatogr. A.* 1564 (2018) 110–119. doi:10.1016/j.chroma.2018.06.001.
- [74] N.E. Oro, C.A. Lucy, Comparison of hypercrosslinked polystyrene columns for the separation of nitrogen group-types in petroleum using High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 6178–6185. doi:10.1016/j.chroma.2010.07.078.
- [75] E. Reingruber, J.J. Jansen, W. Buchberger, P. Schoenmakers, Transfer-volume effects in two-dimensional chromatography: Adsorption-phenomena in second-dimension size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 1147–1152. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.080.
- [76] A. van der Horst, P.J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 693–709. doi:10.1016/S0021-9673(03)00495-3.
- [77] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercoouter, F. Chartier, Tutorial: Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations, *Anal. Chim. Acta.* 885 (2015) 57–91. doi:10.1016/j.aca.2015.04.039.
- [78] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercoouter, F. Chartier, Tutorial: Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations, *Anal. Chim. Acta.* 885 (2015) 33–56. doi:10.1016/j.aca.2015.03.049.

- [79] Z. Stefánka, G. Koellensperger, G. Stingeder, S. Hann, Down-scaling narrowbore LC-ICP-MS to capillary LC-ICP-MS: a comparative study of different introduction systems, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 86–89. doi:10.1039/B511629E.
- [80] M. [b1] (analytic) Wind, A. (analytic) Eisenmenger, W.D. (analytic) Lehmann, Modified direct injection high efficiency nebulizer with minimized dead volume for the analysis of biological samples by micro- and nano-LC-ICP-MS (English), *J Anal Spectrom Print.* 17 (2002) 21–26.
- [81] V. Sele, J.J. Sloth, B. Holmelid, S. Valdersnes, K. Skov, H. Amlund, Arsenic-containing fatty acids and hydrocarbons in marine oils – determination using reversed-phase HPLC–ICP-MS and HPLC–qTOF-MS, *Talanta.* 121 (2014) 89–96. doi:10.1016/j.talanta.2013.12.049.
- [82] J.-L. Todoli, J.-M. Mermet, *Liquid Sample Introduction in ICP Spectrometry : A Practical Guide*, Elsevier Science, Amsterdam, 2008.
- [83] P. Barrett, E. Pruszkowska, Use of organic solvents for inductively coupled plasma analyses, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1927–1930. doi:10.1021/ac00275a038.
- [84] M. [b1] (analytic) Potin-Gautier, C. [b1] (analytic) Casiot, Couplage HPLC-ICP-MS et application à la spéciation (French), *HPLC-ICP-MS Coupling Appl. Speciat. Engl.* P5 (2001) P3872.1-P3872.13.
- [85] M. Cassap, Simplified analysis of trace elements in gasoline with the Thermo Scientific iCAP 6000 Series ICP, *Application Note* 40987 (2009) 4.
- [86] L.I.L. Balcaen, B.D. Samber, K.D. Wolf, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, Hyphenation of reverse-phase HPLC and ICP-MS for metabolite profiling—application to a novel antituberculosis compound as a case study, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 777–786. doi:10.1007/s00216-007-1303-2.
- [87] K.L. Sutton, J.A. Caruso, Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 856 (1999) 243–258. doi:10.1016/S0021-9673(99)00580-4.
- [88] L. Bendahl, B. Gammelgaard, Sample introduction systems for reversed phase LC-ICP-MS of selenium using large amounts of methanol—comparison of systems based on membrane desolvation, a spray chamber and direct injection, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 410–416. doi:10.1039/B415717F.
- [89] K.D. Wolf, L. Balcaen, E.V.D. Walle, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, A comparison between HPLC-dynamic reaction cell-ICP-MS and HPLC-sector field-ICP-MS for the detection of glutathione-trapped reactive drug metabolites using clozapine as a model compound, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 419–425. doi:10.1039/B921638C.
- [90] K.L. [b1] (analytic) Ackley, K.L. (analytic) Sutton, J.A. (analytic) Caruso, Comparison of nebulizers for microbore LC-ICP-MS with mobile phases containing methanol (English), *J Anal Spectrom Print.* 15 (2000) 1069–1074.

- [91] S. Döker, İ.İ. Boşgelmez, Rapid extraction and reverse phase-liquid chromatographic separation of mercury(II) and methylmercury in fish samples with inductively coupled plasma mass spectrometric detection applying oxygen addition into plasma, *Food Chem.* 184 (2015) 147–153. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.067.
- [92] S. Trümpler, S. Nowak, B. Meermann, G.A. Wiesmüller, W. Buscher, M. Sperling, U. Karst, Detoxification of mercury species—an in vitro study with antidotes in human whole blood, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1929–1935.
- [93] F. Moreno, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Simultaneous speciation and preconcentration of ultra trace concentrations of mercury and selenium species in environmental and biological samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1300 (2013) 43–50. doi:10.1016/j.chroma.2013.02.083.
- [94] B. Klencsár, E. Bolea-Fernandez, M.R. Flórez, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Determination of the total drug-related chlorine and bromine contents in human blood plasma using high performance liquid chromatography–tandem ICP-mass spectrometry (HPLC–ICP-MS/MS), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 112–119. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.019.
- [95] B. Meermann, A. Hulstaert, A. Laenen, C. Van Looveren, M. Vliegen, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, HPLC/ICP-MS in Combination with “Reverse” Online isotope dilution in drug metabolism studies, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2395–2401. doi:dx.doi.org/10.1021/ac203165p.
- [96] B.P. Jensen, C.J. Smith, C. Bailey, C. Rodgers, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, Application of inductively coupled plasma mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-with parallel electrospray mass spectrometry to the investigation of the disposition and metabolic fate of 2-, 3- and 4-iodobenzoic acids in the rat, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 809 (2004) 279–285. doi:10.1016/j.jchromb.2004.06.038.
- [97] H. Chen, J. Chen, W. Jin, D. Wei, Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction, *Volume* 172 (2009) 1282–1287. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.134.
- [98] C. Gabel-Jensen, K. Lunøe, K.G. Madsen, J. Bendix, C. Cornett, S. Stürup, H.R. Hansen, B. Gammelgaard, Separation and identification of the selenium-sulfur amino acid S-(methylseleno)cysteine in intestinal epithelial cell homogenates by LC-ICP-MS and LC-ESI-MS after incubation with methylseleninic acid, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 727–732. doi:10.1039/B715899H.
- [99] C. Gabel-Jensen, J. Odgaard, C. Skonberg, L. Badolo, B. Gammelgaard, LC-ICP-MS and LC-ESI-(MS)ⁿ identification of Se-methylselenocysteine and selenomethionine as metabolites of methylseleninic acid in rat hepatocytes, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2008) 69–75. doi:10.1039/B807805J.

- [100] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, Retention of arsenic species on zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 817–825. doi:10.1002/jssc.200900738.
- [101] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, Separation of Organoarsenicals by Means of Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography (ZIC®-HILIC) and Parallel ICP-MS/ESI-MS Detection, *Eng. Life Sci.* 8 (2008) 582–588. doi:10.1002/elsc.200800041.
- [102] J. Far, H. Preud'homme, R. Lobinski, Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection, *Anal. Chim. Acta.* 657 (2010) 175–190. doi:10.1016/j.aca.2009.10.040.
- [103] Y. Nygren, P. Hemström, C. Åstot, P. Naredi, E. Björn, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) utilizing a mobile phase with a low-volatile organic modifier for the determination of cisplatin, and its monohydrolyzed metabolite, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 948–954. doi:10.1039/B716093C.
- [104] T. Falta, G. Koellensperger, A. Standler, W. Buchberger, R.M. Mader, S. Hann, Quantification of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP-SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1336–1342. doi:10.1039/B907011G.
- [105] T. Grevenstuck, P. Flis, L. Ouerdane, R. Lobinski, A. Romano, Identification of the tri-Al tricitrate complex in *Plantago almogravensis* by hydrophilic interaction LC with parallel ICP-MS and electrospray Orbitrap MS/MS detection, *Metallomics.* 5 (2013) 1285–1293. doi:10.1039/C3MT00101F.
- [106] R. Rellán-Álvarez, J. Giner-Martínez-Sierra, J. Orduna, I. Orera, J.Á. Rodríguez-Castrillón, J.I. García-Alonso, J. Abadía, A. Álvarez-Fernández, Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport, *Plant Cell Physiol.* 51 (2010) 91–102. doi:10.1093/pcp/pcp170.
- [107] J. Vidmar, A. Martinčič, R. Milačič, J. Ščančar, Speciation of cisplatin in environmental water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta.* 138 (2015) 1–7. doi:10.1016/j.talanta.2015.02.008.
- [108] B. Meermann, M. Kießhauer, Development of an oxygen-gradient system to overcome plasma instabilities during HPLC/ICP-MS measurements using gradient elution, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 2069–2075. doi:10.1039/C1JA10177C.
- [109] G. Raber, R. Raml, W. Goessler, K.A. Francesconi, Quantitative speciation of arsenic compounds when using organic solvent gradients in HPLC-ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 570–576. doi:10.1039/B921881E.

- [110] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, Review: Inductively coupled plasma – Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – A tutorial review, *Anal. Chim. Acta.* 894 (2015) 7–19. doi:10.1016/j.aca.2015.08.053.
- [111] J. Gong, M.J. Solivio, E.J. Merino, J.A. Caruso, J.A. Landero-Figueroa, Developing ICP-MS/MS for the detection and determination of synthetic DNA-protein crosslink models via phosphorus and sulfur detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2433–2437. doi:10.1007/s00216-015-8504-x.

OBJECTIFS DE LA THESE

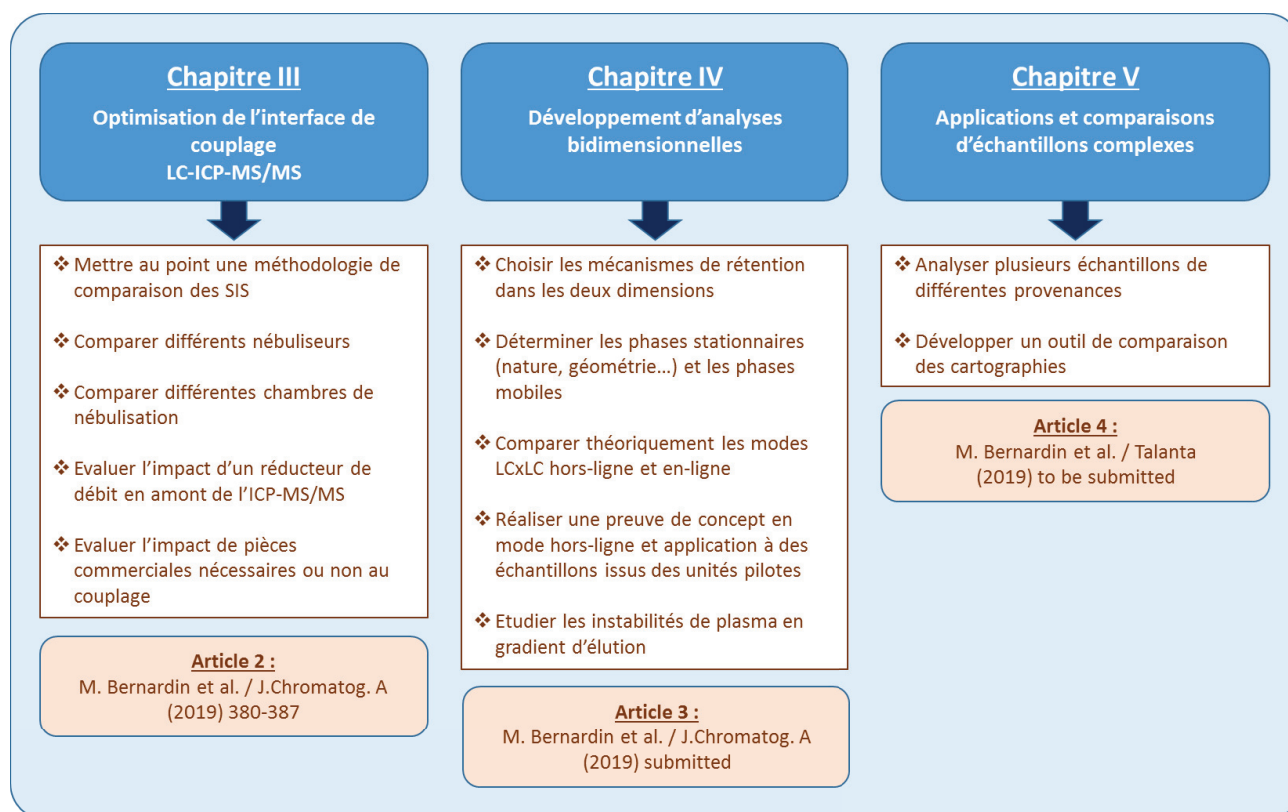
OBJECTIFS DE LA THESE

Ce sujet de thèse a pour objectif d'évaluer le potentiel de la chromatographie liquide bidimensionnelle (2D-LC) couplée à une détection spécifique, la spectrométrie de masse à couplage inductif (ICP-MS/MS), dans le cas des matrices complexes organiques, en prenant pour exemple les fractions lourdes du pétrole. Comme démontré dans le chapitre I de cette thèse, ces matrices sont d'une grande complexité de par la grande diversité des molécules qui les composent. Les masses moléculaires des espèces qui constituent ces mélanges complexes s'étendent de quelques centaines à plusieurs milliers de g/mol, en combinant des propriétés hydrophobes très différentes les unes des autres. L'un des objectifs de cette thèse est donc de réussir à développer un nouvel outil analytique adapté à l'analyse élémentaire de ces matrices.

Pour cela 3 axes principaux seront développés au cours de cette thèse dans le but d'atteindre cet objectif :

- ❖ **Etude et optimisation du couplage LC avec l'ICP-MS** : au vu de la littérature, l'optimisation de l'interface du couplage entre le système chromatographique et la détection spécifique semble indispensable. L'objectif étant de mieux comprendre les paramètres influençant la perte en efficacité du système chromatographique au passage dans l'interface de couplage, en amont de la détection.
- ❖ **Développement analyses bidimensionnelles** : le choix des dimensions de première et seconde dimension est à optimiser au regard de la capacité de pics, du temps d'analyse et du facteur de dilution. La comparaison devra être menée sur le choix des analyses hors-ligne ou en-ligne. Les phases stationnaires, les phases mobiles ainsi que les conditions de plasma devront être choisies judicieusement pour obtenir la plus grande capacité de pics, dans l'objectif de caractériser au mieux ces échantillons complexes.
- ❖ **Comparaison d'échantillons pétroliers** : des échantillons d'origines pétrolières différentes pourront être analysés, grâce à la méthode préalablement développée, dans le but d'apporter des réponses quant aux problèmes de réactivité observés au sein des unités de raffinage. Des informations complémentaires aux analyses unidimensionnelles sont attendues dans le but de mieux caractériser ces mélanges complexes.

Chacun de ces axes constitue un chapitre de ce manuscrit, comme le détaille la figure ci-dessous :



Chapitre 2 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Appareillages, phases stationnaires, phases mobiles, composés d'intérêts, calculs

INTRODUCTION

Ce chapitre décrit l'ensemble des appareils, leurs différentes caractéristiques, la nature des échantillons ainsi que la méthodologie employée dans les différentes études menées au cours des travaux de cette thèse. Les conditions détaillées des méthodes employées sont décrites dans les chapitres suivants.

La section A détaille les différents appareils utilisés à savoir deux systèmes unidimensionnels de chromatographie en phase liquide ainsi qu'un système bidimensionnel. Le détecteur utilisé est un spectromètre de masse à couplage inductif muni d'un triple quadripole (ICP-MS/MS). Le couplage LC-ICP-MS/MS a été réalisé à l'aide de 31 interfaces qui sont également décrites dans cette section.

Les sections B et C décrivent les phases stationnaires et mobiles utilisées dans les différentes études.

La section D détaille la nature et les caractéristiques des échantillons utilisés au cours de ces travaux. Les échantillons proviennent de coupes lourdes du pétrole.

Enfin, la section E présente le traitement et la gestion des données mis en œuvre pour exploiter les résultats LCxLC-ICP-MS/MS.

Nous remercions Elemental Scientific pour le prêt de la chambre de nébulisation PC³.

Nous remercions Courtage Analysis Service pour le prêt de différents nébuliseurs.

A. APPAREILLAGE

I. APPAREILLAGES DE CHROMATOGRAPHIE

1. I-Class (Waters)

Ce système de chromatographie en phase liquide inclut un système de pompage binaire ultra haute pression, un passeur d'échantillon, un four colonne, et un détecteur UV comportant une cellule de détection de 500 nL. La gamme de débit s'étend de 0.01 mL/min à 2 mL/min. Le maximum de pression autorisée est 1200 bars, mais décroît à partir de 1 mL/min en fonction du débit et de la composition de la phase mobile. Le passeur automatique est thermostaté de 4 à 40 °C. Le système d'injection est de type FTN (« Flow Through Needle ») et permet l'injection jusqu'à 15 µL. La température maximale du four colonne est de 90 °C. Le système I-Class est piloté par le logiciel Empower qui permet également l'acquisition des données.

2. 1290 Infinity (Agilent)

Ce système est composé, de 3 modules distincts : un système de pompage couvrant une gamme de 0.001 mL/min à 5 mL/min, un passeur d'échantillons non thermostaté, un four thermostaté, pouvant aller jusqu'à 100 °C à un débit de 2.5 mL/min et 80 °C à un débit de 5 mL/min. Les pressions supportées par cet instrument sont de 1200 bars et 800 bars à 2 mL/min et 5 mL/min respectivement. Le système d'injection est un FTN et permet l'injection de volumes jusqu'à 20 µL. Les clapets de la pompe B sont adaptés pour résister à la présence de THF. D'autre part, les tubings connectés directement en amont des pompes et en contact avec les solvants sont adaptés pour résister au THF. En sortie de colonne, le débit de liquide est envoyé directement dans le système de détection, via le système d'introduction de l'échantillon de l'ICP-MS/MS. Le logiciel Mass Hunter permet de réaliser l'acquisition des données et la communication avec l'instrument. La dernière version de ce logiciel est une version hybride d'OpenLab et de Mass Hunter.

3. 1290 Infinity 2D-LC (Agilent)

Ce système de chromatographie en phase liquide bidimensionnelle inclut deux systèmes de pompage binaires haute pression identiques (un pour chaque dimension), un passeur d'échantillon, deux fours colonnes identiques (un pour chaque dimension), une interface composée d'une vanne double 4 ports 2 positions résistante aux hautes pressions, un détecteur UV mono longueur d'onde (¹D) et un détecteur à barrette de diodes (DAD) (²D). Le détecteur de première dimension possède une cellule de 2 µL, un chemin optique de 3 mm et supporte une pression de 60 bars maximum. Le détecteur de seconde dimension possède une cellule de 0.6 µL, un chemin optique de 10 mm et supporte une pression de 120 bars maximum. Le système de pompage peut délivrer jusqu'à 5 mL/min. Le maximum de pression est de 1200 bars. Le système d'injection est un FTN et permet l'injection de volumes jusqu'à

20 µL. Pour injecter des volumes allant jusqu'à 100 µL, il est nécessaire d'ajouter un tube dimensionné selon le volume souhaité. La température maximale du four colonne est de 100 °C. L'interface entre les deux dimensions, comme présentée Figure 2-1, permet de travailler dans une configuration symétrique sans avoir besoin de chemins additionnels et aucun problème de synchronisation n'est à craindre entre les deux positions puisqu'elle n'est composée que d'une seule vanne.

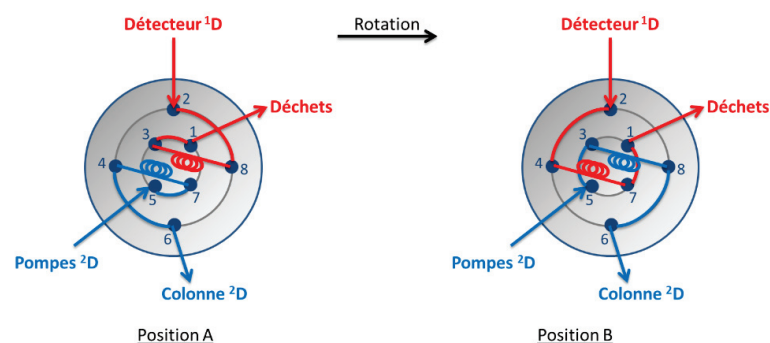


Figure 2-1 : Vanne double 4 ports 2 positions

Le système 2D-LC est piloté par le logiciel OpenLab CDS qui permet également l'acquisition des données.

II. SPECTROMETRE DE MASSE A COUPLAGE INDUCTIF : ICP-MS/MS 8800 (AGILENT)

Ce système est un triple quadripôle avec comme source d'ionisation un plasma à couplage induit. Le pilotage est réalisé via le logiciel MassHunter. Plusieurs systèmes d'introduction de l'échantillon (SIS) ont été utilisés. Différents nébuliseurs ainsi que différentes chambres de nébulisation ont été testées. Leurs caractéristiques sont répertoriées dans les Tableau 2-1 et Tableau 2-2.

Tableau 2-1 : Caractéristiques des nébuliseurs utilisés

Nébuliseur	Design	Fournisseur	Matériel	Longueur tubing (cm)	Diamètre interne tubing (µm)	Capillaire interne (µm)
MicroMist (Ezyfit)	Micro-concentrique	Agilent	Borosilicate	2.3	250	/
PFA-LC	Micro-concentrique	Glass Expansion	PFA	Pas de tubing	Pas de tubing	150
Opalmist	Micro-concentrique	Glass Expansion	PFA	26.5	180	/
Savillex (C-Flow 200)	Micro-concentrique	Savillex	PFA	70	/	/
Burgener T2002	Flux parallèle	Spectro	Teflon	75	380	/
Crossflow	Cross flow	Spectro	/	/	/	/

Tableau 2-2 : Caractéristiques des chambres de nébulisations utilisées

Chambre de nébulisation	Design	Matériel	Volume (mL)	Thermostated	Spécificité
Twinnabar	Cyclonique	Borosilicate	20	Non	Présence d'une canule
IsoMist (Twinnabar)	Cyclonique	Borosilicate	20	Oui	Présence d'une canule
Chambre à consommation totale	Simple passage	Quartz	22	Non	Pas de drain
Conical	Bille d'impact	Borosilicate	27	Non	/
Agilent 8800	Double passage	Quartz	70	Oui	/
Spectro large volume	Double passage	Borosilicate	150	Non	/
Spectro faible volume	Double passage	Borosilicate	75	Non	/
Single	Simple passage	Borosilicate	75	Non	/
PC ³	Cyclonique	Quartz	47	Oui	/

L'optimisation du plasma dépend du système d'introduction utilisé, ainsi que du solvant employé. Pour chaque combinaison (nébuliseur + chambre de nébulisation), les paramètres tels que le débit de gaz de nébulisation, la position de la torche à plasma, et le pourcentage de gaz additionnel ont été optimisés de manière à obtenir l'intensité la plus importante sur toute la gamme de masse. Pour cela les éléments ⁷Li, ⁸⁹Y, et ²⁰⁵Tl ont été utilisés. Lors de l'optimisation de ces différents paramètres il est important de veiller à minimiser le taux d'oxyde ¹⁵⁶CeO⁺/¹⁴⁰Ce⁺. Un taux d'oxyde élevé reflète un plasma froid où le rendement d'atomisation n'est pas maximal. Les optimisations effectuées pour chacune des combinaisons sont répertoriées dans le Tableau 2-3. Les profils d'intensités et taux d'oxyde, en fonction du débit de gaz de nébulisation, sont quant à eux détaillés en Annexe 1, pour les 31 combinaisons de nébuliseurs et chambres de nébulisation testées.

Tableau 2-3 : liste des 31 combinaisons de nébuliseurs et chambres de nébulisation ainsi que les paramètres finaux d'optimisation du plasma pour une sensibilité maximale

N°	Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Débit de gaz de nébulisation (L/min)	Température de la chambre de nébulisation (°C)	Gaz optionnel (%) (20 % O2 in Ar)	Profondeur de torche (mm)
1	IsoMist (Twinnabar)	PFA-LC	0.8	-	27	9
2	Twinnabar	Micromist	0.6	Non contrôlé	40	5
3		PFA-LC	0.6		40	6
4		Burgener	0.55		4	6
5		Opalmist	0.35		45	5
6		Savillex	0.4		45	5
7	Agilent 8800	Micromist	0.75	2	23	4
8		PFA-LC	0.55	Non contrôlé	20	5
9		Crossflow	0.75		25	3
10		Burgener	0.3		20	4
11	Chambre à billes d'impact (Conical)	Micromist	0.65		35	6
12		PFA-LC	0.6		35	5
13		Burgener	0.55		35	4
14		Opalmist	0.55		35	5
15	Spectro large volume	Micromist	0.9		45	5
16		PFA-LC	0.85		45	6
17		Burgener	0.7		40	6
18		Crossflow	0.9		40	10
19	Single	Micromist	1.3		35	5
20		PFA-LC	0.75		40	5
21		Burgener	0.5		45	5
22		Crossflow	0.9		45	10
23	Chambre à Consommation totale	PFA-LC	0.51	Non contrôlé	50	9
24	PC ³	PFA-LC	0.65	-5	20	3
25		Micromist	0.4		25	5
26		Burgener	0.55		15	3
27		Opalmist	0.35		25	5
28		Savillex	0.4		25	5
29	Spectro faible volume	PFA-LC	0.85	Non contrôlé	45	8
30		Micromist	0.85		45	8
31		Burgener	0.5		50	8

L'introduction de l'échantillon dans le système d'introduction peut se faire via une pompe péristaltique avec un débit de travail de 0.1 rps (soit 0.4 mL/min avec un tuyau de 1.14 mm de diamètre interne), soit via le système chromatographique et la pompe LC. Une torche à plasma d'un diamètre de 1 mm constitue le système assurant l'introduction de l'aérosol dans le plasma. Les cônes constituant l'interface du spectromètre de masse sont en platine. Les paramètres du plasma sont les suivants : puissance du plasma : 1500 W, débit de

gaz auxiliaire : 0.9 L/min, débit de gaz plasmagène : 15 L/min. Un mélange de gaz additionnel (20 % O₂ dans Argon) est ajouté dans le tube HMI précédant l'entrée dans la torche à plasma pour éviter la formation d'un dépôt de carbone à l'entrée des cônes.

B. PHASES STATIONNAIRES

Les différentes phases stationnaires utilisées au cours de ces travaux sont listées dans le Tableau 2-4 :

Tableau 2-4 : Colonnes utilisées pour les différentes études

	Nom	Fournisseur	Support	dc (mm)	Lc (mm)	dp (μm)	Pore Size (Å)
RPLC	Acquity BEH C18	Waters	Octadecyl (silica)	2.1	5	1.7	130
	Vydac C18	Grace	Octadecyl (silica)	2.1	15	5	300
	Hypersil Betabasic	Thermo Fisher	BetaBasic C8	2.1	15	3	150
	Zorbax-SB-CN	Agilent	Cyano	4.6	15	5	80
SEC	APC XT 125	Waters	Silica	4.6	15	2.5	125
				4.6	3	2.5	125
	APC XT 45			4.6	15	1.7	45

C. PHASES MOBILES

L'eau utilisée lors de la préparation des phases mobiles provient d'un système de purification Elga (Purelab classic UV), permettant l'obtention d'une conductivité de 18 MΩ.cm. Grâce à un rayonnement UV, les bactéries présentes dans l'eau sont éliminées. D'autre part, les phases mobiles organiques sont préparées à partir de tétrahydrofurane (THF) UHPLC/MS, fourni par Biosolve Chimie SARL (Dieuze, France) et d'acétonitrile (ACN) de grade LC-MS, fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). D'autres solvants comme le 1-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) fourni par Fisher Scientific (Illkirch, France) et l'acétate d'éthyle fourni par Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), tous deux de grade HPLC, ont été utilisés au cours de ces travaux de thèse.

D. COMPOSES D'INTERETS

I. SOLUTION DE PARABENES

Quatre parabènes (méthylparabène, éthylparabène, propylparabène et butylparabène) provenant de la société Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) ont été utilisés pour évaluer les performances des systèmes chromatographiques. Une solution mère à 500 ppm dans un solvant 50/50 Eau/MeOH contenant ces 4 parabènes a été préparée et conservée à 5°C. L'échantillon analysé possède une concentration de 75 ppm et est conservé à 5°C.

II. SOLUTION MULTI-ELEMENTAIRE

Une solution multi-élémentaire composée des éléments Lithium, Yttrium, Thallium, Cérium, Cobalt est analysée pour s'assurer des performances de l'ICP-MS/MS. Cette solution est préparée à partir de solutions mono-élémentaires, provenant de la société SPEX CertiPrep en solution aqueuse acidifiée avec 2 % d'acide nitrique et conservée à température ambiante pendant un mois. Cette solution diluée à 10 ppb dans l'acétonitrile est préparée et analysée quotidiennement à partir d'une solution mère à 1 ppm.

III. SOLUTION ETALON DE PORPHYRINE

Une solution à 10 ppm de 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21H,23H-porphine vanadium(IV), provenant de chez Sigma-Aldrich a été préparée dans du THF pour permettre les mesures de dispersion à la fois avec une détection UV et avec l'ICP-MS/MS. Ces travaux sont détaillés dans le chapitre 3.

IV. STANDARDS DE POLYSTYRENE

Deux solutions de mélanges de standards de polystyrènes (PS7 et PS8), de la société Fluka Analytical, ont été analysées pour réaliser la calibration des colonnes d'exclusion stérique. Ces solutions ont été fournies par IFPEN, en solution dans le THF, et contiennent les masses suivantes :

- PS7 : 28000, 9130, 682, 266 Da
- PS8 : 44000, 15700, 3470, 1250 Da

Les concentrations en polystyrènes de ces deux solutions ne sont pas connues.

V. ECHANTILLONS REELS PROVENANT DES COUPES LOURDES DU PETROLE

Plusieurs matrices pétrolières, fournies par IFPEN, ont été utilisées pour le développement analytique au cours de cette thèse.

1. Résidu sous vide et résidu atmosphérique

5 résidus sous vide (RSV ou VR) ainsi qu'un résidu atmosphérique (RA) ont été analysés et sont répertoriés dans le tableau Tableau 2-5. Ces échantillons ont été dilués dans le THF avec un facteur de dilution de 60.

Tableau 2-5 : Echantillons issus de coupes pétrolières lourdes analysés durant la thèse

Coupe	Origine géographique	Type	V (µg/g)	Ni (µg/g)	S (mg/g)
RSV	Arabie Saoudite	Origine marine soufrée	97	28	42
	Russie	Origine marine soufrée	170	50	26
	Canada	Origine marine	317	115	57
	Irak	Origine marine	183	58	56
	Congo	Origine terrestre	10	85	4
RA	Venezuela	Origine terrestre	1562	130	53

2. Echantillons fractionnés (SARA)

D'autre part, plusieurs fractions des coupes lourdes du pétrole fournies par IFPEN ont été analysées dans ces travaux. Ces échantillons proviennent du fractionnement de coupe lourde du pétrole par la méthode SARA. Le fractionnement se déroule en deux étapes : (1) précipitation des asphaltènes avec du n-heptane et (2) fractionnement des maltènes par chromatographie. Ce fractionnement donne accès à quatre fractions communément appelées SARA : Saturés, Aromatiques, Résines, Asphaltènes. Ces échantillons sont dilués avec un facteur de 60 dans le THF avant analyse.

E. OUTILS DE CALCULS ET TRAITEMENT DES DONNEES

I. OPTIMISATION DES METHODES LCXLC

Le dimensionnement des méthodes LCxLC, ainsi que les conditions d'analyses mises en place dans les chapitres 4 et 5 sont obtenues à l'aide d'un outil développé sur Excel au laboratoire [1,2]. Grâce à cet outil les paramètres chromatographiques sont optimisés pour l'analyse bidimensionnelle que l'on souhaite développer. Les conditions d'analyses sont largement détaillées dans les chapitres suivants.

II. DONNEES 1D

Les données acquises en 1D-LC ont été traitées sur le logiciel dédié à l'instrument ou sur Excel après exportation des données brutes. Les données générées en ICP-MS/MS sont exportées du logiciel MassHunter vers Excel.

III. DONNEES 2D

Une analyse bidimensionnelle génère un nombre très important de données. En effet, leur représentation s'effectue selon trois dimensions, le temps de rétention dans chacune des dimensions et le signal du détecteur, mais les données sont obtenues sous forme matricielle. Le traitement de ces données est donc complexe. En hors-ligne, il est nécessaire de reconstruire la matrice à partir de données brutes obtenues pour chacune des fractions. A l'inverse, en mode en-ligne, le détecteur en sortie de seconde dimension enregistre le signal en continu pendant toute la durée de l'analyse (temps de séparation de la première dimension). Le chromatogramme de deuxième dimension correspond ainsi à la succession de toutes les injections envoyées en seconde dimension (à chaque rotation de vanne). Ce chromatogramme peut alors être fractionné. Les données peuvent être visualisées sous forme de « contour plot » appelé aussi « cartographie » ou de représentation 3D. Ces types de représentations sont réalisés sous Matlab grâce à un programme développé en interne au laboratoire.

RÉFÉRENCES

- [1] M. Sarrut, A. D'Attoma, S. Heinisch, Optimization of conditions in on-line comprehensive two-dimensional reversed phase liquid chromatography. Experimental comparison with one-dimensional reversed phase liquid chromatography for the separation of peptides, *J. Chromatogr. A.* 1421 (2015) 48–59. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.052.
- [2] M. Sarrut, F. Rouvière, S. Heinisch, Theoretical and experimental comparison of one dimensional versus on-line comprehensive two dimensional liquid chromatography for optimized sub-hour separations of complex peptide samples, *J. Chromatogr. A.* 1498 (2017) 183–195. doi:10.1016/j.chroma.2017.01.054.

Chapitre 3 - OPTIMISATION DE L'INTERFACE DE COUPLAGE LC-ICP-MS/MS

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

Article 2

"Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 2 Comparison of Sample Introduction Systems"

M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. (2019), 380-387, doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.074

INTRODUCTION

La chromatographie liquide couplée à une détection très spécifique telle que l'ICP-MS/MS est une technique de choix pour des analyses de spéciation élémentaire. La nécessité d'analyser des matrices organiques demandant d'introduire des solvants volatiles dans le plasma est un défi analytique pour cette technique de couplage. De nombreuses limitations instrumentales contribuent à réduire considérablement la sensibilité attendue. Parmi celles-ci, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à la dispersion extra-colonne générée par le système d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS/MS. Le phénomène de dispersion à l'extérieur de la colonne est bien connu des chromatographistes mais il a été jusqu'à présent très peu étudié dans le cadre du couplage avec l'ICP-MS/MS et encore moins quantifié. En sortie de colonne chromatographique, on cherche à obtenir des pics résolus de la meilleure manière possible, il est donc important d'optimiser les différents instruments constituant l'interface du couplage pour limiter un élargissement des pics et éviter de perdre la résolution et la sensibilité obtenue avant l'entrée dans l'analyseur, ce qui serait dommageable aux analyses quantitatives. La dispersion générée par le système d'introduction (SIS) dans l'ICP-MS est donc un des points faibles de ce couplage.

Ce chapitre a pour objectif d'évaluer différents systèmes d'introduction commerciaux vis-à-vis de la dispersion extra-colonne qu'ils génèrent, dans le but de choisir le système le plus adapté à un couplage LCxLC-ICP-MS/MS. En effet, comme démontré dans le chapitre I, une dispersion extra-colonne trop importante engendre une perte en nombre de plateaux théoriques significative au détriment de la qualité de la séparation. Il est donc primordial d'évaluer des systèmes commerciaux afin d'identifier les paramètres clés générant de la dispersion et de statuer sur le montage qui sera utilisé pour la suite des analyses. Pour cela 6 nébuliseurs et 9 chambres de nébulisation ont été testés pour un total de 31 combinaisons réalisables. La dispersion induite par l'interface de couplage a pu être évaluée grâce à l'association de deux systèmes de détection en série (UV et ICP-MS/MS) de part et d'autre du système d'introduction. Cette méthodologie a été appliquée à un standard de porphyrine permettant une détection en UV grâce aux chromophores présents et une détection élémentaire via l'ICP-MS/MS grâce au métal chélaté présent dans sa structure. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Chromatography A*.

Le système d'introduction n'est pas le seul point faible d'un tel couplage, les connectiques pouvant être utilisées entre le système chromatographique et l'ICP-MS/MS doivent aussi être caractérisées pour s'assurer qu'elles n'apportent pas de dispersion supplémentaire. Enfin, l'utilisation d'un diviseur de débit (split) entre la LC et l'ICP-MS/MS est envisagée pour s'adapter au débit de travail du nébuliseur choisi. Différents paramètres ont été étudiés tels que le ratio de split ou encore le diamètre interne des tubes pour évaluer au mieux la dispersion générée par chacun de ces paramètres.

A. CHOIX DU SYSTEME D'INTRODUCTION

Au vu de la littérature, le choix du système d'introduction de l'échantillon s'est avéré être un point primordial à considérer lors du couplage de la chromatographie liquide avec l'ICP-MS/MS. Pour cela 31 combinaisons de nébuliseurs et chambres de nébulisation ont pu être testées au travers de cette étude. Les résultats concernant les dispersions extra-colonne que peuvent générer ces différentes combinaisons sont présentés sous forme d'article scientifique dans la suite de cette section.

Article 2

Cette partie fait l'objet d'une publication publiée dans *Journal of Chromatography (JCA)*

“Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 2 Comparison of Sample Introduction Systems”

M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. (2019), 380-387, doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.074



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 2 Comparison of Sample Introduction Systems

Marie Bernardin^{a,b}, Frédérique Bessueille-Barbier^a, Agnès Le Masle^b, Charles-Philippe Lienemann^b, Sabine Heinisch^{a,*}

^a Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, ENS Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

^b IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2019

Received in revised form 29 April 2019

Accepted 30 April 2019

Available online 1 May 2019

Keywords:

Speciation

Ultra high performance liquid chromatography

Inductively coupled plasma

Extra-column dispersion

Sample introduction system

LC-ICP-MS

ABSTRACT

Liquid chromatography (LC) coupled with a specific detection such as inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS/MS) is a technique of choice for elementary speciation analysis for complex matrices. The analysis of organic matrices requires the introduction of volatile solvents into the plasma which is an analytical challenge for this coupling technique. Detection sensitivity can be significantly affected by instrumental limitations. Among those, we were interested in the solute dispersion into the interface located between LC and ICP-MS/MS. This interface consists in both a Sample Introduction System (SIS) and a possible flow splitter. This study, divided into two parts, investigated the analytical performance (in terms of sensitivity and efficiency) generated by the coupling of LC and ICP-MS in the specific case of organic matrices. In Part I [1], we previously discussed the impact of extra column dispersion on the performance of LC-ICP-MS, first from a theoretical point of view and next, by assessing extra-column dispersion in 55 published studies on LC-ICP-MS. It was shown that SIS was rarely optimized with respect to its contribution to extra-column band broadening. The critical impact of flow splitting on extra-column dispersion was also pointed out.

The present Part II is dedicated to the experimental comparison of commercially available SIS by assessing extra-column band broadening and hence the contribution of SIS to the loss in both efficiency and sensitivity. It is shown that the peak variance, due to SIS, can vary from 10 to 8000 μL^2 depending on the combination of both nebulizer and spray chamber. Whereas the highest values (i.e. > 2000 μL^2) are much too high in high performance liquid chromatography (HPLC), even the lowest values (i.e. < 100 μL^2) can be inappropriate in ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC) as highlighted in this study. In light of these results, it appears that nebulizer and spray chamber have to be chosen together with respect to the chromatographic technique (HPLC or UHPLC) and that both peak dispersion and peak intensity depend on key parameters including SIS device geometry, flow rate entering the interface or spray chamber temperature.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Liquid Chromatography (LC) hyphenated to a specific detection such as Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS/MS) is widely used to obtain elemental information and to discriminate species in a given matrix [2,3]. Reversed Phase Liquid Chromatography (RPLC) [4] and Size-Exclusion Chromatography (SEC) [5,6] both performed with large amounts of organic solvent

in the mobile phase are gaining interest, as previously discussed in Part I. Over the past few years, LC techniques have been extensively used for speciation analysis, in particular with narrow bore (2.1 mm i.d.) or microbore (1 mm i.d.) columns, packed with small particles (sub 2 μm) and operated under ultra-high pressure (UHPLC) in order to obtain high column plate numbers within short analysis times [7]. In UHPLC (i.e. 2.1 mm i.d. column packed with sub-2 μm particles), the optimal flow-rate is usually lower than in conventional HPLC (i.e. 4.6 mm i.d. column packed with 5 μm particles), which is advantageous when using organic solvent in ICP-MS. If the flow rate entering the plasma source is decreased, the amount of organic solvent is also decreased, thereby improving the plasma

* Corresponding author.

E-mail address: sabine.heinisch@univ-lyon1.fr (S. Heinisch).

Table 1
Nebulizer characteristics and settings.

Nebulizer	Design	Supplier	Raw material	Tubing length	Volume (μL)	Tubing I.D.
MicroMist (Ezyfit)	Micro concentric	Agilent	Borosilicate	2.3 cm	6 μL	250 μm
PFA-LC	Micro concentric	Glass Expansion	PFA	No tubing	2 μL	150 μm
Opalmist	Micro concentric	Glass Expansion	PFA	26.5 cm	/	180 μm
Saville (C-Flow 200)	Micro concentric	Saville	PFA	70 cm	/	/
Burgener (T2002)	Parallel path	Spectro	Teflon	75 cm	108 μL	380 μm
Crossflow	Cross flow	Spectro	/	/	/	/

I.D. for internal diameter.

Table 2
Spray chamber characteristics and settings.

Spray chamber	Design	Raw material	Volume (mL)	Temperature control	Specificity
Twinnabar	Cyclonic	Borosilicate	20	No	Presence of baffle
IsoMist (Twinnabar)	Cyclonic	Borosilicate	20	Yes	Presence of baffle
Total consumption	Single pass	Quartz	22	No	No drain
Impact bead (Conical Spray Chamber)	Impact bead	Borosilicate	27	No	/
Agilent 8800	Double pass	Quartz	70	Yes	/
Spectro Large	Double pass	Borosilicate	150	No	/
Spectro Small	Double pass	Borosilicate	75	No	/
Single Pass	Single pass	Borosilicate	75	No	/
PC ³	Cyclonic	Quartz	47	Yes	/

stability [8]. Some key issues have to be considered for coupling LC to ICP-MS in case of organic matrices. Those are thoroughly detailed in the first part of this study [1]. The interface between LC and ICP-MS is made of a Sample Introduction System (SIS) and a possible flow splitter prior to the SIS which may be required in case of organic matrices, to reduce the amount of organic solvent reaching the plasma [8]. As highlighted in Part I, various SIS have been used over the past decades for the speciation analysis of organic matrices but suitable choices were not always made. Moreover, our previous study clearly showed that using flow splitting to reduce the flow-rate entering SIS or any detection device could result in a significant increase in band broadening, especially when the split ratio is low.

The success of highly efficient separations depends on both the intrinsic column efficiency and the ability to preserve it by minimizing extra-column band broadening [9]. In order to maintain column efficiency, it is of prime importance to reduce extra-column band broadening in each device of the LC-ICP-MS instrument and in particular, in the interface prior to ICP-MS. This issue is especially critical in case of UHPLC separations because of low peak volumes. For complex samples, on-line two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) is known to be a powerful separation technique [10]. However, due to the extreme thinness of second dimension peaks, the success of this technique strongly depends on the reduction of the volumes located between the second dimension column and the detector [9]. Considering solute dispersion, the aim of this study was to compare commercially available devices (six nebulizers along with nine spray chambers) and their resulting combinations (i.e. 31) that are most commonly used [1]. Some recommendations for a proper selection of both nebulizer and spray chamber are provided as a result of this study.

2. Experimental section

2.1. ICP-MS/MS instrument and conditions

As shown in Part I, a large panel of nebulizers and spray chambers can be found in the literature, with different designs. In this work, concentric, parallel path, and cross-flow nebulizers were compared and evaluated, as well as, several spray chambers, such as single pass, double pass, impact bead, cyclonic. The experiments were carried out using an Agilent 8800 ICP-MS/MS system (Agilent Technologies). For the purpose of the study, 31 different SIS

configurations, each composed of one nebulizer (among 6) and a spray chamber (among 9) were tested. Among 54 possible combinations, 31 were achievable from an instrumental point of view (some nebulizers cannot be mounted on every spray chamber due to instrumentation issues). A description of the six nebulizers and the nine spray chambers are given in Tables 1 and 2 respectively. In Table 1, tubing length and tubing internal diameter (i.d) correspond to the dimensions of the tubing located between the column outlet and the nebulizer entrance. Nebulizers were used in their original configuration, without any modification. On the other side, some spray chambers were equipped with a temperature controlled device and some of them were equipped with a baffle as highlighted in Table 2.

The instrument was equipped with a torch with a 1 mm i.d. injector (Agilent Technologies). The analyzer unit consists of two quadrupole mass analyzers and an octopole collision-reaction cell placed between both quadrupoles. Vanadium was detected in MS/MS mode with oxygen as a reaction gas in the cell. Vanadium 51 was shifted to mass 67. The following ICP-MS/MS parameters were used: plasma power: 1500 W, auxiliary gas: 0.9 L/min, plasma gas flow rate: 15 L/min. Both sampler and skimmer cones were made with platinum instead of nickel as usual, due to platinum inertness. The experimental conditions for the 31 tested combinations of a nebulizer and a spray chamber are listed in Table 3. For parameter optimization, a tune solution (1 ppb Li, Y, Tl, Ce, Co) was continuously delivered to the nebulizer using a peristaltic pump equipped with Viton® tubing dedicated to organic solvents at a speed of 0.1 rps (corresponding to a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$) except for total consumption spray chamber (i.e. 0.05 rps equivalent to 200 $\mu\text{L}/\text{min}$). For transient signal, the integration time was set at 0.1 s. ICP-MS/MS parameters were optimized to have the best trade-off between a high intensity for standard solutions of lithium, yttrium, and thallium at 1 ppb level and a low oxide ratio. The ratio $^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$ was used to monitor the oxide ratio level which should ideally be kept below 10% in case of organic solvent. The plasma gas flow rate, the auxiliary gas flow rate, the radio-frequency power, and the radiofrequency matching were kept constant for all studied combinations of nebulizers and spray chambers. The carrier gas flow rate, the sampling depth, and the optional gas flow rate were optimized to achieve the higher intensity (cps) for Li, Y, and Tl. In order to ensure a stable plasma and to avoid carbon deposit on the cone surface (sampler and skimmer), oxygen was mixed with argon (20% of O_2 in Ar) and carried to ICP-

Table 3

List of the 31 studied combinations of nebulizers and spray chambers and their corresponding operating conditions.

#	Spray chamber	Nebulizer	Carrier gas flow rate (L/min)	Spray chamber temperature	Optional gas (%) (20% O ₂ in Ar)	Sampling depth (mm)
1	IsoMist (Twinnabar)	PFA-LC	0.8	−2 °C	27	9
2		Micromist	0.6		40	5
3		PFA-LC	0.6		40	6
4	Twinnabar	Burgener	0.55	Not controlled	4	6
5		Opalmist	0.35		45	5
6		Savillex	0.4		45	5
7		Micromist	0.75	2 °C	23	4
8		PFA-LC	0.55		20	5
9	Agilent 8800	Crossflow	0.75		25	3
10		Burgener	0.3		20	4
11		Micromist	0.65		35	6
12	Impact bead (Conical Spray Chamber)	PFA-LC	0.6		35	5
13		Burgener	0.55		35	4
14		Opalmist	0.55		35	5
15		Micromist	0.9	Not controlled	45	5
16		PFA-LC	0.85		45	6
17	Spectro Large	Burgener	0.7		40	6
18		Crossflow	0.9		40	10
19		Micromist	1.3		35	5
20		PFA-LC	0.75		40	5
21	Single pass	Burgener	0.5		45	5
22		Crossflow	0.9		45	10
23	Total consumption	PFA-LC	0.51	Not controlled	50	9
24		PFA-LC	0.65		20	3
25		Micromist	0.4		25	5
26	PC ³	Burgener	0.55	−5 °C	15	3
27		Opalmist	0.35		25	5
28		Savillex	0.4		25	5
29		PFA-LC	0.85		45	8
30	Spectro Small	Micromist	0.85	Not controlled	45	8
31		Burgener	0.5		50	8

MS/MS with HMI tubing. The amount of oxygen was optimized by monitoring carbon emission band when introducing organic solvent, by visually assessing that no carbon was deposited on the sampler cone. Then, the carrier gas was optimized in the range of 0.3 to 0.9 L/min for every system. The intensity of Li, Y and Tl was monitored while changing carrier gas value. Such optimization was performed for every combination of nebulizers and spray chambers (#1 to #31) as shown in Table 3. An example of the carrier gas optimization is shown in supplementary information Fig. S1.

2.2. UHPLC instrument conditions

Flow injection analysis was performed with an ACQUITY UPLC I-Class system (Waters, Milford, MA, USA), including a high-pressure binary solvent pump with a maximum delivery flow-rate of 2 mL/min, an auto sampler with a flow-through needle of 15 μ L, a column oven with a maximum temperature of 90 °C and a diode array detector with a 500 nL flow-cell withstanding pressure up to 70 bar. The injection volume was 1 μ L. The wavelength was set at 407 nm for porphyrin detection. Data acquisition with a sampling rate of 40 Hz and instrument control was performed by Empower software. All experiments were performed with acetonitrile as mobile phase at 400 μ L/min (except for total consumption spray chamber working at 200 μ L/min), using a zero-dead volume union in place of the column. The oven temperature was 30 °C. The DAD detector was connected to the nebulizer with a PEEK tubing. Its dimensions were selected depending on the spray chamber design, namely 67 cm x 65 μ m for Agilent 8800, Spectro Large and Single-pass and 111 cm x 100 μ m for Twinnabar, Impact bead, Spectro Small, PC³, IsoMist, and total consumption.

2.3. Chemicals and sample preparation

2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21H,23H-porphine vanadium(IV) and LC-MS grade acetonitrile (ACN) were purchased

from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Tetrahydrofuran (unstabilized) UHPLC/MS grade, obtained from Biosolve Chimie SARL (Dieuze, France) was used as sample solvent. SPEX CertiPrep (Metuchen, NJ, USA) Co, Ce, Y, Tl, Li mono-elemental standards in 2% HNO₃ (1000 μ g/L) were used to prepare the multielement standard solution used for calibration. This solution with 1 ppb Co, Ce, Y, Tl, Li in acetonitrile was used for daily calibration of the ICP-MS/MS. Porphyrin sample was prepared at a concentration of 10 ppm in THF. Solutions were stored at 5 °C.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of 31 commercially available interfaces

Extra-column solute dispersion was evaluated in flow injection analysis by injecting a sample of porphyrin, using two different detectors (i.e. UV and ICP-MS/MS) in series and a SIS interface between them. A zero-dead volume union was used in place of the column. Porphyrin was first detected by UV, and then by ICP-MS/MS at $m/z = 67$. This compound was found to be attractive because of the presence of chromophores for UV detection and of chelated metal for ICP-MS/MS detection. The variance of dispersion due to the SIS interface (σ_{SIS}^2) was estimated by subtracting the peak variance, resulting from the solute travel into the UHPLC/UV instrument ($\sigma_{ext, UHPLC/UV}^2$), from the total peak variance, resulting from the whole solute travel ($\sigma_{ext, total}^2$):

$$\sigma_{SIS}^2 = \sigma_{ext, total}^2 - \sigma_{ext, UHPLC/UV}^2 \quad (1)$$

The calculations of σ_{SIS}^2 were based on the assumption that the contribution of both zero-dead volume union and ICP-MS/MS analyzer to total solute dispersion could be considered as not significant and hence could be disregarded.

Table 4

Mean Value (σ_{SIS}^2 (μL^2)) and Relative Standard Deviation (RSD) of the peak variance, induced by SIS alone, are given for five consecutive injections, for 31 combinations of nebulizers and spray chambers (SIS are ranked from the less dispersive system to the most dispersive one).

#	Nebulizer	Spray Chamber	Mean value σ_{SIS}^2 (μL^2)	RSD* (%)
3	PFA-LC	Twinnabar	6	10.0
23	PFA-LC	Total	8	58.8
1	PFA-LC	IsoMist	11	18.2
12	PFA-LC	Impact bead	12	13.3
24	PFA-LC	PC ³	42	4.8
20	PFA-LC	Single pass	44	13.6
29	PFA-LC	Spectro Small	70	20.2
2	MicroMist	Twinnabar	84	1.1
11	MicroMist	Impact bead	93	7.5
25	MicroMist	PC ³	93	8.6
19	MicroMist	Single pass	108	11.1
6	Saville	Twinnabar	125	10.4
8	PFA-LC	Agilent 8800	127	18.9
16	PFA-LC	Spectro Large	143	23.1
28	Saville	PC ³	155	3.9
30	MicroMist	Spectro Small	188	4.8
7	MicroMist	Agilent 8800	370	2.2
5	Opalmist	Twinnabar	642	2.2
14	Opalmist	Impact bead	694	2.0
13	Burgener	Impact bead	726	7.4
15	MicroMist	Spectro Large	865	5.5
27	Opalmist	PC ³	992	3.4
10	Burgener	Agilent 8800	1446	17.4
4	Burgener	Twinnabar	1582	11.6
17	Burgener	Spectro Large	1657	16.8
9	Crossflow	Agilent 8800	1674	7.2
22	Crossflow	Single pass	1724	1.9
26	Burgener	PC ³	2658	7.6
18	Crossflow	Spectro Large	2771	2.6
31	Burgener	Spectro Small	3769	9.7
21	Burgener	Single pass	8070	22.3

* Relative Standard Deviation.

Due to severe peak distortions, especially due to SIS, peak variances in volume unit, σ_v^2 , were calculated by means of the second order central moment, using an in-house program.

σ_{SIS}^2 values resulting from solute dispersion in 31 different combinations of nebulizers and spray chambers (31 settings as numbered in Table 3) were determined according to Eq. (1). To ensure a good reliability of the results, the solute was injected five consecutive times.

Among the 31 different SIS interfaces that were assessed with respect to extra-column band broadening, PC³, Twinnabar, and IsoMist are the most reported spray chambers in the literature [1]. The peak variances were determined without column for five replicates. Mean variance values in volume units and the corresponding Relative Standard Deviations (RSD) were calculated for each of the 31 SIS interfaces alone and for the UHPLC/UV system alone. Values for SIS alone (σ_{SIS}^2 according to Eq. (1)) are listed in Table 4. The mean variance value for the UHPLC/UV system ($\sigma_{ext, UHPLC/UV}^2$) was about 8 μL^2 . This value was found to be quite repeatable (RSD < 5%), thereby highlighting the reliability of the calculation method. As can be seen in Table 4, the range of σ_{SIS}^2 values, depending on SIS, is very large (from 6 to 8070 μL^2). Unlike UHPLC/UV system, the determination of σ_{SIS}^2 was poorly repeatable for most SIS with RSD values sometimes higher than 25%. For SIS #23, the RSD value was even close to 60% which might arise from the design of the spray chamber wherein the aerosol is not sorted out but entirely sent to the plasma, making solute dispersion uneven. More generally, solute dispersion in SIS appears to be less repeatable than in the rest of the UHPLC-UV/ICP-MS/MS system, suggesting a more uncertain dispersion process than with UV detection.

The lowest peak variance (i.e. 6 μL^2) was found with Twinnabar as spray chamber and PFA-LC as nebulizer (SIS #3 in Table 4).

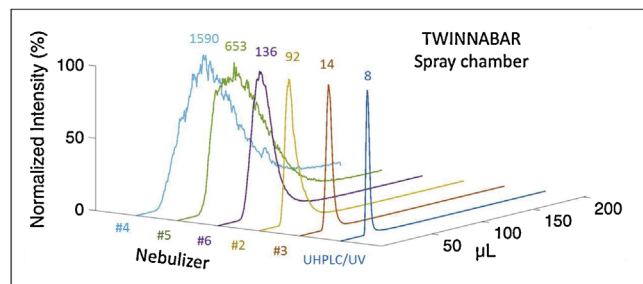


Fig. 1. Peaks obtained without column using the Twinnabar spray chamber and five different nebulizers: SIS #4 Burgener; SIS #5 Opalmist; SIS #6 Saville; SIS #2 MicroMist; SIS #3 PFA-LC; UHPLC/UV System. Sample: porphyrin (10 ppm in THF). Detected element: ⁶⁷V. Total extra-column peak variances are given above the peak apex (in μL^2). 1 μL injected. No column. Mobile phase: ACN. 407 nm. 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Different SIS combining Twinnabar and different nebulizers are compared in Fig. 1. The studied nebulizers included concentric (Opalmist, Saville, MicroMist, and PFA-LC) and parallel path (Burgener) ones. The peaks shown in Fig. 1 were normalized in order to better highlight to what extent the peak broadening can decrease the peak intensity and hence increase the signal-to-noise ratio (S/N). It is clear that the peak shapes are significantly different depending on the nebulizer. Some peaks are symmetrical but large, some others are thinner but with severe peak tailing. Very bad peak shapes always result in low signal-to-noise ratios (S/N), well correlated with high peak variances. The worst peak shape was obtained with the Burgener nebulizer which led to a measured peak variance close to 1600 μL^2 . Such a significant dispersion can arise from the large internal diameter (i.e. 380 μm) of the connecting capillary located between UV-detection and the nebulizer but also from the nebulizer itself due to its large orifice and its large internal volume (108 μL). This latter has been designed to avoid the risk of clogging which makes this nebulizer very attractive when particles or salts are present in the sample. Burgener is expected to be ideally operated at high flow-rates (i.e. > 800 $\mu\text{L}/\text{min}$) rather than 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ as in the present study. This may contribute to further explain the very large peak observed in Fig. 1. Both Opalmist and Saville nebulizers led to low S/N values in addition to significant band broadening (peak variance of 653 and 136 μL^2 respectively) making them also inappropriate for UHPLC separations. The best peak shapes and hence the best S/N values were obtained with PFA-LC or MicroMist as nebulizers. It can be noticed that both PFA-LC and MicroMist were designed with low internal volumes, (i.e. 2 and 6 μL respectively), thereby explaining the low peak variances. However, the variance value with MicroMist (92 μL^2) was significantly higher than with PFA-LC (6 μL^2) which is due to their difference in volume but also to their different design which can affect solute dispersion as highlighted by the severe peak tailing in case of MicroMist (Fig. 1). A comparison of the peaks obtained with MicroMist (Fig. 2a) or PFA-LC (Fig. 2b) and different spray chamber is given in Fig. 2. A significant peak tailing along with low S/N can be observed with all studied spray chambers when using MicroMist as nebulizer (Fig. 2a). In contrast, the obtained peak shapes are much better when using PFA-LC (Fig. 2b) which also results in a higher S/N. One exception can be noted in the case of Spectro-large providing a better peak shape with MicroMist (Fig. 2a) than with PFA-LC (Fig. 2b). The advantage of PFA-LC over MicroMist can also be related to the material which is made of perfluoroalkoxy (PFA) in case of PFA-LC while of borosilicate in case of MicroMist. As a result, the observed peak tailing with MicroMist (Fig. 2a) could be explained by a higher wettability of borosilicate compared to PFA (contact angle of 38.5° with water for borosilicate vs 98.5° for PFA) [11]. These nebulizers also differ by the recess of the internal capillary. With PFA-LC, the capillary is more recessed than with MicroMist. As a result, the two

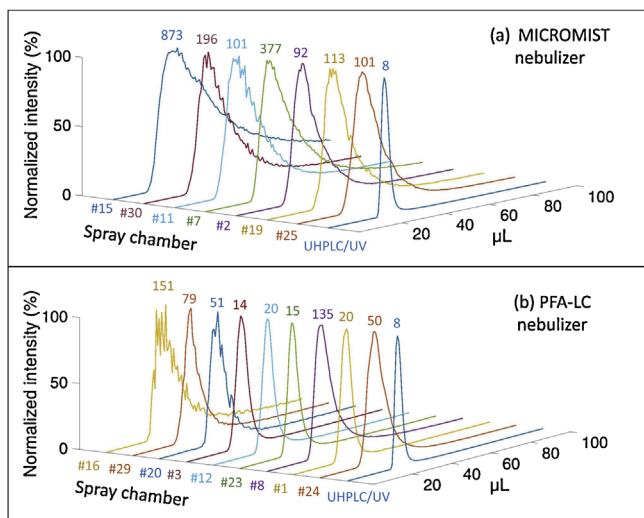


Fig. 2. Peaks obtained without column using two different nebulizers: (a) Micromist and 7 different spray chambers: SIS #15 Spectro Large; SIS #30 Spectro Small; SIS #11 Impact bead; SIS #7 Agilent 8800; SIS #2 Twinnabar; SIS #19 Single pass; SIS #25 PC3; UHPLC/UV and (b) PFA-LC and 9 different spray chambers: SIS #16 Spectro Large; SIS #29 Spectro Small; SIS #20 Single pass; SIS #3 Twinnabar; SIS #12 Impact bead; SIS #23 Total; SIS #8 Agilent 8800; SIS #1 IsoMist; SIS #24 PC3; UHPLC/UV. Total extra-column peak variance are given at peak apex (in μL^2). Flow-rate: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ for every Spray chamber except for total consumption spray chamber Flow-rate: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Same other conditions as in Fig. 1.

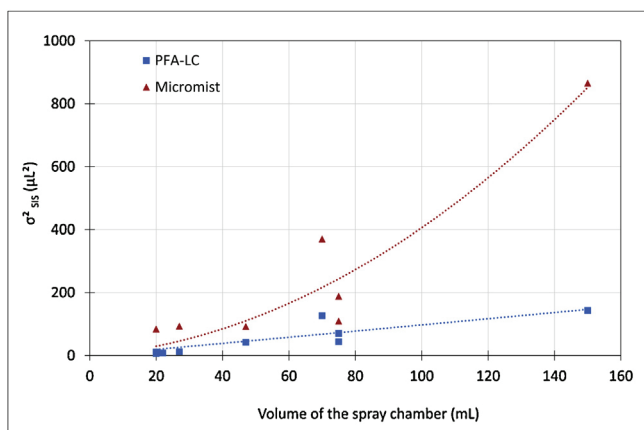


Fig. 3. SIS peak variance as a function of the volume of the spray chamber with PFA-LC (■) and Micromist (▲) as nebulizers. Each data point corresponds to a specific spray chamber among nine listed in Table 2.

streams (gas and liquid) interact, thus promoting the formation of a fine aerosol [12]. This latter might reduce solute dispersion, hence leading to a very low dispersion variance when combining PFA-LC and Twinnabar (14 μL^2). Nevertheless, calculated peak variances vary from 92 to 873 μL^2 with Micromist while from 14 to 151 μL^2 with PFA-LC making this latter nebulizer of major interest for speciation analysis under UHPLC conditions. Finally, it is important to note that for both nebulizers (PFA-LC and Micromist), S/N strongly depends on the spray chamber, making the selection of this latter critical in many ways. The nine commercially available spray chambers, evaluated in this study, also differed by their design and their volume. It is likely that some mixing occurred into SIS. Depending on its design, the interface can be considered either as a tube or as a mixing chamber. As shown in Fig. 3, the variation of the peak variance with the volumes of the different spray chambers seems to be well fitted by a parabolic curve, suggesting, for most studied spray chambers, that a dispersion process took place, similar to that occurring into a mixing chamber [13]. However, Agilent

8800, Spectro Small and Single-pass have similar volumes (i.e. 70; 75 and 75 mL respectively) while quite different measured peak variances (from 109 μL^2 to 370 μL^2). This suggests that the volume of the spray chamber is not the only factor that can affect extra-column band broadening. Single-pass aerosol path is likely to be different from Spectro Small and Agilent 8800 ones, both spray chambers being double pass as detailed in Table 3. For the largest spray chamber (i.e. Spectro large; 150 mL), the peak variance attained 143 μL^2 with PFA-LC while 865 μL^2 with Micromist. These differences can be ascribed to the design of the nebulizer itself as previously discussed, but also to the quality of the aerosol produced in these conditions. With large spray chambers (above 40 mL), the total extra column variance was higher than 50 μL^2 with PFA-LC and higher than 90 μL^2 with Micromist.

The loss in plates due to the instrument is expected to be directly related to the column variance, σ_c^2 . As a result, it depends on both the retention factor, k and the column geometry (column length, L_c , column internal diameter, d_c , and particle size, d_p). Based on known relationships (Eqs. (2–4)), it is possible to plot the variation of the remaining plates, β^2 (%) as a function of the retention factor, considering either HPLC or UHPLC conditions. The corresponding curves are shown in Fig. 4a and b respectively, for different SIS (#3, #1, #24, #2, #7, #4, #31, #21). β^2 is the ratio of the column variance, to the measured total peak variance ($\beta^2 = \sigma_c^2 / \sigma_{\text{total}}^2$). It was calculated by using the following relationships [1]:

$$\sigma_c^2 = \frac{V_0^2 \times (1 + k)^2}{L_c} \times h d_p \quad (2)$$

Where k is the retention factor, h , the reduced height equivalent to a theoretical plate, d_p , the particle size and V_0 the column dead volume given by

$$V_0 = \frac{\pi \varepsilon_t d_c^2 \times L_c}{4} \quad (3)$$

Where ε_t is the total column porosity and d_c , the column diameter

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \sigma_{\text{ext, total}}^2 + \sigma_c^2 \quad (4)$$

leading to

$$\beta^2 = \frac{1}{1 + \sigma_{\text{ext, total}}^2 / \sigma_c^2} \quad (5)$$

Calculations were performed by considering no other source of dispersion in the instrument, $h = 3$ and $\varepsilon_t = 0.6$. For sake of clarity, only 7 curves, corresponding to 7 different SIS interfaces (among 31 studied), were represented in Fig. 4. SIS #1, #3, #2 and #24 are the most widely reported in the literature. SIS #7 is interesting because it is the configuration proposed by Agilent Technologies for the ICP-MS/MS instrument used in this study. Although hardly reported, it is worth citing SIS #4, #31 and #21 because they led to very high peak variances. In case of HPLC conditions (i.e. a 150 $\times$ 4.6 mm column packed with 5 μm particles), maintaining more than 80% of plates with a retention factor lower than 2 appears to be possible with four SIS only among the seven ones represented in Fig. 4a. SIS #4 is acceptable for retention factors higher than 4, SIS #31 for retention factors higher than 6 and SIS #21 for retention factors higher than 10. More generally, all SIS generating a peak variance higher than 2000 μL^2 (see Table 4) are expected to be inappropriate for HPLC unless accepting a dramatic loss is column plates. In case of UHPLC conditions (i.e. a 50 $\times$ 2.1 mm column packed with sub-2 μm particles), this issue is much more critical considering the low column volume involved. As shown in Fig. 4b, no SIS allows to keep more than 80% of the column plates with a retention factor of 2. For only two combinations of nebulizer and spray chamber, namely SIS #3 (PFA-LC and Twinnabar) and SIS #1 (PFA-LC and IsoMist), the percentage of remaining plates attains

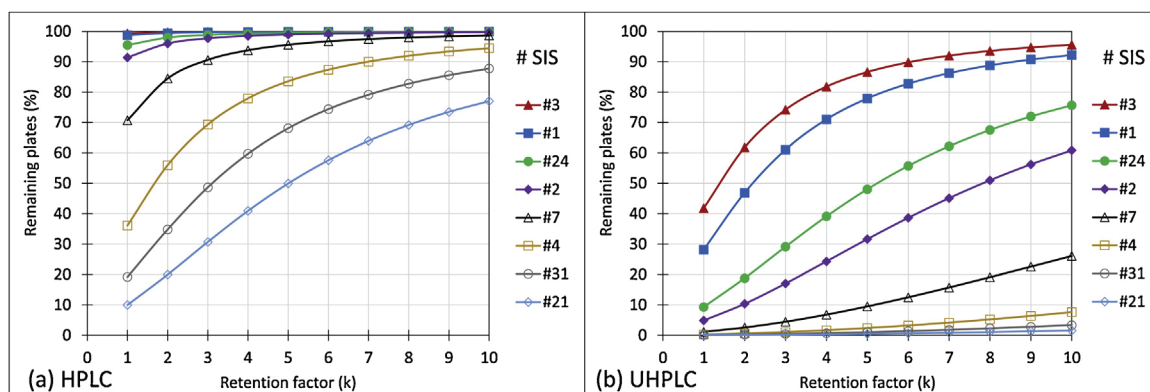


Fig. 4. Percentage of remaining plates as a function of retention factor for different column geometries (a) HPLC column (150 × 4.6 mm, 5 μm) and (b) UHPLC column (50 × 2.1 mm, 1.7 μm) for different SIS with #3: $\sigma_{SIS}^2 = 6 \mu\text{L}^2$; #1: $\sigma_{SIS}^2 = 11 \mu\text{L}^2$; #24: $\sigma_{SIS}^2 = 42 \mu\text{L}^2$; #2: $\sigma_{SIS}^2 = 84 \mu\text{L}^2$; #7: $\sigma_{SIS}^2 = 370 \mu\text{L}^2$; #4: $\sigma_{SIS}^2 = 1582 \mu\text{L}^2$; #31: $\sigma_{SIS}^2 = 3769 \mu\text{L}^2$; #21: $\sigma_{SIS}^2 = 8070 \mu\text{L}^2$. Calculations from Eqs. (2–5), with $\epsilon_t = 0.60$, $h = 3$. SIS numbered in Table 4.

80% provided that the retention factor is higher than 5. For the same retention factor of 5, the percentage of remaining plates significantly decreases for both SIS #24 (PFA-LC and PC3) and SIS #2 (MicroMist and Twinnabar) (down to 50% and 30% respectively). Finally, all other SIS are expected to be quite inappropriate in UHPLC unless all retention factors are kept far above 10 which does not fulfill the quality standard in chromatography.

In light of the above, the top 4 ranked SIS for UHPLC conditions (Fig. 4b) were found to be SIS #3, #1, #24 and #2. They all led to extra-column peak variances lower than $85 \mu\text{L}^2$, far below the next ranked SIS (i.e. SIS #7 with $370 \mu\text{L}^2$). These 4 configurations also correspond to the most widely used ones compared to other ones reported in Table 4 (SIS #23, #12, #20 and #29) which could also be considered as attractive because they lead to similar peak variances.

For the best three SIS (#3, #1 and #24), the nebulizer (i.e. PFA-LC) was the same. In order to assess the reproducibility of our measurements, these latter were performed over three consecutive days. Considering the peak variance, the day-to-day variability was found to be similar for the three configurations (RSD of about 30%), slightly higher than the run-to-run variability reported in Table 4. Considering peak areas, the run-to-run variability was higher with all SIS (RSD of 5–15%) than with UV detection alone (RSD of 1–2%). The severe uncertainty on peak areas is strongly related to the specificity of the SIS interface and fully explains the need for an internal standard in quantitative analysis in LC-ICP-MS/MS. The day-to-day variability on peak areas was in the same order of magnitude except in case of SIS #3 (RSD of 50%). Such high variability can be related to the position of the PFA-LC tip which is likely to be a key factor for achieving reproducible results. As highlighted by Todoli and Mermet [12], the produced aerosol is not fully symmetrical. The position of the nebulizer impacts on the signal, due to the recession of the capillary tip. The poor reproducibility of peak area measurements can also be explained by the fact that the instrument setting was in-house made whereas the Twinnabar spray chamber is not designed to be mounted alone on the ICP-MS/MS instrument. No fittings were found to be optimal to properly fix the spray chamber to the HMI tubing, resulting in a signal significantly affected by the variability of the spray chamber position. The combined use of both IsoMist and temperature controlled Twinnabar allowed us to address this latter issue. This new Twinnabar device (called IsoMist) was indeed designed for ICP-MS/MS 8800. The resulting day-to-day variability on peak areas was lower with this optimized configuration (SIS #1, RSD of 5%).

The preceding results were obtained without column, in flow injection analysis (FIA). They allowed us to evaluate the impact of different commercial SIS on total extra-column dispersion. From

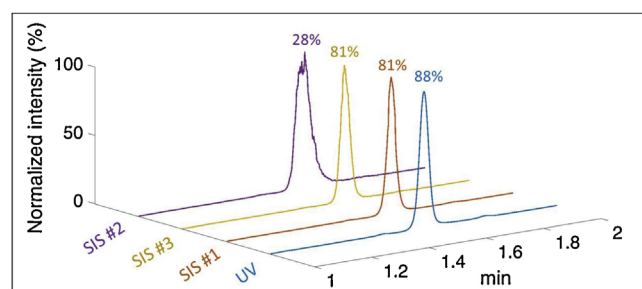


Fig. 5. Peaks obtained with ACQUITY BEH C18 column (50 × 2.1 mm, 1.7 μm) using different Sample Introduction Systems and with UV detection: SIS #2 Micromist + Twinnabar; SIS #3 PFA-LC + Twinnabar; SIS #1 PFA-LC + IsoMist; UHPLC/UV system; Fraction of remaining plates, β^2 , are given above the peak apex (Calculations from Eq. (2–5), with $\epsilon_t = 0.60$, retention factor of 5, and $h = 3$). Same conditions as in Fig. 1.

these results, SIS #1, #2 and #3 were found to be the most suitable for future UHPLC-ICP-MS/MS analysis, considering both the extra-column dispersion and the reliability in quantitative analysis. In order to emphasize these results, Vanadium 67 in a porphyrin sample was analyzed by RPLC-ICP-MS/MS in UHPLC conditions using SIS #1, #2 and #3 as interface between UV detection and ICP-MS/MS. Porphyrin peak obtained with UV detection and ^{67}V peaks obtained with ICP-MS/MS detection using the 3 different interfaces are shown in Fig. 5. With acetonitrile as mobile phase and an Acquity BEH C18 (50 × 2.1 mm; 1.7 μm) column, the retention factor was close to 5. The peak variance was assessed from the measured peak width at 10% of peak height using the Dorsey-Foley equation [14]. The resulting measured total peak variance, σ_{total}^2 , allowed to determine the percentage of remaining plates (i.e. $100 \times \sigma_c^2 / \sigma_{total}^2$, with σ_c^2 calculated according to Eq. (2)). The obtained values are given above the peak apex in Fig. 5. As expected the percentage of remaining plates is very high with UV detection (88%) due to low extra-column volumes in UHPLC system (low $\sigma_{ext, UHPLC/UV}^2$ values). SIS #1 and SIS #3 also allowed to keep a high percentage of remaining plates (i.e. > 80%) in good agreement with the curves shown in Fig. 4, the larger part of σ_{total}^2 , coming from σ_c^2 ($k = 5$). With the last combination (SIS #2), the percentage of remaining plates was below 30% (i.e. 28%), also in good agreement with the theoretical calculations shown in Fig. 4 where the theoretical remaining plates with a UHPLC column was found to be close to 30% for a retention factor of 5. It is important to underline that although SIS #1 and SIS #3 led to such high percentage of remaining plates, that was achieved for a rather high retention factor ($k = 5$) which means that for any less retained peaks, the percentage of remaining plates

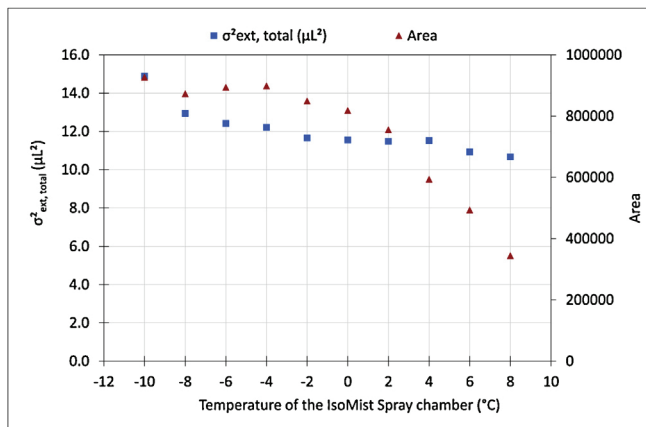


Fig. 6. Total peak variance (■) and peak area (▲) as a function of the spray chamber temperature (IsoMist) with the PFA-LC nebulizer (SIS #1). Same conditions as in Fig. 1.

should be below 80%. Anyway, under UHPLC conditions, the combined use of PFA-LC and IsoMist (SIS #1) or alternatively, PFA-LC and Twinnabar (SIS #3), was experimentally proved to be the best option.

3.2. Effect of the spray chamber temperature

Considering the spray chamber, an additional advantage of IsoMist (SIS #1) over Twinnabar (SIS #3) is that its temperature can be modified. It was reported that the temperature into the spray chamber may have an impact on the quality of the aerosol [15], suggesting an impact on both dispersion and sensitivity. We therefore studied the effect of IsoMist temperature (from -10°C to 8°C) on both peak variance and peak area. As shown in Fig. 6, the peak variance due to SIS seems to be not significantly affected by the temperature within the studied range. In contrast, the peak area, and hence the detector sensitivity, is constant up to -2°C while it significantly decreases beyond. The impact of the spray chamber temperature on detector sensitivity was often reported [8,16,17]. It was explained by the fact that decreasing the solvent temperature reduces the solvent vapor pressure [8] avoiding plasma degradation [12]. This results in a decrease in solvent amount per time unit entering the plasma [18] and finally in an increase in signal intensity. In this study, plasma parameters were kept constant when the spray chamber temperature was changed. It is likely that plasma parameters and IsoMist temperature might be better suited if they were optimized together. Nevertheless, this possibility of increasing the signal by tuning the temperature offers an additional advantage to IsoMist over all other studied spray chambers (Spectro Large, Spectro Small, Twinnabar, Impact bead, total consumption).

3.3. Effect of the mobile phase flow rate

The appropriate flow-rate for a given separation is dependent on theoretical considerations taking into account the column internal diameter, the particle size, and the solute diffusivity [19]. However it is well-known that the appropriate flow-rate for a detection purpose may be quite different. The aim of this section was to evaluate, without column, the impact of the flow-rate (from 200 to $600\ \mu\text{L}/\text{min}$) on both σ_{SIS}^2 and the peak area, using the two best SIS interfaces according to the above discussion. The variation of σ_{SIS}^2 with the mobile phase flow-rate is shown in Fig. 7 for SIS #1 (blue square) and SIS #3 (red triangle). For both SIS, σ_{SIS}^2 increases linearly with the flow-rate (Fig. 7a) which is well supported by theoretical equations expressing the dispersion in an ideal tube [13]. σ_{SIS}^2 was doubled between $200\ \mu\text{L}/\text{min}$ ($6\ \mu\text{L}^2$) and $600\ \mu\text{L}/\text{min}$ (12

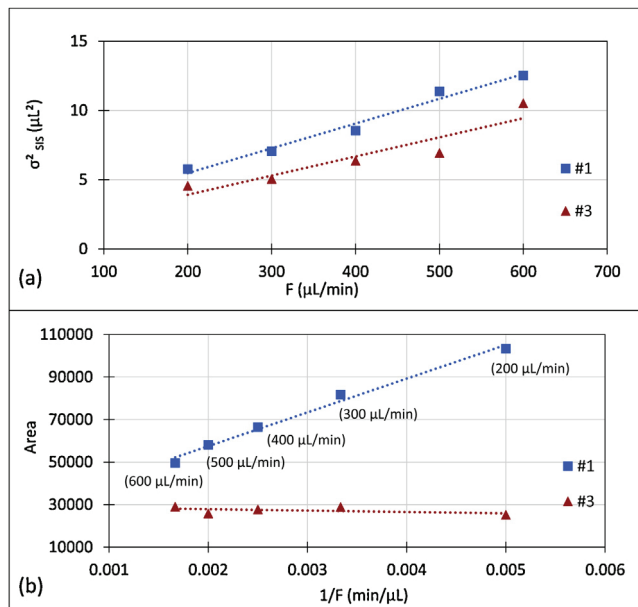


Fig. 7. (a) SIS peak variance and (b) peak area as a function of the mobile phase flow-rate with two combinations of nebulizer and spray chamber: #1-PFA-LC + IsoMist (■), #3-PFA-LC + Twinnabar (▲). Same conditions as in Fig. 1.

μL^2) which can affect less retained compounds as highlighted in Fig. 4b. However such variance values remain close to those resulting from UHPLC/UV alone. The variation of peak area with the reciprocal of flow-rate (Fig. 7b) is quite different depending on SIS. For SIS #1 (blue squares) the peak area increases linearly with the reciprocal of flow-rate which is the usual trend of a concentration dependent detector (the detector response varies with the detector sensitivity and the analyte concentration at the detector inlet). Unlike for SIS #1, for SIS #3, the peak area is kept constant with the flow-rate (red triangles), which is in agreement with mass-flow dependent detector (the detector response varies with the detector sensitivity, the analyte concentration and the flow-rate at the detector inlet). As previously discussed, Twinnabar and IsoMist, have the same concentric design as well as the same volume. The only difference between both spray chambers is that IsoMist was specifically designed for ICP-MS/MS 8800. In light of this, the difference in detection behavior was quite surprising and not explained yet. However it is likely that SIS #3 should be better used with high flow-rates to enhance peak intensity.

This study has highlighted the importance of selecting an appropriate flow-rate capable to offer a good trade-off between column efficiency, low dispersion in SIS and high detector sensitivity.

4. Conclusion

This study highlights the difference between a large set of Sample Introduction Systems (SIS) in term of peak broadening. 6 nebulizers and 9 spray chambers, were compared under optimized plasma conditions, offering the possibility to compare 31 combinations. The difference in peak variance depending on commercially available SIS was found to be quite impressive (from $10\ \mu\text{L}^2$ to $8000\ \mu\text{L}^2$). The repeatability on peak variance measure was much higher with UHPLC-UV than with UHPLC-UV-ICP-MS/MS whatever SIS, suggesting a more uncertain dispersion process in SIS. As shown in part I of this study, extra-column dispersion should always be compared to the column variance, in order to minimize the loss in theoretical plates. Accordingly, the present study gives some recommendations for a proper selection of both nebulizer and spray chamber with respect to column geometry. Most of current

commercial SIS that provide less than 2000 μL^2 as extra-column variance, can be used in conventional HPLC without significant loss in theoretical plates (< 20%). Unfortunately, only PFA-LC in combination with IsoMist or Twinnabar as spray chamber (SIS #1, and SIS #3 respectively in this study) can be considered as suitable for UHPLC separations.

It has been shown that both nebulizer and spray chamber should be selected together. MicroMist nebulizer leads to severe peak tailing which is likely due to its raw material (borosilicate material) compared to PFA-LC. Whereas in most cases, PFA-LC provides the lowest variance values, compared to other nebulizers, the spray chamber has also to be chosen carefully to avoid additional peak variance. Reducing the volume of the spray chamber can usually lower solute dispersion.

The design of SIS affects the peak shape but also may affect the sensitivity. The study of the effect of the spray chamber temperature on both peak variance and peak intensity showed that the first one was not significantly affected by a change in temperature while the second one decreased drastically when temperature increased. These observations were in good agreement with previous studies using organic solvents in the mobile phase. Finally, the study of the impact of the mobile phase flow rate on both peak variance and peak area highlighted a difference in ICP-MS/MS behavior, working either as a concentration dependent detector or as a mass flow dependent detector depending on SIS.

Acknowledgment

The authors greatly appreciated the support of Elemental Scientific and Courtage Analyses Service.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.074>.

References

- [1] M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 Theoretical and experimental considerations on solute dispersion, *J. Chromatogr. A* 1565 (2018) 68–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.024>.
- [2] B. Klencsár, E. Bolea-Fernandez, M.R. Flórez, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Determination of the total drug-related chlorine and bromine contents in human blood plasma using high performance liquid chromatography–tandem ICP-mass spectrometry (HPLC–ICP-MS/MS), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 112–119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.019>.
- [3] S.J. Hill, M.J. Bloxham, P.J. Worsfold, Chromatography coupled with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry a review, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 17.
- [4] K.O. Amayo, A. Petursdottir, C. Newcombe, H. Gunnlaugsdottir, A. Raab, E.M. Krupp, J. Feldmann, Identification and quantification of arsenolipids using reversed-phase HPLC coupled simultaneously to high-resolution ICPMS and high-resolution electrospray MS without species-specific standards, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3589–3595, <http://dx.doi.org/10.1021/ac2005873>.
- [5] S.F. Boulyga, V. Loreti, J. Bettmer, K.G. Heumann, Application of SEC-ICP-MS for comparative analyses of metal-containing species in cancerous and healthy human thyroid samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 198–203, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2699-6>.
- [6] V. Vargas, J. Castillo, R. Ocampo Torres, B. Bouyssié, C.-P. Lienemann, Development of a chromatographic methodology for the separation and quantification of V, Ni and S compounds in petroleum products, *Fuel Process. Technol.* 162 (2017) 37–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2017.03.027>.
- [7] J.E. MacNair, K.D. Patel, J.W. Jorgenson, Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography: isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0- μm particles, *Anal. Chem.* 71 (1999) 700–708, <http://dx.doi.org/10.1021/ac9807013>.
- [8] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercoeur, F. Chartier, Tutorial: introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: a tutorial review. Part II. Practical considerations, *Anal. Chim. Acta* 885 (2015) 57–91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.039>.
- [9] M. Sarut, G. Crétier, S. Heinisch, Theoretical and practical interest in UHPLC technology for 2D-LC, *TrAC Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 104–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.005>.
- [10] F.T. van Beek, R. Edam, B.W.J. Pirok, W.J.L. Genuit, P.J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of heavy oil, *J. Chromatogr. A* 1564 (2018) 110–119, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.001>.
- [11] F.W. Hyde, M. Alberg, K. Smith, Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19 (1997) 142–149.
- [12] J.-L. Todolí, J.-M. Mermet, Liquid Sample Introduction in ICP Spectrometry: A Practical Guide, Elsevier Science, Amsterdam, 2008.
- [13] M. Martin, C. Eon, G. Guiochon, Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 108 (1975) 229–241, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)84666-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)84666-X).
- [14] J.P. Foley, J.G. Dorsey, Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730–737, <http://dx.doi.org/10.1021/ac00255a033>.
- [15] B. Klencsár, C. Sánchez, L. Balcaen, J. Todolí, F. Lynen, F. Vanhaecke, Comparative evaluation of ICP sample introduction systems to be used in the metabolite profiling of chlorine-containing pharmaceuticals via HPLC–ICP-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 135–144, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.031>.
- [16] A. Smith, J. Desmarchelier, Improved accuracy in the analysis of precious metals by ICP-OES, *Appl. Note Glass Expans.* (2010).
- [17] F.J.M.J. Maessen, P.J.H. Seevers, G. Kreuning, Analytical aspects of organic solvent load reduction in normal-power ICPs by aerosol thermostating at low temperatures, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 39 (1984) 1171–1180, [http://dx.doi.org/10.1016/0584-8547\(84\)80203-7](http://dx.doi.org/10.1016/0584-8547(84)80203-7).
- [18] F.J.M.J. Maessen, G. Kreuning, J. Balke, Experimental control of the solvent load of inductively coupled argon plasmas and effects of the chloroform plasma load on their analytical performance, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 41 (1986) 3–25, [http://dx.doi.org/10.1016/0584-8547\(86\)80135-5](http://dx.doi.org/10.1016/0584-8547(86)80135-5).
- [19] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289, [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509\(56\)80003-1](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1).

B. AUTRES POINTS FAIBLES DU COUPLAGE

I. TE AGILENT POUR LE COUPLAGE LC-ICP-MS/MS

Lors de la mise en place du couplage LC-ICP-MS/MS, la société Agilent préconise l'utilisation d'une pièce particulière entre le système chromatographique et le système d'introduction de l'échantillon dans l'ICP-MS/MS, appelée « T-joint earth block ». Cette pièce permet de relier à la terre le système d'introduction de l'échantillon mais permet aussi l'ajout d'une solution de make-up ou d'un étalon interne avec ses 3 voies comme le montre la Figure 3-1.

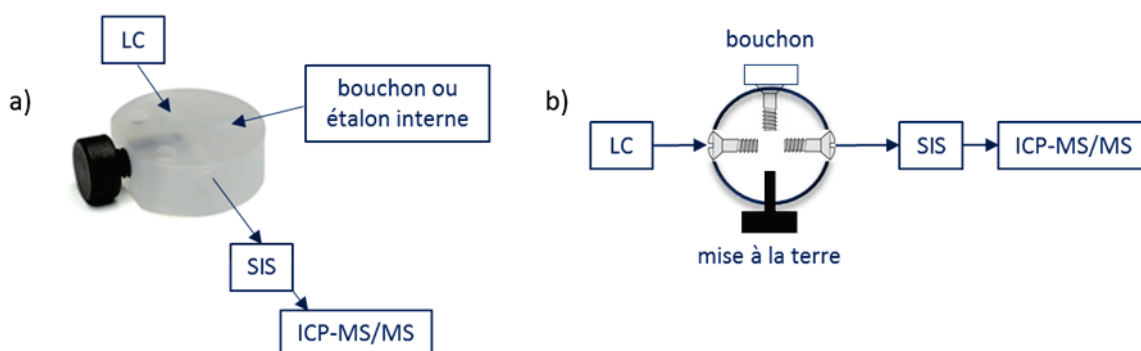


Figure 3-1 : T-joint de chez Agilent préconisé lors de l'utilisation du 8800 a) image du té et b) représentation schématique des différentes entrées/sorties dans le té

Aucune étude n'a été publiée sur l'impact qu'a ce té sur la dispersion extra-colonne du système, or l'ajout de chaque pièce apporte un volume mort qui doit être évalué au regard de la dispersion totale générée. Cette étude a donc pour objectif d'évaluer la dispersion extra-colonne dans ce té à différents débits. L'objectif étant de caractériser cette pièce additionnelle et de statuer de son utilisation lors des analyses de spéciation uni ou bidimensionnelles. Deux montages différents ont été réalisés, représentés sur la Figure 3-2 avec une détection UV dans le cas de l'analyse d'un standard de porphyrine. Le té est bouché comme indiqué sur la Figure 3-1 (b) pour être facilement comparé à un raccord union. La variance générée par le montage 1 est soustraite à la variance induite par le montage 2 dans le but d'isoler la variance générée par le té lui-même (tous les tubings étant égaux par ailleurs).

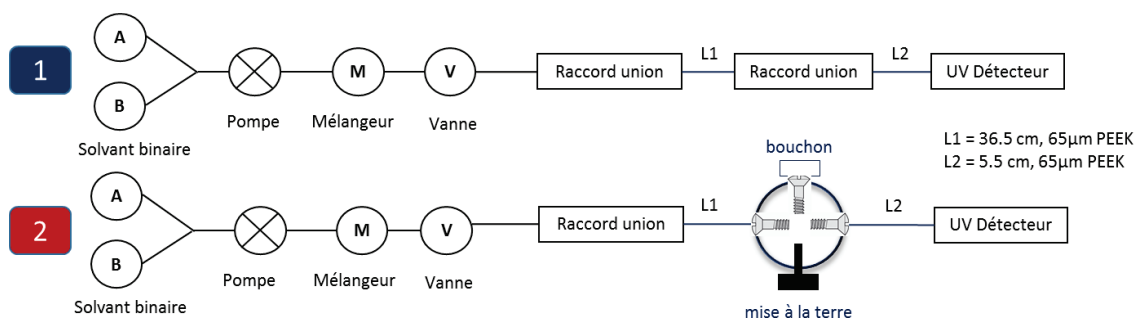


Figure 3-2 : Schéma des montages réalisés avec ou sans T-joint

L'influence du té est comparée sur la Figure 3-3. On observe sur cette figure que le chromatogramme rouge n'est pas superposable au chromatogramme bleu en raison d'un élargissement du pic sur le standard de porphyrine. Ce té génère donc de la dispersion supplémentaire par rapport à un raccord union. Le volume de ce té est inconnu mais il n'est sensiblement pas égal à zéro au vu des dispersions générées.

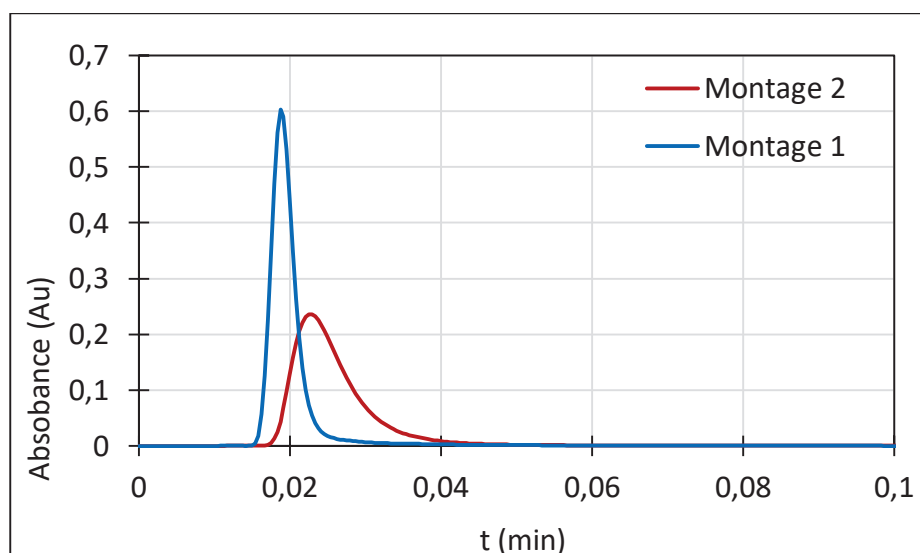


Figure 3-3 : Comparaison des montages 1 et 2 de la Figure 3-2. Chromatogrammes obtenus avec et sans té. Le té est bouché sur la troisième voie et est utilisé comme raccord union. (Conditions d'analyse : porphyrine 10 ppm, 1500 µL/min, 1 µL injecté, UV 407 nm, 40 Hz, isocratique ACN, THF solvant d'injection)

Plusieurs débits de phase mobile ont été testés pour connaître l'impact du débit sur la dispersion générée par le té. Pour cette étude, deux té, vendus par Agilent, ont pu être testés (T1 et T2) en apparence identiques. Sur la Figure 3-4, on constate tout d'abord que la dispersion diminue quand le débit augmente quel que soit le té utilisé. Dans le cas des faibles débits (< 100 µL/min) une déformation des pics est observée et la dispersion générée par le tube ne peut pas être évaluée. D'autre part, l'évolution de la dispersion en fonction du débit de liquide n'est pas la même pour les deux té utilisés. Même s'ils proviennent du même fournisseur, ils ne donnent pas la même dispersion extra-colonne et ne sont donc pas équivalents.

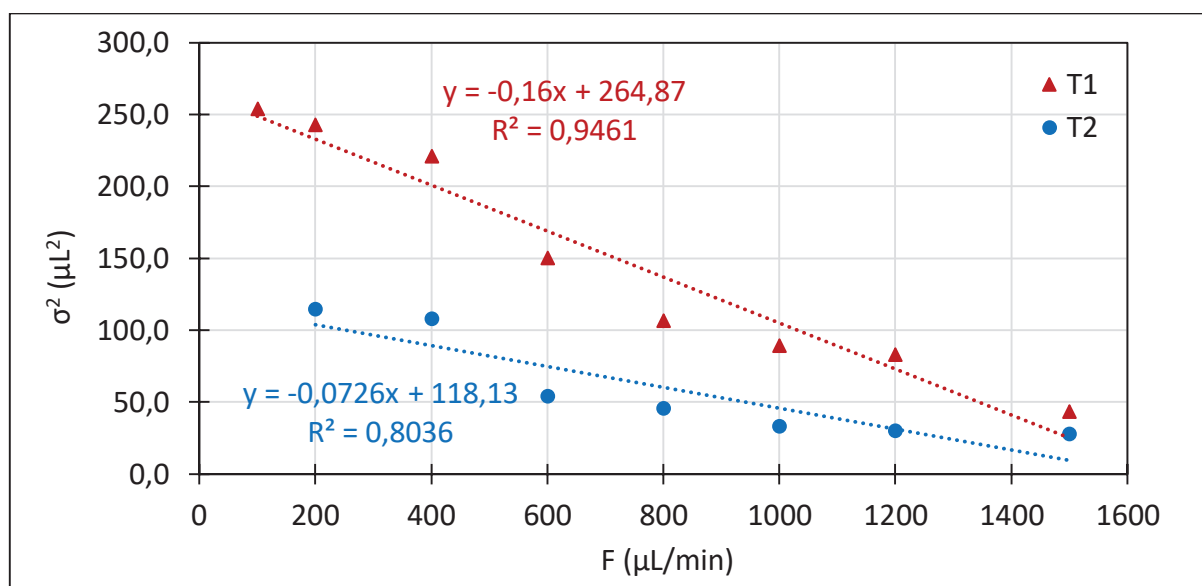


Figure 3-4 : Evolution de la dispersion liée aux tés T1 et T2 en fonction des débits de phase mobile (Conditions d'analyse : porphyrine 10 ppm, isocratique ACN, 1 μL injecté, UV 407 nm, 40 Hz, THF solvant d'injection)

Au vu de cette étude, ce té s'avère être une source additionnelle de dispersion. La mise à la terre n'est pas indispensable et son absence ne nuit pas au bon fonctionnement de l'appareil. Cette pièce sera donc écartée lors de la réalisation des couplages LC-ICP-MS/MS pour ne pas générer de dispersion additionnelle.

II. AUTRES CONNECTEURS POUR LE COUPLAGE LC-ICP-MS/MS

En fonction du nébuliseur utilisé il existe plusieurs types de connecteurs pour coupler la chaîne de chromatographie liquide à l'ICP-MS/MS. Dans le cas de l'utilisation du nébuliseur PFA-LC (Glass Expansion), la connectique suivante est utilisée (Figure 3-5) :



Figure 3-5 : Connectique utilisée pour relier la chaîne chromatographique au système d'introduction de l'échantillon PFA-LC

Le but de cette étude est d'évaluer la part de la dispersion générée par cette connectique additionnelle sachant qu'elle sera toujours utilisée en association avec le nébuliseur choisi : PFA-LC. De la même façon que précédemment, la dispersion générée par cette pièce est comparée à celle obtenue en l'absence de connectique (montages 1 et 2 de la Figure 3-6).

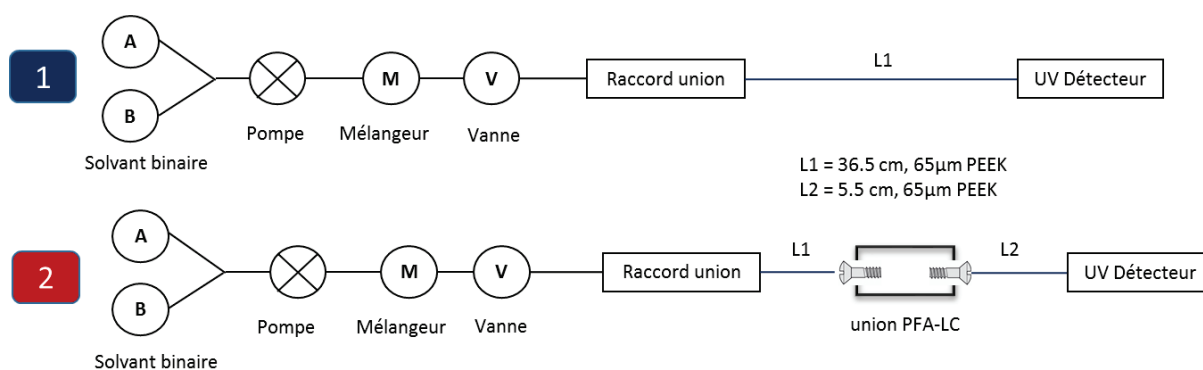


Figure 3-6 : Schéma des montages réalisés avec ou sans connecteur PFA-LC

Plusieurs débits de phases mobiles ont été testés dans le but d'évaluer la dispersion générée par une telle connectique. Comme le montre la Figure 3-7, lorsque les débits de phases mobiles sont inférieurs à 100 µL/min, des sauts de pression sont observés, probablement dus à un mauvais fonctionnement de la pompe, et les valeurs de dispersion deviennent très importantes. En revanche, au-dessus de 100 µL/min, la comparaison des deux montages montre un faible écart entre les montages 1 et 2. La connectique n'engendre que très peu de dispersion additionnelle (en moyenne 3 µL² supplémentaires générés par la connectique et le tubing L2 par rapport au montage 1), elle peut donc être utilisée pour la suite de l'étude.

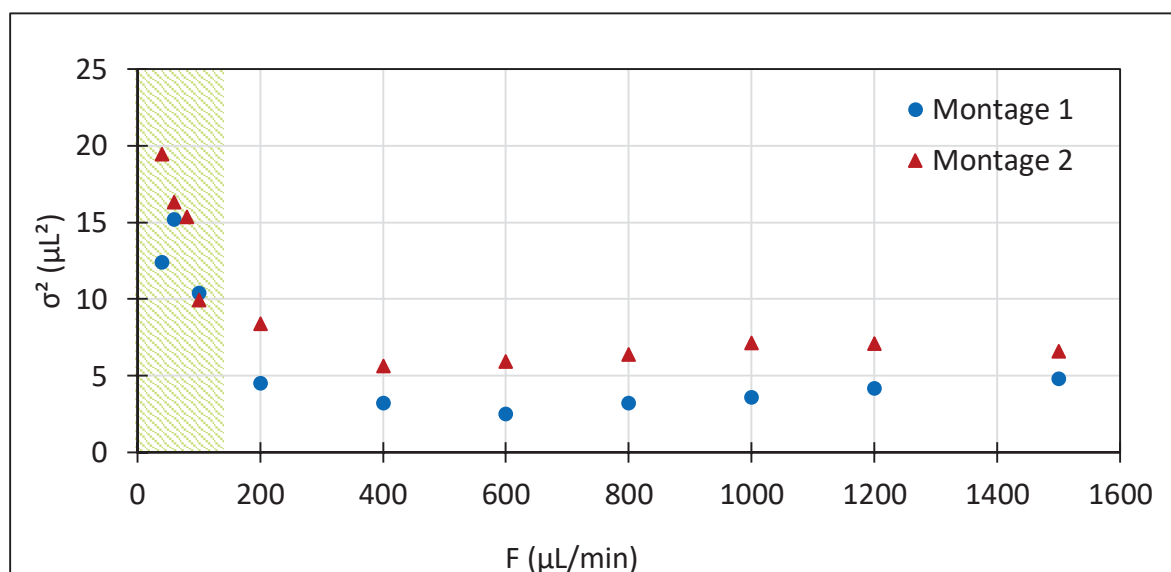


Figure 3-7 : Evolution de la dispersion totale en fonction du débit pour les montages 1 et 2 (Figure 3-6) (Conditions d'analyse : porphyrine 10 ppm, 1 µL injecté, UV 407 nm, 40 Hz, isocratique ACN, THF solvant d'injection)

III. ETUDE DE L'IMPACT DE DIFFERENTS PARAMETRES SUR LA QUALITE D'UN SPLIT

Comme énoncé dans le chapitre I, il est parfois intéressant d'utiliser un diviseur de débit (split) en sortie du système chromatographique avant d'introduire l'échantillon dans le

nébuliseur de l'ICP-MS/MS. D'un point de vue pratique et en raison de contraintes techniques, un faible débit en entrée de l'ICP-MS/MS sera souhaité. Certains nébuliseurs à consommation totale ou micro-concentrique, ne tolèrent que des très faibles débits de liquide (quelques dizaines de $\mu\text{L}/\text{min}$). Il est aussi parfois nécessaire de diminuer la quantité de solvant atteignant le plasma. De plus, d'un point de vue chromatographique, il sera peut-être pertinent de coupler la seconde dimension à un autre type de détection (type LC-MS ou UV) pour obtenir des informations complémentaires à celles fournies par l'ICP-MS/MS, l'utilisation d'un diviseur de débit pourrait donc être envisagée. Cependant, les différents paramètres liés au split peuvent induire une variance extra-colonne supplémentaire que nous avons souhaité évaluer. Ces résultats sont extraits de l'article 1 de cette thèse, publiée dans JCA (chapitre 1).

Le té permettant de réaliser le split a été sélectionné en s'appuyant sur des comparaisons de différents tés réalisés au laboratoire [1]. Cette étude a été effectuée en remplaçant la colonne par un raccord union sans volume, en injectant 1 μL d'une solution de méthylparabène à 75 ppm dans un mélange 50/50 Eau/MeOH. Comme le montre la Figure 3-8 le té est situé après le détecteur UV 1. Une partie de la phase mobile est ainsi envoyée à la poubelle, l'autre vers le détecteur UV 2. Le tube n°1 est localisé entre le détecteur 1 et le té, le tube n°2 entre le té et le détecteur 2 et le tube n°3 entre le té et la poubelle.

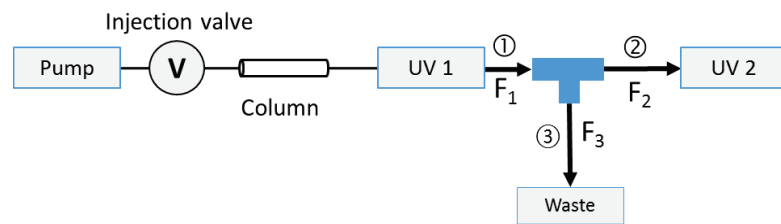


Figure 3-8 : Schéma du montage avec split (numérotation des tubes : le tube 2 part en direction du détecteur UV-PDA et le tube 3 en direction du drain)

Le ratio de split théorique, z_{th} , est obtenu à partir de la loi de Poiseuille en prenant en compte les dimensions des tubes n°2 et n°3 :

$$z_{th} = \frac{R_3}{R_3 + R_2} \text{ avec } R_i = \frac{L_i}{d_i^4} \quad (1)$$

L_i et d_i étant respectivement la longueur et le diamètre d'un tube « i ».

Un tel montage a permis de comparer les variances avant et après le split et d'en déduire ainsi la variance générée par le split, σ^2_{split} :

$$\sigma^2_{split} = \sigma^2_{D2} - \sigma^2_{D1} - \sigma^2_{tub\ n^{\circ}1} \quad (2)$$

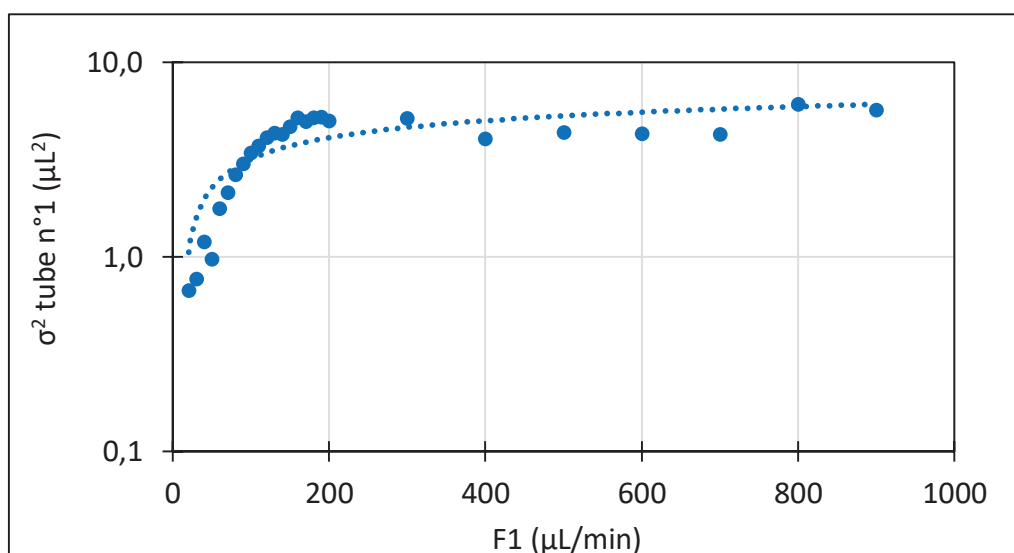
où σ^2_{D2} est la variance générée en sortie du détecteur 2, σ^2_{D1} la variance générée en sortie du détecteur 1 et $\sigma^2_{tubing\ 1}$ est la variance générée par le tube n°1.

A travers cette étude, 5 montages ont été étudiés et sont listés dans le Tableau 3-1. Le ratio de split mesuré, z_{mes} , est quant à lui obtenu à partir du débit, F2, dans le tube n°2 ($z_{mes} = F2/F1$). En l'absence de diviseur de débit, le ratio de split est de 1 (1:1). Les différences observées entre le ratio de split calculé et celui mesuré peuvent provenir des irrégularités dans les diamètres des tubes.

*Tableau 3-1 : Géométries des tubings et ratios de split utilisés pour les settings A, B, C, D et E.
Le ratio de split théorique est calculé à partir de l'équation (1)*

	Setting A	Setting B	Setting C	Setting D	Setting E
Tube n°1	60 cm x 100 μ m				
Tube n°3	-	62 cm x 100 μ m	44.5 cm x 65 μ m	24 cm x 100 μ m	132 cm x 127 μ m
Tube n°2	-	29 cm x 65 μ m	6 cm x 25 μ m	56 cm x 65 μ m	9 cm x 25 μ m
z_{th}	1:1	1:3.6	1:7.4	1:14	1:45
z_{mes}	1:1	1:4.8	1:4.8	1:9.4	1:50

Pour les 5 montages étudiés les dimensions du tube n°1 sont les mêmes. L'évolution de la dispersion extra-colonne générée par ce tube n°1 a donc été évaluée en fonction du débit F1 et est représenté Figure 3-9. L'évolution de la dispersion extra-colonne correspond à une fonction exponentielle. La dispersion augmente avec le débit jusqu'à atteindre un palier. En effet au-delà de 200 μ L/min la variance extra-colonne se stabilise aux alentours de 8 μ L². Ces observations sont en accord avec le fait que la variance d'un pic chromatographique évolue de façon linéaire à haut débit dans un tube non-idéal [2].



*Figure 3-9 : Evolution de la dispersion extra-colonne dans le tube n°1 en fonction du débit.
(Conditions d'analyses : 1 μ L injecté, 254 nm, 50/50 Eau/MeOH, sans colonne, sans split, méthylparabène 75 ppm, 50/50 Eau/MeOH solvant d'injection)*

De façon similaire, l'évolution de la dispersion dans le split a été étudiée et est représentée Figure 3-10. Deux situations différentes ont été testées pour évaluer l'impact du split sur la dispersion :

- une diminution du diamètre interne du tube n°2 tout en conservant un ratio de split identique (Setting B et C, Figure 3-10 (a)),
- une diminution du ratio de split, tout en conservant le diamètre interne du tube n°2 identique (Setting C, D et E, Figure 3-10 (b)).

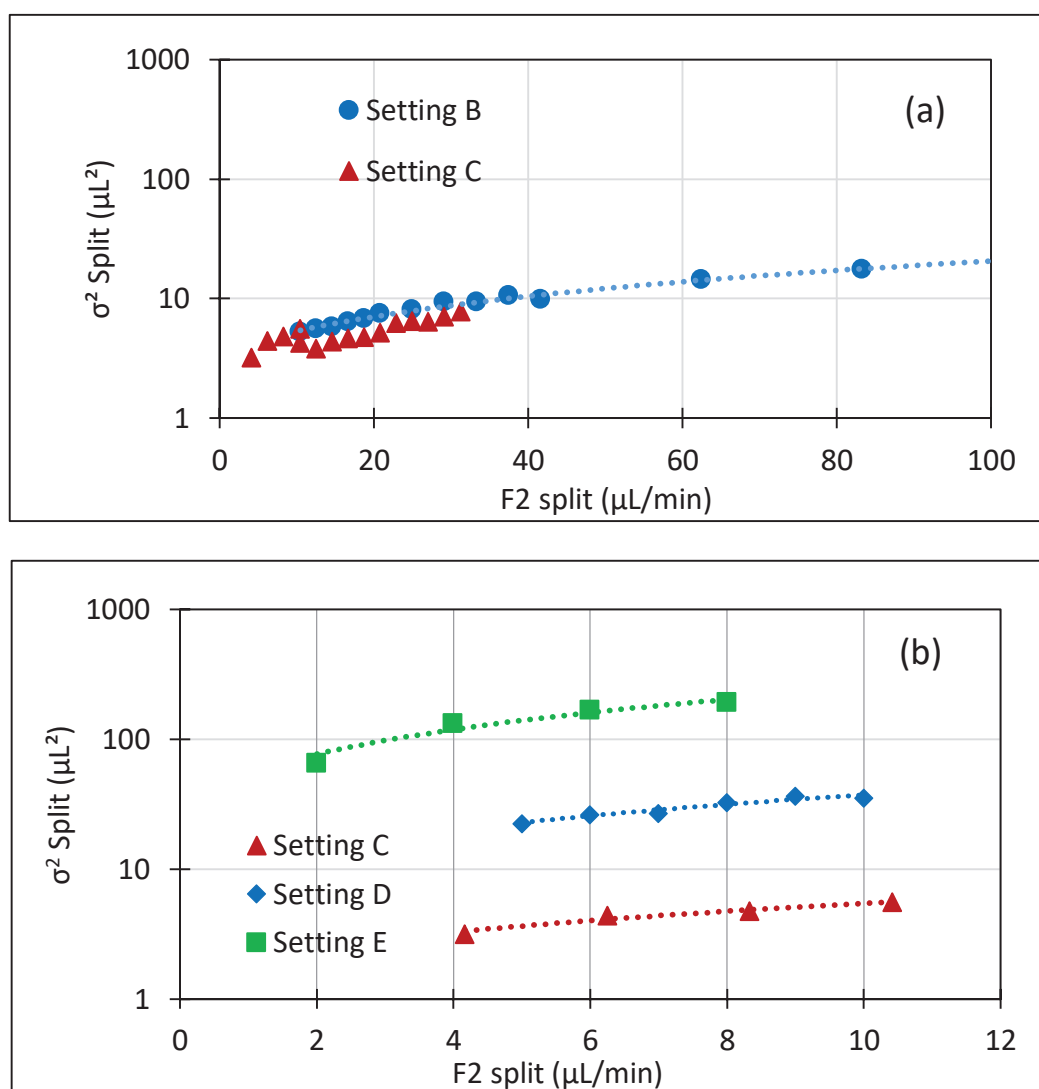


Figure 3-10 : Evolution de la dispersion générée par le split en fonction du débit F2 avec (a) l'effet du diamètre interne du tube n°2 (Setting B : 65 μm ou Setting C : 25 μm) pour un ratio de split donné (1:4.8), et (b) l'effet du ratio de split (Setting C : z_{mes} = 1:4.8, Setting D : z_{mes} = 1:9.4, et Setting E : z_{mes} = 1:50). (Conditions d'analyses : 1 μL injecté, 254 nm, 50/50 Eau/MeOH, sans colonne, méthylparabène 75 ppm, 50/50 Eau/MeOH solvant d'injection)

L'impact du diamètre interne du tube n°2 a été évalué en utilisant deux diamètres internes différents : 65 μm (Setting B) et 25 μm (Setting C). Comme le montre la Figure 3-10 (a) les variations de la dispersion en fonction du débit F2 sont similaires quel que soit le diamètre interne utilisés avec seulement 2 μL^2 de variance généré par de tel système. Ceci

indique que le diamètre interne n'a que très peu d'impact sur la dispersion générée par le split. D'autre part, l'impact du ratio de split a été étudié et au vu de la Figure 3-10 (b) il apparaît évident que le ratio de split a un impact significatif sur la dispersion générée par celui-ci. En effet pour un même débit F2 (ex : 8 $\mu\text{L}/\text{min}$), la variance mesurée augmente de 5 à 34 μL^2 pour un ratio de split divisé par un facteur 2 (1:4.8 – 1:9.4) et jusqu'à 200 μL^2 lorsque le ratio de split est divisé par 10. De plus, l'impact du ratio de split sur la dispersion peut-être visuellement observé sur les chromatogrammes, pour les différents montages étudiés.

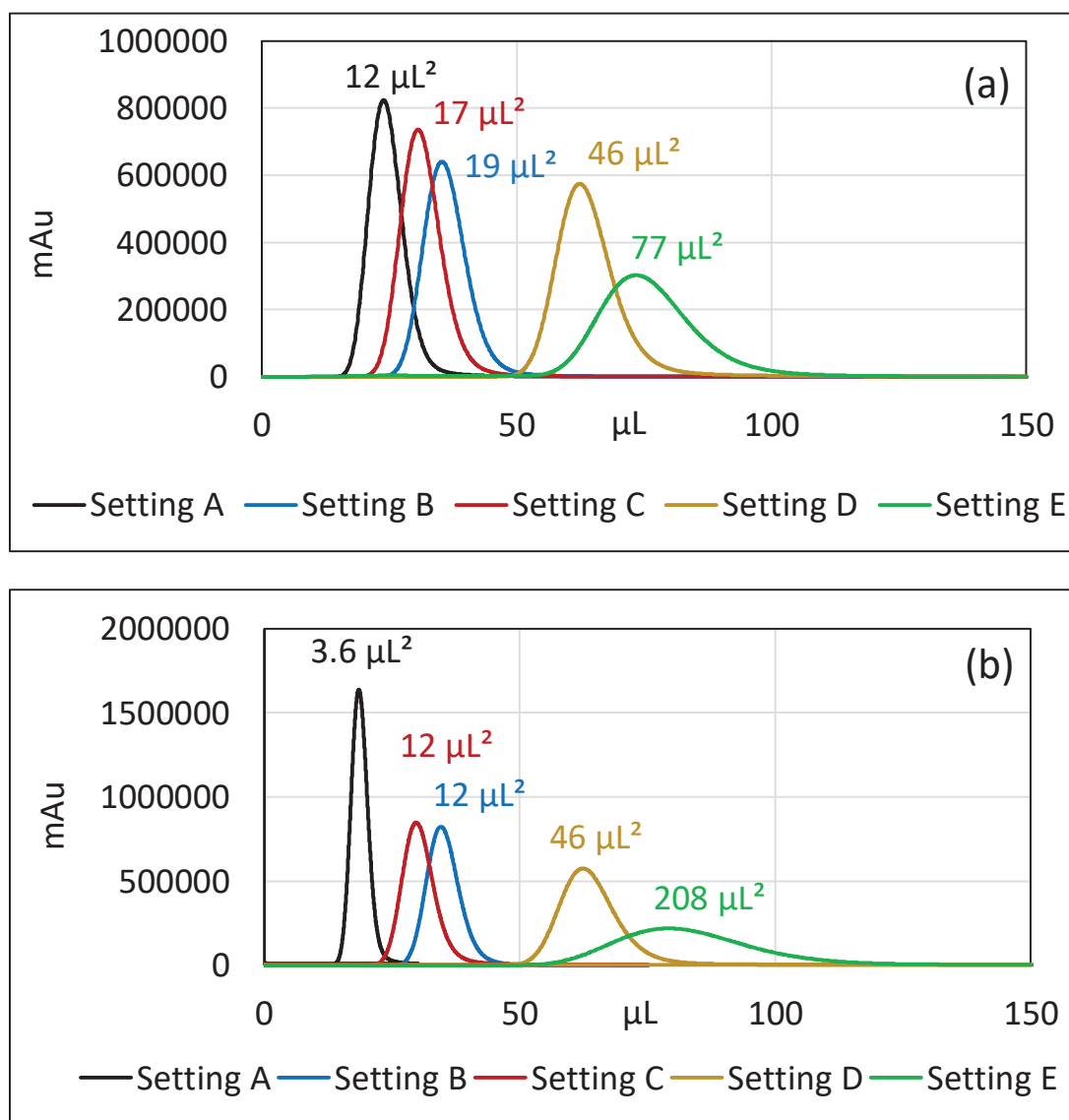


Figure 3-11 : Superposition des chromatogrammes obtenus sur le détecteur UV 2 pour les settings A, B, C, D et E. (a) Débits F1 identiques, impliquant différents débits F2 (respectivement 100, 20.8, 20.8, 10.6, 2 $\mu\text{L}/\text{min}$) et (b) différents débits F1, impliquant un débit F2 identique (10 $\mu\text{L}/\text{min}$). La dispersion extra-colonne générée est indiquée au maximum du pic. (Conditions d'analyses : 1 μL injecté, 254 nm, 50/50 Eau/MeOH, sans colonne, méthylparabène 75 ppm, 50/50 Eau/MeOH solvant d'injection)

Comme le montre la Figure 3-11 (a), l'allure du pic est nettement dégradée lorsque le ratio de split passe de 1:1 à 1:50 avec une variance générée atteignant 77 μL^2 . La dégradation

de l'allure du pic est d'autant plus visible que le débit F2 est faible. En effet, comme l'indiquent les chromatogrammes de la Figure 3-11 (b) pour un ratio de split de 1:50 la variance induite par le split est de $208 \mu\text{L}^2$. En parallèle des problèmes évidents liés à la dispersion lorsque que le ratio de split choisi est trop faible, des problèmes de sensibilité sont mis en avant à travers cette étude, justifiant le choix raisonné du ratio de split lors du couplage avec l'ICP-MS/MS.

CONCLUSIONS

La première partie de ces travaux de thèse a consisté en une optimisation de l'interface de couplage entre la partie LC et l'ICP-MS/MS en milieu organique. Ces travaux ont permis de comparer différents systèmes d'introduction d'échantillon vis-à-vis de la dispersion extra-colonne qu'ils génèrent. Pour cela, 6 nébuliseurs et 9 chambres de nébulisation ont été étudiés pour un total de 31 combinaisons testées. Des différences significatives en termes de dispersion ont pu être observées sur ces systèmes d'introduction commerciaux, avec des valeurs variant de 6 à 8000 μL^2 . L'association d'un détecteur UV en série avec l'ICP-MS/MS a permis de montrer que la répétabilité sur la mesure de la variance est bien meilleure dans le cas d'une détection UV plutôt qu'avec l'ICP-MS/MS, et ce quel que soit le système d'introduction choisi. La dispersion extra-colonne doit toujours être comparée à la variance colonne dans le but de minimiser la perte en plateaux théoriques. Le choix du nébuliseur et de la chambre de nébulisation doit donc être fait en accord avec les dimensions de colonnes choisies (HPLC, UHPLC...). La majorité des systèmes commerciaux génèrent moins de 2000 μL^2 de dispersion et peuvent donc être utilisés avec des colonnes de type HPLC sans induire une perte significative en nombre de plateaux théoriques (< 20 %). En revanche très peu de systèmes d'introduction commerciaux peuvent offrir des performances suffisantes pour être utilisés avec des colonnes de plus faibles diamètres, de type UHPLC. Seul le nébuliseur PFA-LC avec la chambre de nébulisation IsoMist semble convenir pour ce type d'utilisation.

D'autres points faibles du couplage ont fait l'objet d'une étude spécifique afin d'être en mesure de maîtriser l'intégralité du montage (choix des connectiques, maîtrise des paramètres d'un éventuel diviseur de débit...).

Une fois l'interface du couplage choisie et l'ensemble des paramètres finement étudiés, le développement de méthode bidimensionnelle doit porter sur les dimensions de séparation de première et de seconde dimension pour les matrices pétrolières sélectionnées.

REFERENCES

- [1] A. D'Attoma, Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés, Lyon 1, 2013. <http://www.theses.fr/2013LYO10214> (accessed April 28, 2016).
- [2] Kurt Hofmann, István Halasz, Mass transfer in ideal and geometrically deformed open tubes. I. Ideal and coiled tubes with circular cross section, J. Chromatogr. A. 173 (1979) 211–228. doi:[doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92292-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92292-1).

Chapitre 4 - DEVELOPPEMENT D'ANALYSES BIDIMENSIONNELLES ET APPLICATIONS AUX COUPES LOURDES DU PETROLE

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

Article 3

“Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the characterization of sulfur, vanadium and nickel compounds in petroleum products”

M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. (2019), in press

INTRODUCTION

L'étude menée dans le chapitre 3 a permis d'évaluer différentes interfaces de couplage entre la chromatographie liquide bidimensionnelle et l'ICP-MS/MS dans le but de sélectionner le système d'introduction générant le moins de dispersion externe, lors du couplage avec la chromatographie liquide bidimensionnelle. Pour répondre à la problématique de cette thèse qui est d'évaluer le potentiel du couplage de la chromatographie liquide bidimensionnelle avec une détection spécifique pour les matrices pétrolières, d'autres paramètres sont à prendre en compte. En effet, lors du développement de la chromatographie liquide bidimensionnelle les objectifs peuvent être parfois contradictoires, par exemple entre le pouvoir de résolution et la durée totale de l'analyse. Un compromis devra être trouvé pour maximiser la capacité de pics tout en minimisant le facteur de dilution et ce pour un temps d'analyse donné.

Ce chapitre porte donc sur le développement d'une analyse bidimensionnelle dans le cas de matrices pétrolières. La section A détaille les mécanismes de rétention envisagés. Une des dimensions de séparation explorée est la SEC, permettant une séparation selon le volume hydrodynamique des molécules, en association avec la RPLC comme seconde dimension de séparation, permettant une séparation selon l'hydrophobie des molécules. Au sein de cette étude, différentes phases stationnaires ont pu être testées pour les deux dimensions de séparation. Dans le but de maximiser le pouvoir de séparation, les modes on-line ou off-line ont été comparés à travers une étude théorique, au regard de la capacité de pics générée par ces systèmes bidimensionnels. La méthodologie développée est ensuite appliquée à un échantillon complexe pétrolier. Quatre fractions, communément appelées SARA, ont été analysées et les contours plots 2D obtenus pour chacune des fractions sont comparés dans le cas des éléments soufre, vanadium et nickel.

La section B de ce chapitre s'intéresse quant à elle à la sensibilité du plasma lorsqu'un gradient d'élution est utilisé en seconde dimension de séparation. Pour corriger ce phénomène deux méthodes ont été testées : (i) l'emploi d'une équation de correction, permettant de corriger la réponse du détecteur au cours du temps, ou encore (ii) l'utilisation de contre-gradient, permettant de s'affranchir des variations en solvant organique dans le plasma.

A. ANALYSE BIDIMENSIONNELLE HORS-LIGNE POUR LES COUPES LOURDES DU PETROLE, PAR SECxRPLC-ICP-MS/MS

Dans la section suivante le potentiel de la chromatographie liquide bidimensionnelle (SEC combinée à la RPLC) couplée à l'ICP-MS/MS est évalué pour la caractérisation d'échantillons pétroliers d'une grande complexité. Ces travaux sont consacrés à la sélection des conditions de première et seconde dimension pour les deux modes d'intérêts : en-ligne et hors-ligne. Une fois l'optimisation effectuée, la méthode SECxRPLC-ICP-MS/MS est appliquée à des fractions SARA du pétrole. Les résultats sont présentés sous forme d'article scientifique dans la suite de cette section.

Article 3

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication soumise dans *Journal of Chromatography A (JCA)* :

"Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the characterization of sulfur, vanadium and nickel compounds in petroleum products"

M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, J. Chromatogr. A. (2019)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the characterization of sulfur, vanadium and nickel compounds in petroleum products

Marie Bernardin^{a,b}, Agnès Le Masle^b, Frédérique Bessueille-Barbier^a, Charles-Philippe Lienemann^b, Sabine Heinisch^{a,*}

^a Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

^b IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2019

Revised 30 September 2019

Accepted 6 October 2019

Available online xxx

Keywords:

SECxRPLC

Peak capacity

Heavy oils

Organic matrices

Speciation

ICP-MS/MS

ABSTRACT

The petroleum industry is increasingly concerned with the conversion of vacuum residues as a consequence of decreased conventional crude oil availability. The compositional analysis of heavy oil products has become a key step in conversion processes, but the complexity of these oil matrices tends to increase with their boiling point. In this study, comprehensive two-dimensional liquid chromatography (LCxLC) coupled to inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS/MS) is considered with a view to meet new requirements and to bring additional information regarding the species present in these matrices. In search for a high degree of orthogonality, two separation techniques involving two different retention mechanisms were evaluated: Size Exclusion Chromatography (SEC) and Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC). In SEC, the analytes are separated according to their molecular weight while according to their hydrophobicity in RPLC. The separation power of both individual separation techniques was first evaluated. Off-line and on-line LCxLC were compared on the basis of an optimization approach. It is shown that off-line SECxRPLC can provide, for the same analysis time of 150 min, a higher peak capacity (2600 vs 1700) than on-line RPLCxSEC while a similar dilution factor (close to 30) but also requires far fewer fractions to be analyzed (12 vs 400). Asphaltenes which constitute the heaviest fraction of crude oils (obtained from petroleum industry) were analyzed by the developed off-line SECxRPLC method. The resulting 2D-contour plots show that co-elutions could be removed leading, for the first time, to new information on high molecular weight species containing sulfur and vanadium.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As the production of conventional middle and light oils has been declining over the last decades, heavy crude oils are increasingly used in the petroleum industry to replace them [1]. Crude oil is a complex mixture containing heteroatoms such as sulfur, and heavy metals like nickel and vanadium [2]. Vanadium and nickel are known to be present in petroleum up to few hundred parts per million [3,4]. To improve demetallation and hydrodesulfurization processes, a better understanding of metal speciation is necessary, which has led to a growing interest in hyphenated techniques, which can combine the high separation power of ultra-high

performance liquid chromatography (UHPLC) to a specific detection such as inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS/MS). Up to now, the structural identification of the chemical species present in the matrix is far from being comprehensive. Porphyrins, chelated with nickel and vanadyl, are widely described in the literature [5–9]. However, other compounds which represent up to 80% of the metal complex, are much more abundant than metalloporphyrins while poorly described yet [3,6]. They could be found as porphyrins trapped in nanoaggregates [10,11]. Recently, several reviews have dealt with metal speciation in crude oils and heavy petroleum fractions [2,3,12]. One of the main reported analytical approaches is size exclusion chromatography coupled to ICP-HRMS (SEC-ICP-HRMS) [13–18]. The compounds being separated according to their hydrodynamic volumes, the catalyst pore size can be adapted according to the size of metal complexes, which can be useful for hydrodemetallation and hydrodesulfurization pro-

* Corresponding author.

E-mail address: sabine.heinisch@univ-lyon1.fr (S. Heinisch).

cesses [3]. The resulting elution profiles usually consist in up to three large unresolved peaks [19,20]. Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC) separation was also reported for the analysis of metalloporphyrins [21], and asphaltene fractions [22]. From all reported studies, it is clear that one-dimensional chromatography fails to provide enough separation power for a complete characterization of such very complex matrices. A few approaches were developed using two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) for the analysis of vanadium and nickel. They always combined size exclusion chromatography and Normal Phase Liquid Chromatography (NPLC) to get relevant information on both molecular weight and chemical specie polarity. Three [23] or four fractions [24] were collected from the SEC dimension and further sent to the second NPLC dimension. Although this analytical approach did not allow the complete speciation of crude oils, it could point out three metal-groups of different polarities.

On-line RPLCxSEC was recently applied to the separation of polymers [25]. In the present study, we explored the feasibility and the potential of combining RPLC and SEC in a comprehensive approach for the analysis of petroleum matrices. The objective was also to hyphenate 2D-LC to ICP-MS/MS for a specific characterization of such complex matrices. With organic matrices, the presence of organic solvents requires the addition of oxygen into the plasma to avoid carbon deposit onto the cone surface and plasma instabilities. In addition to this, a more critical issue with RP gradients in the second dimension stems from the continuous change in solvent composition, resulting in signal fluctuations during the run. Although different approaches were proposed, such issue is still partly solved [26–32]. For instance, some authors suggested the use of a post column counter gradient prior to ICP-MS detection [31], or isotope dilution [32]. A 2D-configuration with RPLC (gradient conditions) in the first dimension and SEC (isocratic conditions) in the second one is expected to be more attractive with respect to both separation power and peak intensities considering that, under isocratic conditions, (i) plasma instabilities are less significant and (ii) optimized plasma parameters are easier to find. A theoretical study was therefore carried out to select the best comprehensive 2D-configuration (SECxRPLC or RPLCxSEC). We made use of a calculation approach previously developed for optimizing physical parameters in LCxLC with a view to maximizing the peak capacity while minimizing the dilution within a given analysis time [33,34]. This approach also allowed us to choose between on-line and off-line mode for the LCxLC separation. Whereas the off-line mode is more time-consuming, less suitable for automation, and more prone to sample loss and carry over [35], it should offer some advantages for our purpose: (i) a simple conventional HPLC systems can be used, (ii) after collection, the injection of the fractions into the second dimension can be delayed making a fraction treatment possible, (iii) the same instrument can be used in both dimensions and above all (iv) the analysis time in the second dimension is not limited [36].

The first part of this work was devoted to the selection of appropriate conditions for the first and the second dimensions, both in off-line and on-line mode. As a result of this optimization procedure, off-line SECxRPLC coupled to ICP-MS/MS was applied to the analysis of the sub-fractions of heavy crude oils. The obtained results could provide new information on high molecular weight species containing sulfur and vanadium.

2. Experimental section

2.1. Chemicals and reagent

Tetrahydrofuran (LC-MS grade), acetonitrile (LC-MS grade), 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21H,23H-porphine vanadium(IV) oxide standard were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Ger-

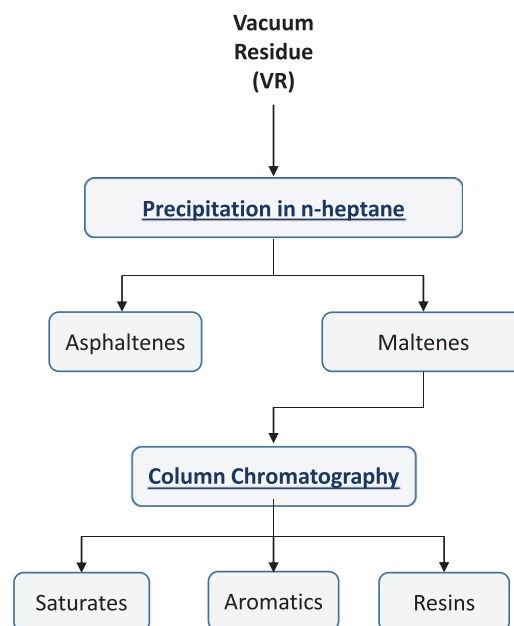


Fig. 1. Scheme of the SARA fractionation of a vacuum residue (VR).

many). Ethyl acetate was purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). 1-Methyl-2-pyrrolidinone were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Water was obtained from Elga water purification system (Veolia water STI, Le Pless Robinson, France). SPEX CertiPrep (Metuchen, NJ, USA) Co, Ce, Y, Tl, Li monoelemental standards in 2% HNO₃ (1000 µg/L) were used daily for the ICP-MS/MS system calibration. A multi-element solution containing Co, Ce, Y, Tl, Li at 10 ppb in acetonitrile was used to monitor the instrument. 8 polystyrene standards were used in 2 different solutions. Solution A contains PS of 28000, 9130, 682 and 266 Da, solution B contains PS of 44,000, 15,700, 3470, and 1250 Da in THF. Polystyrene standards were supplied by Fluka Analytical, Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Sample preparation

Analyzed samples came from Vacuum Residues (VRs) obtained after atmospheric distillation and vacuum distillation in the refining process of crude oil. To simplify the matrix, VRs have been fractionated according to a two-step SARA method [3], as shown in Fig. 1. Asphaltenes were first precipitated with a non-polar solvent (n-heptane). The fractionation of the maltenes was then performed by column chromatography resulting in SARA fractions (Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes). Those were supplied by IFPEN. SARA fractions were then diluted 60-times v/v in THF before being analyzed. An atmospheric residue (AR Venezuela), supplied by IFPEN and diluted 60 times, was also used for the evaluation of the performance of SEC-ICP-MS.

2.3. Instrumentation

2.3.1. LC system

The instrument was an Infinity 1290 LC from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). It includes a high-pressure binary solvent manager with a maximum flow-rate of 5 mL/min, an auto-sampler with a flow-through needle device equipped with a 20 µL sample loop, a column oven with a maximum temperature of 100°C. The measured dwell volume was 300 µL. The instrument control was performed by Mass Hunter. A UV detector equipped with a 2 µL flow-cell was used for the experiment described in Section 3.1. The detector wavelength was set at 407 nm.

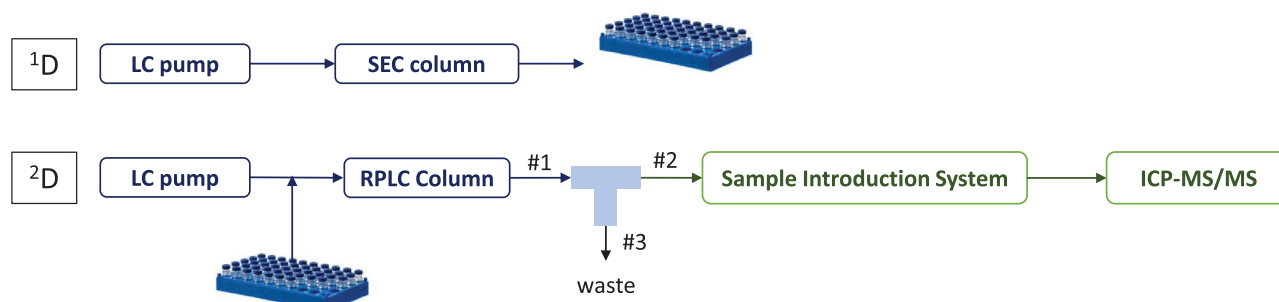


Fig. 2. Schematic representation of the instrument setup in off-line SECxRPLC-ICP-MS/MS (tubing dimensions are given in the experimental section).

The same LC instrument was used in the two dimensions. The outlet of the column was connected to a T-union P-727 (from Upchurch, Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) with zero dead volume Fig. 2. Only stainless steel tubing was used for THF compatibility. Tube #1 (50 cm x 125 μ m) was located between the column and the T-union, Tube #2 (20 cm x 125 μ m) between the T-union and the Sample Introduction System (SIS) prior to the ICP-MS/MS, Tube #3 (25 cm x 125 μ m) between the T-union and the waste. The split ratio was set to 1:1 to ensure proper conditions (400 μ L/min) for the nebulizer. SEC column calibration was performed with a diode array detector equipped with 0.6 μ L flow-cell, from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

2.3.2. ICP-MS/MS

The experiments were carried out using an Agilent 8800 ICP-MS/MS system from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) with a PFA-LC nebulizer from Elemental Scientific (Omaha, Nebraska USA), an IsoMist device from Courtage Analysis Service (Mont Saint Aignan, France), equipped with a Twinnabar spray chamber as Sample Introduction System (SIS), selected according to previous studies [37,38]. The spray chamber was thermostated at -2°C by Peltier effect. The system was equipped with a quartz torch with a 1 mm i.d. injector (Agilent Technologies). The following ICP-MS/MS parameters were selected: plasma power of 1500 W, auxiliary gas flow-rate of 0.9 L/min, plasma gas flow-rate of 15 L/min, sampling depth of 7 mm, carrier gas of 0.45 L/min. Viton® tubing (SCP Science, Villebon-sur-Yvette, France) were used for correct use of the peristaltic pump under organic solvent conditions. In order to ensure plasma stability and to avoid carbon deposit on the cone surface (sampler and skimmer), 0.5 L/min of a mixture of Oxygen and Argon (20% O_2 , 80% Ar) was sent through HMI tubing into ICP-MS/MS. Both sampling and skimmer cones were made of platinum, due to its inertness, instead of usual nickel. The amount of oxygen, depending on the mobile phase (type of organic solvent and flow-rate) was optimized by visually monitoring C_2 emission band. The analyzer unit of the instrument consisted of two quadrupole mass analyzers and an octopole collision-reaction cell located between them. Vanadium, sulfur, and nickel were detected in MS/MS mode with O_2 as reaction gas in the cell. Vanadium 51 was shifted to mass 67 ($^{67}\text{VO}^+$), Sulfur 32 to mass 48 ($^{48}\text{SO}^+$). Nickel was analyzed at $m/z = 58$ ($^{58}\text{Ni}^+$).

To maximize the instrument sensitivity, the flow-rate of O_2 reaction gas was optimized by monitoring $^{67}\text{VO}^+$ intensity of a porphyrin sample (1 ppm in ACN) while changing the mobile phase flow-rate within 0.1–0.8 mL/min (see supplementary information S1). The highest sensitivity was achieved at 0.3 mL/min O_2 .

The same approach was applied to the nickel and sulfur elements. O_2 reaction gas flow-rate was optimized by monitoring both $^{48}\text{SO}^+$ and $^{58}\text{Ni}^+$ intensities (100 ppb of mono-elemental standards of nickel and sulfur diluted in THF) (see supplementary information S1). The highest sensitivity was achieved at 0.2

and 0.25 mL/min O_2 respectively. The MS/MS mode was essential for sulfur analysis to avoid isobaric interference such as O_2^+ . As a result, the analysis of the three elements (sulfur, vanadium, and nickel) could be performed within one single run at 0.3 mL/min O_2 .

2.3.3. SEC-ICP-MS/MS setup

Two Waters APC columns were used: an Acquity APC XT 45 (150 $\times$ 4.6 mm, 1.7 μ m) with effective molecular weight ranging from 200 to 5000 g/mol and an Acquity APC XT 125 (150 $\times$ 4.6 mm, 2.5 μ m) with effective molecular weight ranging from 1000 to 30,000 g/mol. For both columns, the injection volume was 15 μ L. The column temperature was set to 30 $^{\circ}\text{C}$. THF was used as mobile phase. The mobile phase flow-rate was 0.8 mL/min. A flow-splitter (1:1) was used prior to the ICP-MS/MS detector.

2.3.4. RPLC-ICP-MS/MS

Several stationary phases were evaluated in RPLC. Those are listed in Table S1. The column temperature was set at 30 $^{\circ}\text{C}$. Acquity BEH C_{18} , Vydac C_{18} , Hypersil Betabasic were operated at a flow-rate of 0.8 mL/min. Zorbax SB-CN was operated at a flow-rate of 1 mL/min. 80/20 ACN/ H_2O (v/v) was used as mobile phase (A) and THF was used as mobile phase (B). A linear gradient was applied from 1% B to 99% B, keeping a normalized gradient slope of 5% (gradient slope $\times$ column dead time). The injection volumes are given in Table S1. Flow-splitting (1:1) was used prior to the ICP-MS/MS detector.

2.3.5. SECxRPLC-ICP-MS/MS setup

In off-line SECxRPLC, an ACQUITY APC XT 125 (150 $\times$ 4.6 mm, 2.5 μ m) column and an Acquity BEH C_{18} (50 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m) column were used in the first (^1D) and second (^2D) dimensions respectively. The injection volumes were 15 μ L and 5 μ L respectively. The column temperature was set at 30 $^{\circ}\text{C}$ in both dimensions. ^1D mobile phase was THF. ^2D mobile phase was ACN/ H_2O , 80/20, (v/v) (A), and THF (B) with the following gradient program: 0–10.2 min, 1% B to 99% B; 10.2–15.2 min, 99% B; 15.2–15.3 min, 99%–1 % B; 15.3–15.8 min, 1% B, leading to a normalized gradient slope of 1.2%. In both dimensions the flow-rate was 800 μ L/min with a flow-splitter of 1:1 prior to the ICP-MS/MS detection. Fractionation was manually performed every 10 s since no fraction collector was compatible with THF at the time of the present study. The filled vials were directly placed into the auto-sampler to be further analyzed in the second dimension. No fraction treatment was performed between both dimensions.

2.4. Calculations

The peak capacity, n , was first introduced by Giddings to provide a valuable tool capable of assessing the separation power. It

was defined as the number of peaks that can be ideally placed between the first peak and the last peak of interest with a resolution of 1.0 between all peaks [39]. In RPLC and in gradient elution, the peak capacity, n_{RPLC} , can be calculated according to [40]:

$$n_{RPLC} = 1 + \frac{\sqrt{N_{measured}}}{4} \cdot \frac{1}{2.3b+1} \cdot \ln \left(\frac{2.3b+1}{2.3b} \cdot e^{2.3S\Delta C_e} - \frac{1}{2.3b} \right) \quad (1)$$

where S is the average slope of the relationship between the logarithm of the retention factor and the solvent composition. It can be estimated from the molecular mass, according to an empirical relationship, ΔC_e is the range of compositions at elution covered by the sample, $N_{measured}$, the measured plate number which may differ from the column plate number due to extra-column dispersion [34] and b is the Linear Solvent Strength (LSS) gradient steepness [41], defined as:

$$b = \frac{S \cdot \Delta C \cdot t_0}{t_G} \quad (2)$$

with ΔC the gradient composition range, t_G the gradient time and t_0 the column dead time.

In size-exclusion chromatography (SEC), solutes are ideally eluted according to their decreasing size. When considering that the peak width is approximately constant, and that the components are spread over the entire elution space, the peak capacity may be expressed as Eq. (3) [42]:

$$n_{SEC} = 1 + \left(\frac{V_0 - V_e}{V_0} \right) \frac{\sqrt{N_{measured}}}{4} \quad (3)$$

where V_0 is the total permeation volume (column dead volume) and, V_e , is the total exclusion volume. The peak capacity can also be related to the total porosity, ε_t , and the external porosity, ε_e :

$$n_{SEC} = 1 + \left(\frac{\varepsilon_t - \varepsilon_e}{\varepsilon_t} \right) \frac{\sqrt{N_{measured}}}{4} \quad (4)$$

The sample peak capacity in LCxLC is theoretically the product of sample peak capacities in each dimension:

$$n_{2D} = {}^1n \times {}^2n \quad (5)$$

where 1n and 2n are the peak capacities in first and second dimension respectively. The superscript "1" and "2" refers to the first and second dimension respectively.

In LCxLC, the expected effective peak capacity is affected by three correction factors:

$$n_{2D, effective} = \alpha(1 - \gamma) {}^1n + \alpha \cdot \beta \cdot \gamma \cdot {}^1n \cdot {}^2n \quad (6)$$

with α correcting the peak capacity in 1D due to undersampling, β correcting the peak capacity in 2D due to non-ideal transfer of the sample fraction from 1D to 2D [43], and γ taking into account the retention surface coverage which depends on the degree of orthogonality between both dimensions [44]. In off-line mode, α and β can attain values very close to 1. This is made possible by increasing the number of fractions per peak in order to reduce both under sampling (increasing α) and injection issues (increasing β). The fractions can be stored and analyzed in 2D at a later time after a possible treatment (i.e. solvent evaporation and dilution in a weaker solvent).

The conditions for LCxLC analysis were optimized using a home-made procedure developed with Microsoft Excel. The calculations were based on a Pareto-optimal approach with the aim to optimize, for a given analysis time, two conflicting criteria, minimizing the dilution factor while maximizing the peak capacity [33].

The dilution factor, D_f , in dimension "i" was calculated according to the following equation:

$$D_f = \frac{\sqrt{2\pi}}{\beta} \times \frac{{}^i\sigma_{v, col}}{{}^iV_{inj}} \quad (7)$$

where ${}^iV_{inj}$ is the injection volume, ${}^i\sigma_{v, col}$ is the peak standard deviation in volume units and can be expressed as:

$$\sigma_{v, col} = \frac{V_0 (2.3b+1)}{2.3b\sqrt{N_{col}}} \quad (8)$$

N_{col} was evaluated from the coefficient of the Knox equation:

$$N_{col} = \frac{L_c}{d_p} \times \frac{1}{h(u)} \quad (9)$$

$$\text{With } h(u) = au^{0.33} + b \frac{D_m}{ud_p} + c \frac{ud_p}{D_m} \quad (10)$$

with L_c the column length, u the linear velocity, d_p the particle size, D_m the diffusion coefficient, and a , b and c , the Knox's coefficients. The average diffusion coefficient value was evaluated at $1.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ in water at 25°C , considering an average molecular mass of 4000 Da [45].

3. Results and discussion

3.1. Development of one-dimensional separations

For this study, Acquity APC columns were preferred to Gel Permeation Chromatography (GPC) columns that are most often used. These latter columns are based on polymer material, while APC columns are based on silica and possess smaller dimensions. As a result, for the same flow-rate, the analysis with Acquity APC columns is faster while the solvent consumption is reduced.

The compounds present in heavy oil matrices are within a very wide range of molecular weights. We therefore tested two different pore sizes (45 Å and 125 Å, corresponding to the APC XT 45 and APC XT 125 columns, respectively). The elution profiles obtained with these two different columns and for the three elements of interest (sulfur, vanadium, and nickel) are represented in Fig. 3. With the APC XT 45 column (Fig. 3a), designed for effective molecular weights ranging from 500 to 5000 g/mol, all compounds were eluted between 1.2 min (exclusion volume of 960 µL) and 1.86 min (permeation volume of 1490 µL). With the APC XT 125 column (Fig. 3b), designed for effective molecular weights ranging from 1000 to 30000 g/mol, the compounds were better distributed over the entire separation window, between 1.2 min (960 µL) and 2.3 min (1840 µL). Very small molecules, as the suspected metalloporphyrins, were better separated on the APC XT 45 column. However, the APC XT 125 column was selected for the rest of our study for two main reasons: (i) the elution space on the APC XT 125 column was much larger (880 µL vs 530 µL) and (ii) large compounds, which were less studied than metalloporphyrins in previous reported studies, were better separated. This column was calibrated with 8 polystyrenes (PS) standards (molecular weights ranging from 266 to 44000 Da) (Fig. 4). PS were detected by UV detection at 254 nm. The exclusion volume corresponding to the elution of the largest PS (44,000 Da) was found to be 960 µL ($\varepsilon_e = 0.38$) while the total permeation volume corresponding to the elution of the smallest PS (262 Da) was found to be 1840 µL ($\varepsilon_t = 0.74$). The corresponding fitting curve is represented in green in Fig. 4 ($Y = -3.7928x^3 + 14.958x^2 - 21.058x + 14.248$). Accordingly, it is interesting to observe by comparing Figs. 3 and 4 that the average mass can be estimated at about 4000 Da and that the petroleum sample occupies the entire elution space (from 960 to 1840 µL). As a result, considering Eq. 3 (with $h = 3$), the maximum peak capacity value can be estimated at 18.

RPLC was selected as an alternative dimension because the retention mechanism is quite different from that in SEC. Their combination is therefore expected to provide a high degree of orthogonality. In RPLC, the molecules are separated according to

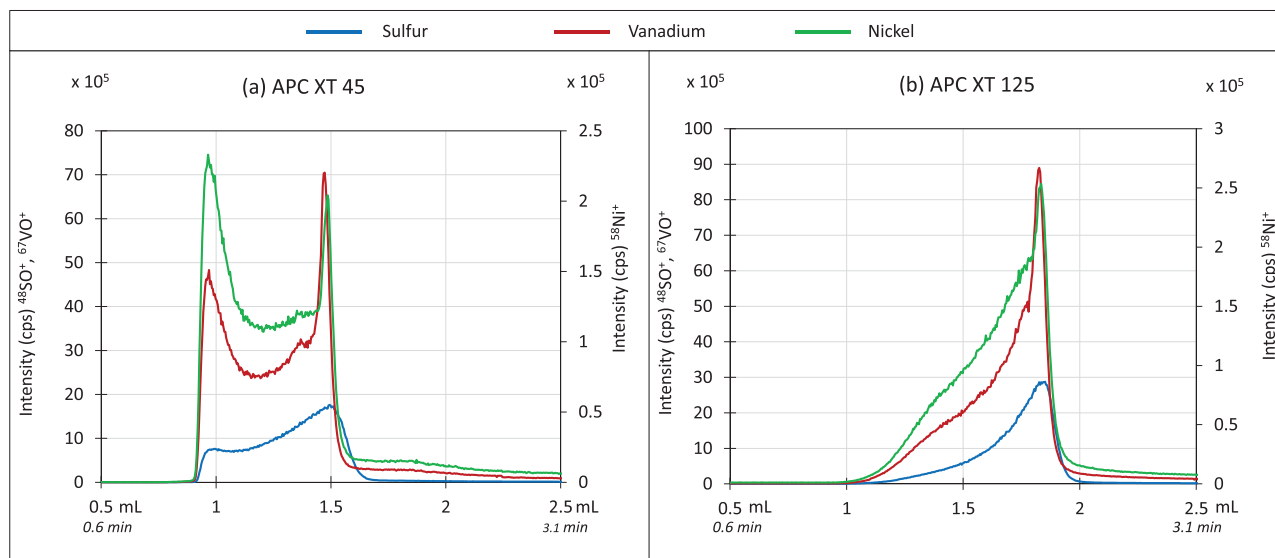


Fig. 3. Overlaid separations of an atmospheric residue (AR Venezuela) in SEC-ICP-MS/MS with specific detection of sulfur, vanadium and nickel. Conditions: (a) APC XT 45 column (150 × 4.6 mm, 1.7 μm) and (b) APC XT 125 column (150 × 4.6 mm, 2.5 μm). Other conditions given in the experimental section.

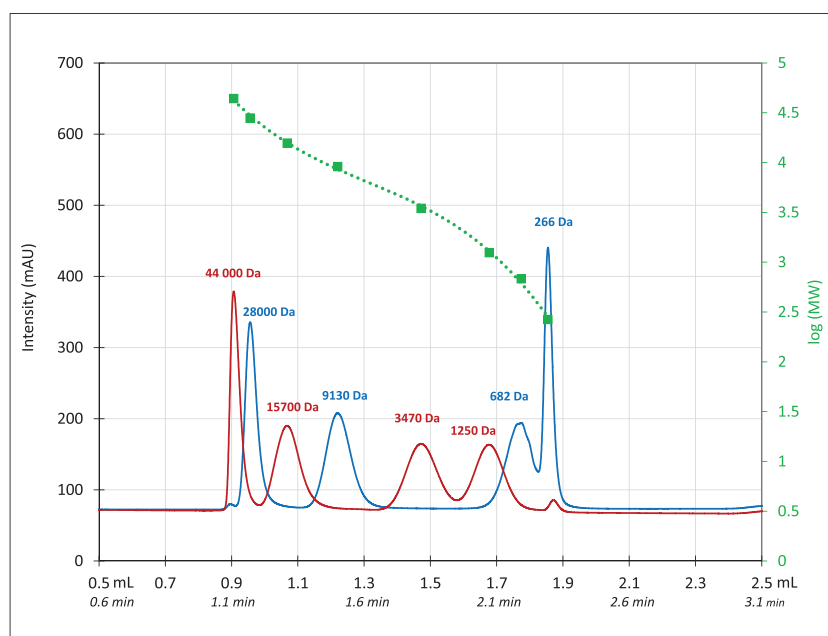


Fig. 4. Separation of 8 polystyrene standards (contained in 2 different solutions) in SEC-UV (254 nm). The green dotted curve represents the SEC calibration curve. Conditions: APC XT 125 column (150 × 4.6 mm, 2.5 μm). 5 μL injected. Other conditions given in the experimental section.

their hydrophobicity which was promising to achieve a high degree of orthogonality between both dimensions. Different stationary phases were tested by injecting the asphaltene fraction diluted in THF. The stationary phases differed by the length of the grafted chain (i.e. C₁₈ or C₈), by the type of the grafted chain (i.e. cyanopropyl or alkyl), by the pore size (i.e. 80–300 Å) and by the type of C₁₈ (i.e. hybrid silica as the Acquity BEH C18 column or polymeric grafting as the Vydac column). The different column characteristics are reported in Table S1. For Vydac C18, Zorbax SB-CN and Hypersil Betabasic columns, a generic gradient, from 1% to 99% B was applied with a normalized gradient slope of 5% (gradient slope × column dead time). For the Acquity BEH C18 column, the same gradient range was used but with a normalized gradient slope of 1%. Solvent A was 80/20 ACN/H₂O (v/v) and Solvent B, pure THF. The separations with specific detections for the

three elements as well as with UV detection are shown in Figs. S2a, S2b, S2c and S2d for the four columns respectively. As can be seen, the separations are almost similar whatever the column. However, both Zorbax SB-CN and Acquity BEH C18 exhibit a bimodal separation for sulfur and vanadium. Another bimodal separation is present for nickel with Acquity BEH C18. As a result, considering besides the small available column dimensions (particle size and column length, suitable for a second dimension) Acquity BEH C18 was selected for the rest of this study. Different organic solvents, including N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP), ethyl acetate, tetrahydrofuran (THF) and acetonitrile (ACN) were tested as solvent B (100% B). Strong solvents can lead to a total dissolution of petroleum samples and are more prone to a high recovery rate from the column. The objective was therefore to achieve a maximum recovery rate with 100% B. Ethyl acetate was not suitable

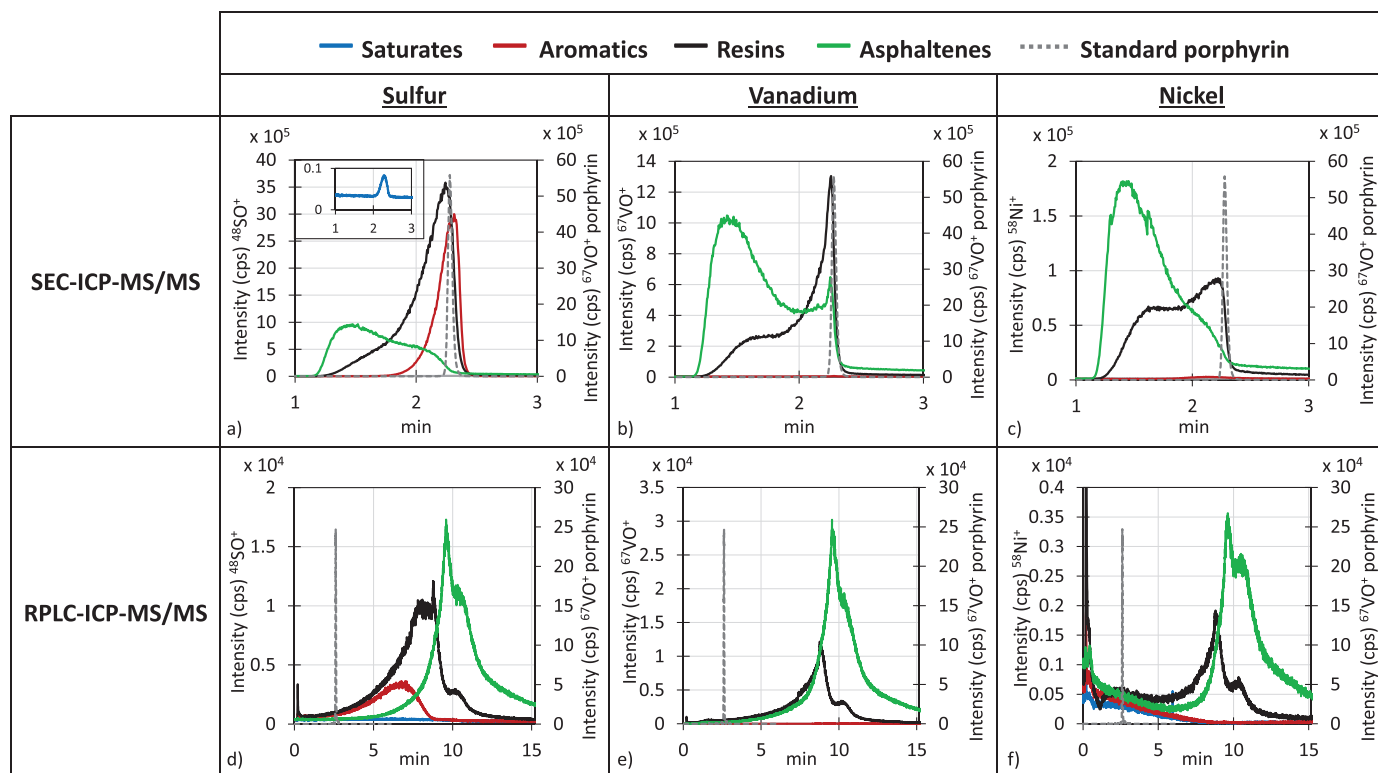


Fig. 5. Overlaid separations of SARA fractions in (a, b, c) SEC-ICP-MS/MS and in (d, e, f) RPLC-ICP-MS/MS with specific detection of (a, d) Sulfur, (b, e) Vanadium and (c, f) Nickel. SEC conditions: APC XT 125 (150 × 4.6 mm, 2.5 μm) column; Mobile phase: THF, 0.8 mL/min; 30 °C; 15 μL injected. RPLC conditions: Acquity BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7 μm) column; A: 80/20 ACN/H₂O; B: THF; 1% B to 99 % B in 15.2 min; 0.8 mL/min; 30 °C; 5 μL injected. Flow splitter prior to ICP-MS/MS (1:1). Peak of 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21H,23H-porphyrin in grey dotted line.

for the coupling of UHPLC with ICP-MS/MS due to its chemical incompatibility with the tubing used for the peristaltic pump. NMP was suitable in term of recovery but its high viscosity at, temperatures below 80 °C [46], prevents from working at high flow-rates. ACN was too weak to elute the entire sample from the column. THF was finally found to be the most relevant for dissolving the petroleum matrix as well as for being used as solvent B. A mixture of ACN and water (80/20 ACN/H₂O) was selected as Solvent A in good agreement with a preceding study [22].

The performance of both SEC-ICP-MS/MS and RPLC-ICP-MS/MS analysis was evaluated by measuring the recovery of sulfur, vanadium, and nickel with and without column (five consecutive injections). The recovery rates for sulfur, vanadium and nickel were 104%, 77%, 70% respectively in SEC while 99%, 70%, 67% in RPLC. The relative standard deviations were close to 5% in all cases. In SEC, the low recovery rate obtained for vanadium and nickel suggests that a significant part of the related compounds was retained on the APC XT 125 column, much likely due to adsorption mechanism on the silica surface. Similar observations for vanadium and nickel were reported by Caumette *et al.* using GPC columns on petroleum sample [23]. In contrast, sulfur compounds exhibit a very good recovery rate (close to 100%). That means that the interactions between the stationary phase and the sulfur compounds are not strong enough to result in irreversible adsorption. The recovery rates were similar in RPLC-ICP-MS/MS, supporting the idea of partial adsorption of vanadium and nickel compounds on the active silica sites while no strong adsorption exists with sulfur compounds.

Fig. 5 shows the separations of SARA fractions in SEC-ICP-MS/MS for sulfur (Fig. 5a), vanadium (Fig. 5b), and nickel (Fig. 5c) and in RPLC-ICP-MS/MS for sulfur (Fig. 5d), vanadium (Fig. 5e), and nickel (Fig. 5f). In both SEC and RPLC, the three elements were de-

tected in the resin fraction (black chromatogram) and in the asphaltene fraction (green chromatogram). In the aromatic fraction (red chromatogram), only sulfur was detected. In the saturate fraction (blue chromatogram) a very small peak was found in SEC which was not detected in RPLC. It is important to note that the detection of nickel was difficult, especially in RPLC where the mobile phase was composed of THF but also of ACN and water.

In SEC, the elution profile is quite different between resin and asphaltene fractions. Asphaltenes are mostly constituted of heavy compounds or aggregates, which leads to an intense peak between 1.1 and 1.8 min. In contrast, the presence of lighter components in resins explains the intense peak at 2.3 min, close to the permeation volume, especially for vanadium (Fig. 5b). A similar retention time was found for a porphyrin standard, analyzed in the same conditions, as can be observed by the overlaid dotted chromatogram in Fig. 5a-c. The peak at 2.3 min was therefore suspected to correspond to porphyrin compounds. By comparing Fig. 5b and c, it seems that vanadium porphyrins could be more abundant than nickel porphyrins, especially in resin fractions. This assumption should be confirmed in the future with quantitative analysis. Finally, as told before, column adsorption is clearly highlighted in case of asphaltenes both for vanadium and nickel which is supported by the absence of baseline return after the total permeation volume (2.3 min). Unlike other elements, sulfur is also present in aromatics with a different elution profile from those of resins and even more asphaltenes (Fig. 5a), suggesting that heavy sulfur components are no more present in aromatics fraction. Asphaltenes seem to be more enriched in vanadium and nickel than resins, which is in good agreement with reported studies [14].

As in SEC, the RPLC elution profile consists in a continuum without any isolated peak, whatever the SARA fraction. Nevertheless, a large majority of compounds is eluted with a large amount

of THF, indicating that sulfur, vanadium and nickel structures are constituted of highly hydrophobic compounds, except in the aromatic fraction (red chromatogram, Fig. 5d), where all compounds are eluted before 9 min. This is not surprising considering their smaller structures compared to those of the resin or asphaltene fractions. A vanadium porphyrin standard was injected separately in the same RPLC conditions (dotted chromatograms in Fig. 5). Its retention time was found to be 2.6 min suggesting that porphyrin compounds were slightly retained in RPLC in these conditions. A poorly intense peak can be observed for vanadium (Fig. 5e) in this retention range which could be therefore attributed to porphyrin structures. The poor intensity is mainly due to low ICP-MS/MS sensitivity in this medium (optimization performed in pure THF). It should be noticed that the elution profiles of the three considered elements are shifted towards lower retention times from asphaltenes (green chromatogram) that are more hydrophobic to aromatics (red chromatogram) that are more polar.

The use of SEC or RPLC alone cannot lead to the separation of one component from all the others due to the complexity of the matrix, constituted of hundreds of thousands compounds. As was observed in both techniques, the elution profile corresponds to a continuum regardless of the element. Yet, from the above results, the combination of RPLC and SEC was promising. The potential of SECxRPLC-ICP-MS/MS for the characterization of VRs samples and their fractions is discussed in the two following sections.

3.2. Development of two-dimensional separations

In this section, the potential of combining RPLC and SEC with a view to selecting the best configuration (SECxRPLC or RPLCxSEC) is theoretically evaluated using a predictive approach that takes into account the above results. The same separation process is assumed when the column order is changed. That might not be strictly the case since aggregates separated in SEC can be broken in RPLC thereby leading to two different 2D-separations. However, when dealing with LC x LC, the order of the columns is not of major importance with respect to the aggregates which are expected to be broken anyway. What is important is the final 2D-map which can be compared to other ones provided that 2D-conditions are kept identical. Three important performance criteria were considered including (i) the effective peak capacity, (ii) the dilution factor and (iii) the analysis time. Both the off-line and the on-line modes were considered for that purpose. In our quest for optimized 2D-conditions, we had to keep in mind both the instrument constraints and the available columns geometries. Those are listed below:

- (1) In SEC, the available APC XT 125 column lengths were 3 cm, 7.5 cm, and 15 cm, always with an internal diameter of 4.6 mm. The maximum recommended flow-rate was 1600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Due to partial adsorption, as previously discussed, the total analysis time had to be at least 40% higher than the total permeation time for baseline return.
- (2) In RPLC, BEH C_{18} columns are available in various lengths, various internal diameters, and various particle sizes. In this optimization study, we considered 3 different lengths (3 cm, 5 cm and 15 cm), 2 different internal diameters (2.1 mm and 4.6 mm) and 2 different particle sizes (1.7 μm and 5 μm).
- (3) In order to avoid peak distortion, the maximum injected volume was found to be 1.5% V_0 in SEC and 5% V_0 in RPLC (V_0 being the column dead volume).
- (4) Off-line fractionation was handmade due to non-compatibility of collector with THF. For the sake of convenience, the sampling time was therefore fixed to 10 s or higher.
- (5) The split ratio between the first and the second dimension was not considered below 1/10 to avoid too much additional band

broadening due to low split ratios as previously highlighted [37].

Under such constraints, on-line SECxRPLC was of little interest due to only one available internal diameter for SEC columns (i.e. 4.6 mm) which made very low split ratios necessary prior to the second RPLC dimension operated with usual UHPLC columns (i.d. 2.1 mm). Indeed, it was shown that such low split ratios ($<1/5$ – $1/10$) can lead to a significant additional peak broadening [37], thereby substantially decreasing the effective peak capacity. Similarly, off-line RPLCxSEC was also not possible because in that case, a very large number of fractions should be collected which was beyond the capacity of the vial rack. Furthermore, the mobile phase was little compatible with the RPLC mobile phase composed partly of THF. Consequently, our choice was made between on-line RPLCxSEC and off-line SECxRPLC.

In off-line LCxLC the two dimensions are disconnected [35]. As a result, the peak capacity in each dimension is only limited by the maximum column length that can be used considering the maximum pressure delivered by the instrument and withstood by the column. Thus, in case of two fully orthogonal LC-systems, the peak capacity in off-line LCxLC can theoretically be quite impressive. However considering the resulting huge number of runs and hence the very long analysis time and the high associated dilution, a good trade-off has to be found between a high separation power, a reasonable analysis time and a good sensitivity. We therefore focused on the same total analysis time of about 150 min, no matter it was off-line SECxRPLC or on-line RPLCxSEC.

Our first choice was on-line RPLCxSEC. This configuration seemed to be very attractive because the second dimension is not performed in gradient elution but in pure THF. Optimized values for ICP-MS/MS parameters are fully dependent on the mobile phase composition. As a result, once they have been optimized for a given composition (e.g. 100% THF), they may be inappropriate for compounds eluting during the gradient run in a mixture composed of water and acetonitrile in addition to THF. Furthermore, we found that the signal intensity was higher with pure THF than with any mixture of ACN/water/THF. The same pareto-optimality approach as the one previously developed [33,34] was applied to search for optimized conditions in on-line RPLCxSEC, considering a gradient time of 150 min in the first dimension. This was achieved by varying ^1D column length (15; 5 and 3 cm), ^1D particle size (5 and 1.7 μm) ^1D column internal diameter (4.6 and 2.1 mm), ^1D flow-rate (from 10 to 500 $\mu\text{L}/\text{min}$), ^1D split ratio (from 1 down to 1/10), ^2D column length (15; 7.5 and 3 cm), ^2D column temperature (30 and 60 $^{\circ}\text{C}$), ^2D flow-rate (from 800 to 1600 $\mu\text{L}/\text{min}$) and the sampling rate (from 1 to 3 fractions per peak). The resulting pareto plots, considering a full occupation of the retention space ($\gamma = 1$) are shown in Fig. 6. On-line mode usually involves the use of short second dimension columns. In our case, only a very short SEC column (i.e. 3 cm) operated at the maximum allowed flow-rate (i.e. 1600 $\mu\text{L}/\text{min}$) and at the maximum allowed temperature (i.e. 60 $^{\circ}\text{C}$) provided enough time to carry out the separation. Among all the different sets of conditions represented by red triangles in Fig. 6, some of them, located on the pareto-optimal front (red dotted line), are of prime interest. Conditions and performance of optimized settings numbered #1 to #5, are detailed in Table 1. Setting #1 is expected to provide the highest effective peak capacity (1700), despite a high dilution factor (i.e. 25) whereas setting #5 should lead to the lowest peak capacity (1000) but with a more satisfactory dilution factor (i.e. 3). It is interesting to note that for the 5 sets of optimized conditions, only a column internal diameter of 2.1 mm seems to be appropriate in ^1D . Increasing ^1D column length has a negative impact on effective peak capacity while a positive one on dilution. As shown by the results listed in Table 1, the number of runs in the second

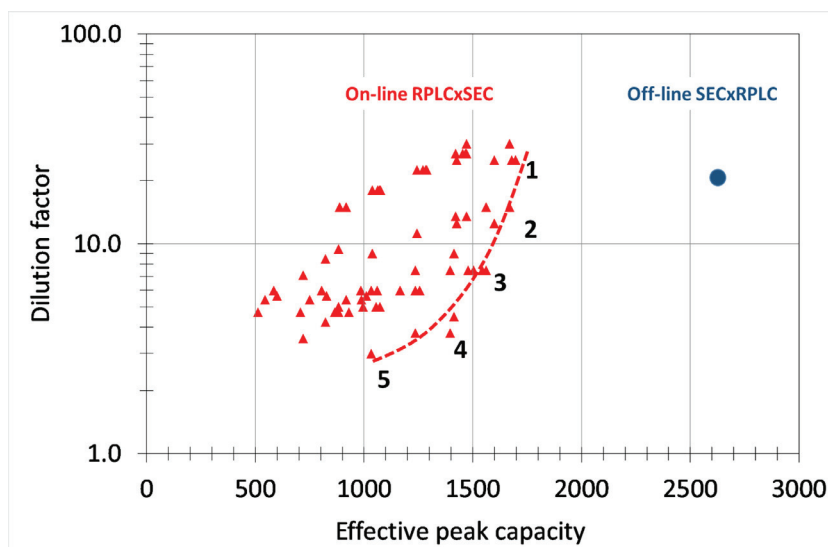


Fig. 6. Full pareto plots (red triangles) of dilution factor versus effective peak capacity for an analysis time of 150 min in on-line RPLCxSEC ($\gamma = 1$). The pareto-optimal front is represented in red dotted line. The conditions of setting #1 to #5 are listed in Table 1. The blue circle corresponds to the optimized set of conditions in off-line SECxRPLC (listed in Table 2). See text for more explanations.

Table 1

Different optimized sets of conditions in on-line RPLCxSEC, corresponding to the 5 numbered symbols in Fig. 6; ¹D: RPLC column; 30 °C; gradient elution in 150 min over a composition range of 98%; ²D: APC XT 125 (30 × 4.6 mm, 2.5 μm); 60 °C, 1600 μL/min. See text for more explanations

	Column geometry (¹ D)	Flow-rate (¹ D)	Split ratio	Sampling time	Run number	Effective peak capacity	Dilution factor
#1	30 × 2.1 mm; 1.7 μm	100 μL/min	1/10	21 s	440	1700	25
#2	30 × 2.1 mm; 1.7 μm	50 μL/min	1/5	20 s	455	1670	15
#3	150 × 2.1 mm; 5 μm	100 μL/min	1/10	21 s	440	1500	7.5
#4	150 × 2.1 mm; 1.7 μm	70 μL/min	1/5	23 s	413	1400	3.8
#5	150 × 2.1 mm; 1.7 μm	50 μL/min	1/5	32 s	300	1000	3.0

Table 2

Operating conditions in off-line SECxRPLC-ICP-MS/MS

	1st dimension (¹ D)	2nd dimension (² D)
Analysis time	3 min	12.5 min
Stationary phase	APC XT 125	ACQUITY BEH C ₁₈
Column geometry	150 × 4.6 mm, 2.5 μm	50 × 2.1 mm, 1.7 μm
Flow rate	0.8 mL/min	0.8 mL/min
Mobile phase	THF	A: 80/20 ACN/H ₂ O – B: THF
Gradient/Isocratic	Isocratic	Gradient 1–99%B in 10.2 min
Temperature	30 °C	30 °C
Injected volume	15 μL	5 μL
Sampling time	10 s (12 fractions between 1 and 3 min)	

dimension is quite impressive (300–450). Moreover, the split ratio is 1/5 or lower, which could result in a decrease in the effective peak capacity due to additional peak broadening. It should also be noted that an additional issue with SEC in the second dimension was raised by Reingruber et al. [47]. The injection solvent in SEC (i.e. the first dimension mobile phase), is composed of a mixture of ACN, water, and THF, and hence is prone to produce adsorption phenomena in SEC and hence significant peak tailing.

Our second choice was off-line SECxRPLC. The conditions were imposed by the constraints we had to deal with. The best set of conditions, considering the necessity of fractionating every 10 s, is represented by a blue circle in Fig. 6. The related conditions are listed in Table 2. 12 fractions were collected between 1 and 2 min. The gradient time in the second dimension was set at 10.2 min so

that the total analysis time was close to 150 min. Under such conditions, the calculated effective peak capacity is 2600, much higher than in on-line RPLC x SEC (<1700) whereas the dilution factor is quite similar to the one calculated for setting #1 (27 vs 25).

Considering the huge number of runs in on-line RPLCxSEC without any significant gain in effective peak capacity or in sensitivity compared to off-line SECxRPLC, on line RPLCxSEC was abandoned and off-line SECxRPLC was definitely selected to analyze complex samples coming from the petroleum industry.

3.3. Analysis of the SARA fractions by SECxRPLC-ICP-MS/MS

SARA fractions were analyzed by off-line SECxRPLC-ICP-MS/MS with conditions listed in Table 2. Fig. 7 shows the 2D-contour plots

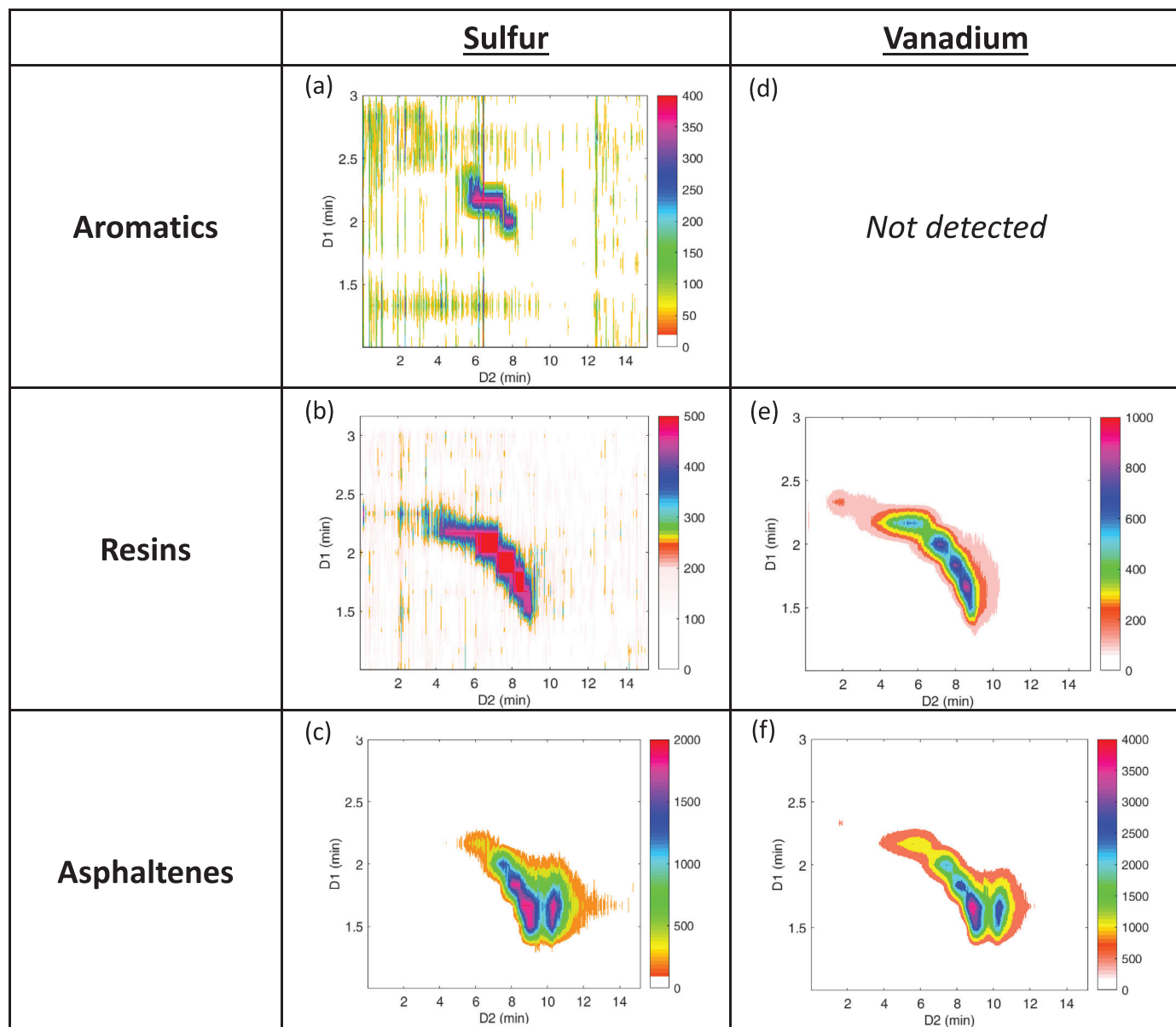


Fig. 7. SECxRPLC-ICP-MS/MS analysis of SARA fractions with specific detection, of (a, b, c) Sulfur and (d, e, f) Vanadium: (a, d) aromatic, (b, e) resin and (c, f) asphaltene fractions. See conditions in Table 2.

for the fractions of aromatics, resins and asphaltenes considering the sulfur and vanadium elements. As told before, this 2D-set-up associates hydrophobicity property to mass property. Large compounds, early eluted in SEC are strongly retained in RPLC, likely due to the presence of a large number of carbons. Unfortunately, too much dilution in LCxLC (as above discussed) prevented from detecting nickel, present at a very low level. For the same reason, vanadium could not be detected in the aromatic fraction. 2D-contour plots are significantly different depending on both the fraction and the element. For the asphaltene fraction, in case of both sulfur (Fig. 7c) and vanadium (Fig. 7f), whereas there is no baseline separation in SEC, a bimodal distribution with baseline separation appears in RPLC for the most retained compounds. This suggests that both sulfur and vanadium compounds are present in two different families differing by their hydrophobicity. Structural identification by NMR as well as LCxLC-MS analysis should be car-

ried out to get additional information on these compounds, which should be of great interest for the petroleum industry.

In order to underline the main differences between the SARA fractions, the contours of the 2D-contour plots are overlaid for sulfur (Fig. 8a) and for vanadium (Fig. 8b). As can be seen, each SARA fraction has its own contour, with a form different depending on the fraction. In case of sulfur as example (Fig. 8a), the form related to aromatics suggests the presence of lighter compounds compared to resins and asphaltenes. It can also be noted that the contour of resins is included into the one of asphaltenes both in case of sulfur and vanadium. The peak present at the top-left in Fig. 8e is noticeable. It is likely due to porphyrin structures, widely present in the asphaltene fraction. Such contours obtained by SECxRPLC-ICP-MS/MS could be very useful in the future to compare the fractionation performance of SARA process which may vary from one laboratory to another.

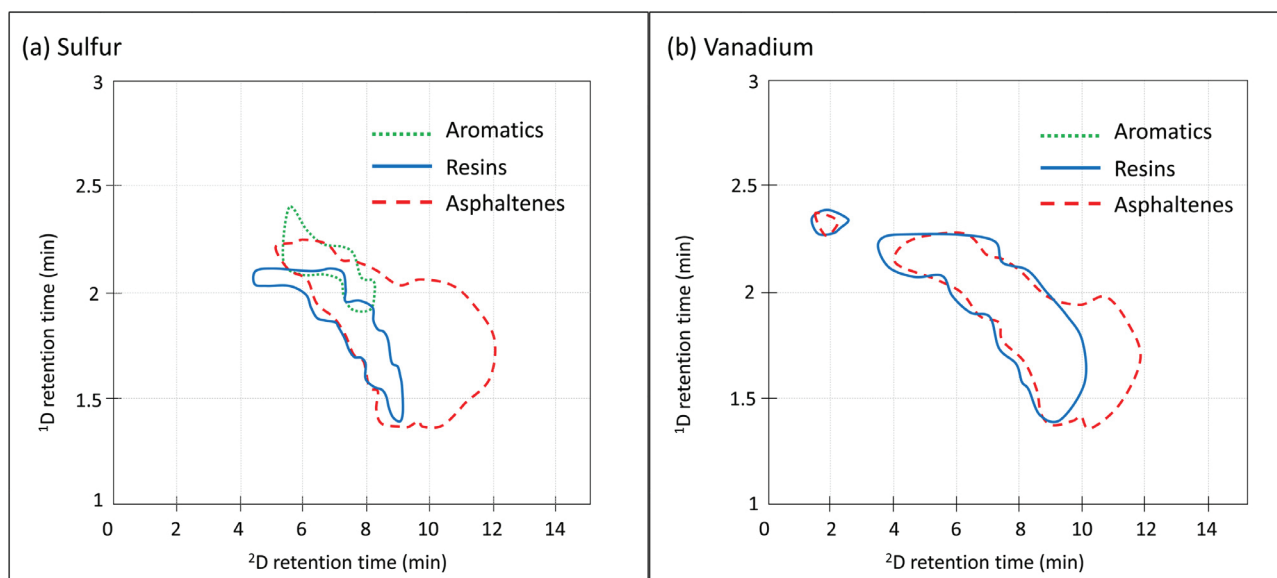


Fig. 8. Overlay of the SECxRPLC-contours of aromatic (green, dotted line), resins (blue, solid line) and asphaltene (red, dashed line) fractions with ICP-MS/MS specific detection of (a) Sulfur and (b) Vanadium. See conditions in Table 2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Conclusion

The objective of this work was to develop a two-dimensional separation method, coupled to elemental detection, for analyzing complex petroleum samples. A high separation power being mandatory for such complex samples, we first evaluated the potential of one-dimensional separation (SEC or RPLC), and then we pointed out that 2D-separations allowed to achieve much higher peak capacities but at the cost of higher dilution. An effective peak capacity of 2600 could indeed be achieved in less than 2.5 h. Both off-line and on-line LCxLC separations were compared using a pareto-optimality approach with the aim of maximizing the peak capacity while minimizing the dilution factor in a given analysis time. The best 2D-conditions in term of peak capacity were found in off-line SEC x RPLC, also considering the huge number of runs required in on-line RPLC x SEC.

To the best of our knowledge, such combination of SEC and RPLC, operated in a comprehensive off-line mode and hyphenated to ICP-MS/MS, is the most advanced tool, without any equivalent in the literature, for the speciation of vanadium, nickel and sulfur in petroleum samples.

SEC as first dimension allows the separation according to the molecular weight of the analytes within a range of 1000 to 30000 g/mol. RPLC as second dimension allows the separation of the molecules according to their hydrophobicity making this coupling very attractive. By coupling these two different retention mechanisms, the species contained in petroleum fractions could be distributed over the entire elution space. This 2D-method hyphenated to ICP-MS/MS could achieve the speciation of vanadium, sulfur and nickel within a single run.

The best 2D-conditions were applied to the characterization of SARA fractions. The metal distribution shows that larger compounds (short retention times in SEC) are more hydrophobic (high retention times in RPLC). Whereas heavy masses are not well separated in SEC alone, they are partly separated in RPLC making the combination of both techniques of great interest.

In the future, it could be possible to apply this analysis method to more complex samples, such as non-fractionated petroleum samples coming from refining units.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2019.460605.

References

- [1] R. Martínez-Palou, M.de L. Mosqueira, B. Zapata-Rendón, E. Mar-Juárez, C. Bernal-Huicochea, J. de la Cruz Clavel-López, J. Aburto, Transportation of heavy and extra-heavy crude oil by pipeline: a review, *J. Pet. Sci. Eng.* 75 (2011) 274–282, doi:10.1016/j.petrol.2010.11.020.
- [2] S. Gutiérrez Sama, C. Barrère-Mangote, B. Bouyssière, P. Giusti, R. Lobinski, Recent trends in element speciation analysis of crude oils and heavy petroleum fractions, *Trends Anal. Chem.* (2017), doi:10.1016/j.trac.2017.10.014.
- [3] G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdignac, B. Bouyssière, R. Lobinski, Element speciation analysis of petroleum and related materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 263–276, doi:10.1039/B817888G.
- [4] M.R. Yakubov, D.V. Milordov, S.G. Yakubova, D.N. Borisov, V.T. Ivanov, K.O. Sinyashin, Concentrations of vanadium and nickel and their ratio in heavy oil asphaltenes, *Pet. Chem.* 56 (2016) 16–20, doi:10.1134/S0965544116010072.
- [5] M.F. Ali, S. Abbas, A review of methods for the demetallization of residual fuel oils, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 573–584, doi:10.1016/j.fuproc.2006.03.001.
- [6] A.M. McKenna, J.M. Purcell, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Identification of vanadyl porphyrins in a heavy crude oil and raw asphaltene by atmospheric pressure photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) mass spectrometry, *Energy Fuels* 23 (2009) 2122–2128, doi:10.1021/ef800999e.
- [7] X. Zhao, C. Xu, Q. Shi, Porphyrins in heavy petroleum: a review, in: *Struct. Model. Complex Pet. Mix.*, Springer, Cham, 2015, pp. 39–70, doi:10.1007/430_2015_189.
- [8] F.G. Wandekoken, C.B. Duyck, T.C.O. Fonseca, T.D. Saint-Pierre, Method for the quantification of vanadyl porphyrins in fractions of crude oils by high performance liquid chromatography–flow injection–inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 119 (2016) 1–9, doi:10.1016/j.sab.2016.03.001.
- [9] J.S. Ramírez-Pradilla, C. Blanco-Tirado, M. Hubert-Roux, P. Giusti, C. Afonso, M.Y. Combariza, Comprehensive petroporphyrin identification in crude oils using highly selective electron transfer reactions in MALDI-FTICR-MS, *Energy Fuels* 33 (2019) 3899–3907, doi:10.1021/acs.energyfuels.8b04325.

- [10] S. Gutiérrez Sama, M. Farenc, C. Barrère-Mangote, R. Lobinski, C. Afonso, B. Bouyssière, P. Giusti, Molecular fingerprints and speciation of crude oils and heavy fractions revealed by molecular and elemental mass spectrometry: key-stone between petroleomics, metallopetroleomics, and petrointeractomics, *Energy Fuels* 32 (2018) 4593–4605, doi:10.1021/acs.energyfuels.7b03218.
- [11] A.G. Marshall, R.P. Rodgers, Petroleomics: chemistry of the underworld, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 18090–18095, doi:10.1073/pnas.0805069105.
- [12] T.A. Maryutina, A.R. Timerbaev, Metal speciation analysis of petroleum: myth or reality? *Anal. Chim. Acta* 991 (2017) 1–8, doi:10.1016/j.aca.2017.08.036.
- [13] S. Gutiérrez Sama, A. Desprez, G. Krier, C.-P. Lienemann, J. Barbier, R. Lobinski, C. Barrère Mangote, P. Giusti, B. Bouyssière, Study of the aggregation of metal complexes with asphaltenes using gel permeation chromatography inductively coupled plasma high-resolution mass spectrometry, *Energy Fuels* (2016) 30, doi:10.1021/acs.energyfuels.6b00559.
- [14] G. Gascon, V. Vargas, L. Feo, O. Luisa Castellano, J. Castillo, P. Giusti, S. Acevedo, C.-P. Lienemann, B. Bouyssière, Size distributions of sulfur, vanadium and nickel compounds in crude oils, residues and their SARA fractions determined by gel permeation chromatography inductively coupled plasma high-resolution mass spectrometry, *Energy Fuels* (2017) 31, doi:10.1021/acs.energyfuels.7b00527.
- [15] S. Acevedo, K. Guzmán, H. Labrador, H. Carrier, B. Bouyssière, R. Lobinski, Trapping of metallic porphyrins by asphaltene aggregates: a size exclusion microchromatography with high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometric detection study, (2012), doi:10.1021/ef3002857.
- [16] P. Pohl, J. Dural, N. Vorapalawut, I. Merdrignac, C.-P. Lienemann, H. Carrier, B. Grassl, B. Bouyssière, R. Lobinski, Multielement molecular size fractionation in crude oil and oil residue by size exclusion microchromatography with high resolution inductively coupled plasma mass spectrometric detection (HR ICP MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010), doi:10.1039/C0JA00076K.
- [17] A. Desprez, B. Bouyssière, C. Arnaudguilhem, G. Krier, L. Vernex-Loiset, P. Giusti, Study of the size distribution of sulfur, vanadium, and nickel compounds in four crude oils and their distillation cuts by gel permeation chromatography inductively coupled plasma high-resolution mass spectrometry, *Energy Fuels* 28 (2014) 3730–3737, doi:10.1021/ef500571f.
- [18] J.-I. Park, A. Al-Mutairi, A.M.J. Marafie, S.-H. Yoon, I. Mochida, X. Ma, The characterization of metal complexes in typical Kuwait atmospheric residues using both GPC coupled with ICP-MS and HT GC-AED, *J. Ind. Eng. Chem.* 34 (2016) 204–212, doi:10.1016/j.jiec.2015.11.011.
- [19] J.C. Putman, S. Gutiérrez Sama, C. Barrère-Mangote, R.P. Rodgers, R. Lobinski, A.G. Marshall, B. Bouyssière, P. Giusti, Analysis of petroleum products by gel permeation chromatography coupled online with inductively coupled plasma mass spectrometry and offline with fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Energy Fuels* 32 (2018) 12198–12204, doi:10.1021/acs.energyfuels.8b02788.
- [20] A. Vetere, M.W. Alachraf, S.K. Panda, J.T. Andersson, W. Schrader, Studying the fragmentation mechanism of selected components present in crude oil by collision-induced dissociation mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018) 2141–2151, doi:10.1002/rcm.8280.
- [21] E. Magi, C. Ianni, P. Rivaro, R. Frache, Determination of porphyrins and metalloporphyrins using liquid chromatography-diode array detection and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 141–149, doi:10.1016/S0021-9673(00)01007-4.
- [22] T. Loegel, N. Danielson, D.J. Borton, M. Hurt, H. Kenttämä, Separation of asphaltenes by reversed-phase liquid chromatography with fraction characterization, *Energy Fuels* 26 (2012) 2850–2857, doi:10.1021/ef201919x.
- [23] G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdrignac, B. Bouyssière, R. Lobinski, Fractionation and speciation of nickel and vanadium in crude oils by size exclusion chromatography-ICP MS and normal phase HPLC-ICP MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1123–1129, doi:10.1039/C003455J.
- [24] C.A. Islas-Flores, E. Buenrostro-Gonzalez, C. Lira-Galeana, Fractionation of petroleum resins by normal and reverse phase liquid chromatography, *Fuel* 85 (2006) 1842–1850, doi:10.1016/j.fuel.2006.02.007.
- [25] E. Uliyanchenko, P.J.C.H. Cools, S. van der Wal, P.J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional ultrahigh-pressure liquid chromatography for separations of polymers, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7802–7809, doi:10.1021/ac3011582.
- [26] B. Klencsár, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Development and validation of a novel quantification approach for gradient elution reversed phase high-performance liquid chromatography coupled to tandem ICP-mass spectrometry (RP-HPLC-ICP-MS/MS) and its application to diclofenac and its related compounds, *Anal. Chim. Acta* 974 (2017) 43–53, doi:10.1016/j.aca.2017.04.030.
- [27] B. Meermann, M. Kießhauer, Development of an oxygen-gradient system to overcome plasma instabilities during HPLC/ICP-MS measurements using gradient elution, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 2069–2075, doi:10.1039/C1JA10177C.
- [28] L. Rottmann, K.G. Heumann, Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 221–227, doi:10.1007/BF00322473.
- [29] B. Klencsár, S. Li, L. Balcaen, F. Vanhaecke, High-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma – mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) for quantitative metabolite profiling of non-metal drugs, *TrAC Trends Anal. Chem.* 104 (2018) 118–134, doi:10.1016/j.trac.2017.09.020.
- [30] C. Siethoff, I. Feldmann, N. Jakubowski, M. Linscheid, Quantitative determination of DNA adducts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 421–426, doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199904)34:4<421::AID-JMS790>3.0.CO;2-I.
- [31] A.S. Pereira, M. Schelfaut, F. Lynen, P. Sandra, Design and evaluation of a multi-detection system composed of ultraviolet, evaporative light scattering and inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the analysis of pharmaceuticals by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 78–84, doi:10.1016/j.chroma.2008.01.030.
- [32] G. Koellensperger, S. Hann, J. Nurmi, T. Prohaska, G. Stinger, Uncertainty of species unspecific quantification strategies in hyphenated ICP-MS analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1047–1055, doi:10.1039/B302565A.
- [33] M. Sarrut, A. D'Atoma, S. Heinisch, Optimization of conditions in on-line comprehensive two-dimensional reversed phase liquid chromatography. Experimental comparison with one-dimensional reversed phase liquid chromatography for the separation of peptides, *J. Chromatogr. A* 1421 (2015) 48–59, doi:10.1016/j.chroma.2015.08.052.
- [34] M. Sarrut, F. Rouvière, S. Heinisch, Theoretical and experimental comparison of one dimensional versus on-line comprehensive two dimensional liquid chromatography for optimized sub-hour separations of complex peptide samples, *J. Chromatogr. A* 1498 (2017) 183–195, doi:10.1016/j.chroma.2017.01.054.
- [35] K.M. Kalili, A. de Villiers, Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography × reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins, Part I: theoretical considerations, *J. Chromatogr. A* 1289 (2013) 58–68, doi:10.1016/j.chroma.2013.03.008.
- [36] M. Iguiniz, S. Heinisch, Two-dimensional liquid chromatography in pharmaceutical analysis. Instrumental aspects, trends and applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145 (2017) 482–503.
- [37] M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 1 Theoretical and experimental considerations on solute dispersion, *J. Chromatogr. A* 1565 (2018) 68–80, doi:10.1016/j.chroma.2018.06.024.
- [38] M. Bernardin, F. Bessueille-Barbier, A. Le Masle, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Suitable interface for coupling liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry for the analysis of organic matrices. 2 Comparison of Sample Introduction Systems, *J. Chromatogr. A* (2019), doi:10.1016/j.chroma.2019.04.074.
- [39] J.C. Giddings, Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods, *Anal. Chem.* 39 (1967) 1027–1028, doi:10.1021/ac60252a025.
- [40] U.D. Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 153–161, doi:10.1016/j.chroma.2005.03.008.
- [41] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems, *J. Chromatogr. A* 165 (1979) 3–30, doi:10.1016/S0021-9673(00)85726-X.
- [42] L. Hagel, Peak capacity of columns for size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A* 591 (1992) 47–54, doi:10.1016/0021-9673(92)80221-F.
- [43] F. Bedani, Theories to support method development in comprehensive two-dimensional liquid chromatography – a review Filippo Bedani1,2*, Peter J. Schoenmakers1 and Hans-Gerd Janssen1,3, (n.d.).
- [44] A. D'Atoma, C. Grivel, S. Heinisch, On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: orthogonality and practical peak capacity considerations, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 148–159, doi:10.1016/j.chroma.2012.09.028.
- [45] M.A. Stadalius, H.S. Gold, L.R. Snyder, Optimization model for the gradient elution separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography: verification of retention relationships, *J. Chromatogr. A* 296 (1984) 31–59, doi:10.1016/S0021-9673(01)96400-3.
- [46] C. Berrueto, S. Venditti, T.J. Morgan, P. Álvarez, M. Millan, A.A. Herod, R. Kandiyoti, Calibration of size-exclusion chromatography columns with 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP)/Chloroform mixtures as eluent: applications to petroleum-derived samples, *Energy Fuels* 22 (2008) 3265–3274, doi:10.1021/ef8003703.
- [47] E. Reingruber, J.J. Jansen, W. Buchberger, P. Schoenmakers, Transfer-volume effects in two-dimensional chromatography: adsorption-phenomena in second-dimension size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1147–1152, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.080.

Supplementary information

Marie Bernardin^{1,2}, Agnès Le Masle², Frédérique Bessueille-Barbier¹, Charles-Philippe Lienemann², Sabine Heinisch^{*1}

(1) Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, ENS Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

(2) IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize France

* Corresponding author: Tel: +33 437 423 551;

E-mail address: sabine.heinisch@univ-lyon1.fr (Sabine Heinisch)

Fig S1: Intensity as a function of the O₂ reaction gas flow-rate obtained for standard porphyrin V, standard Ni and S.

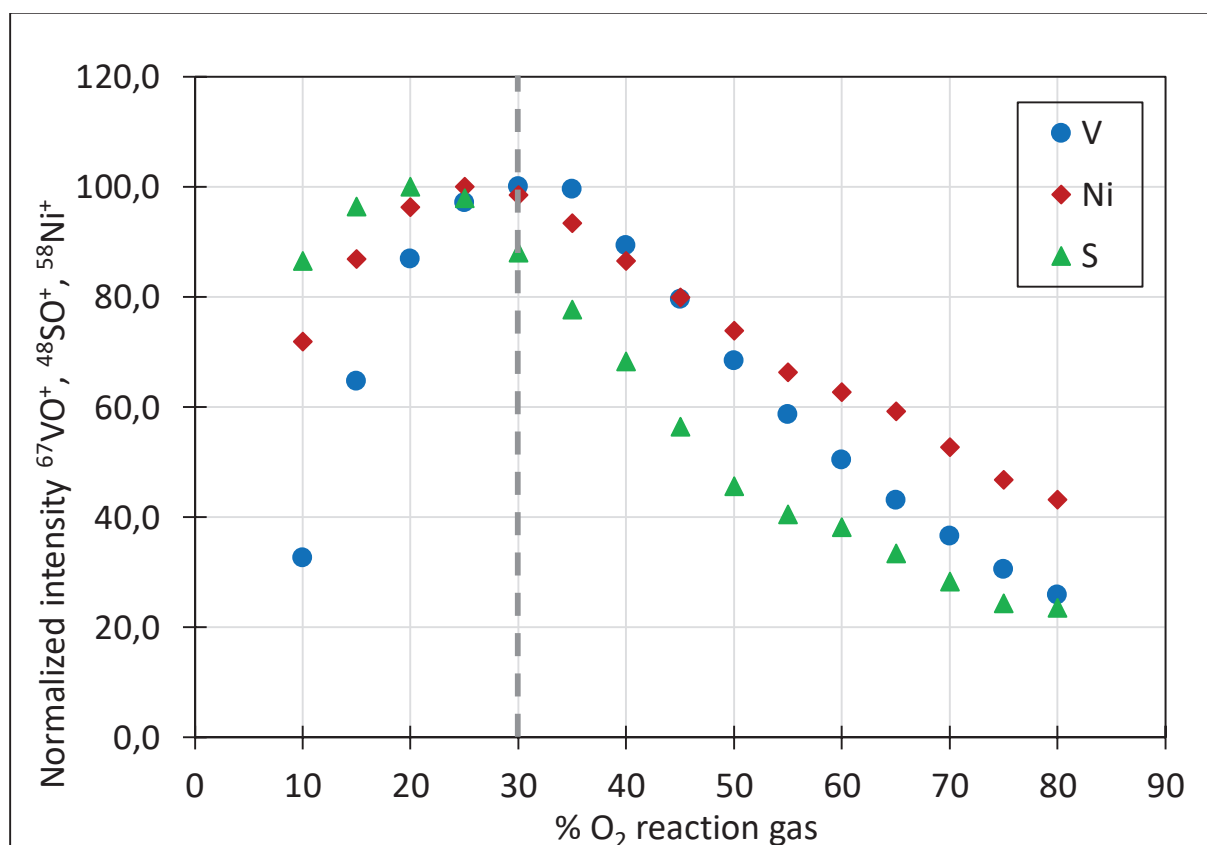
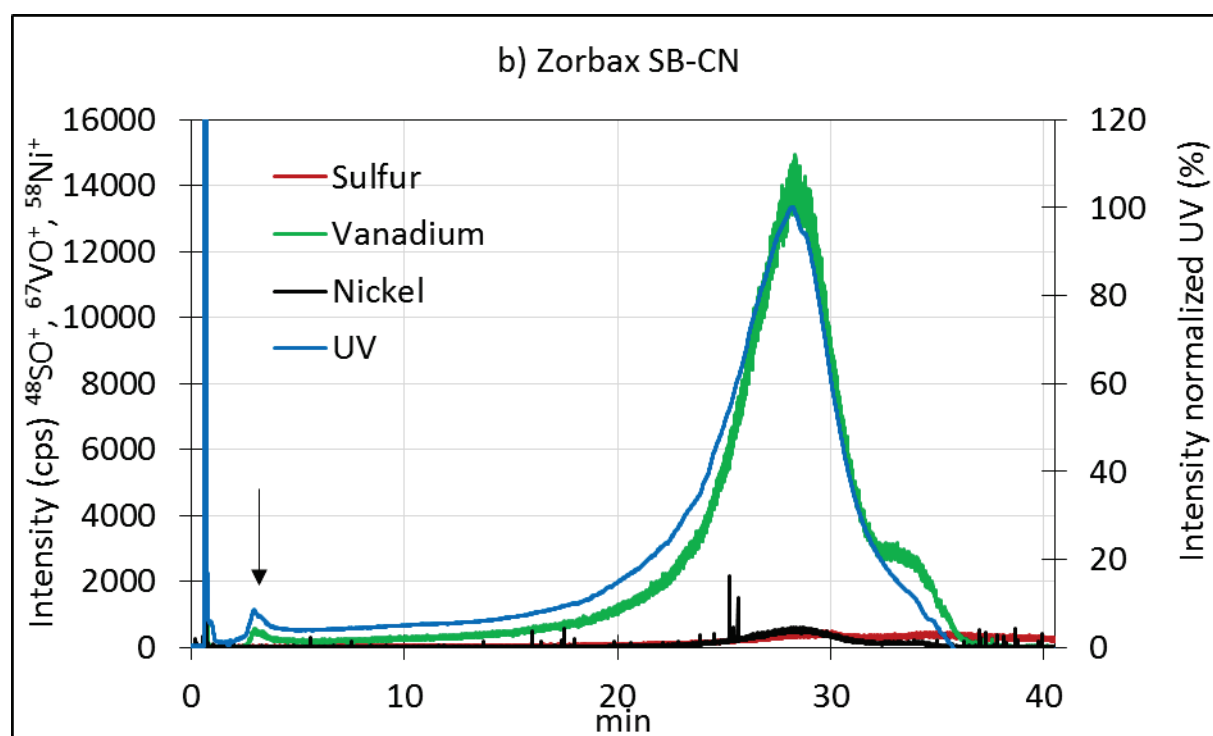
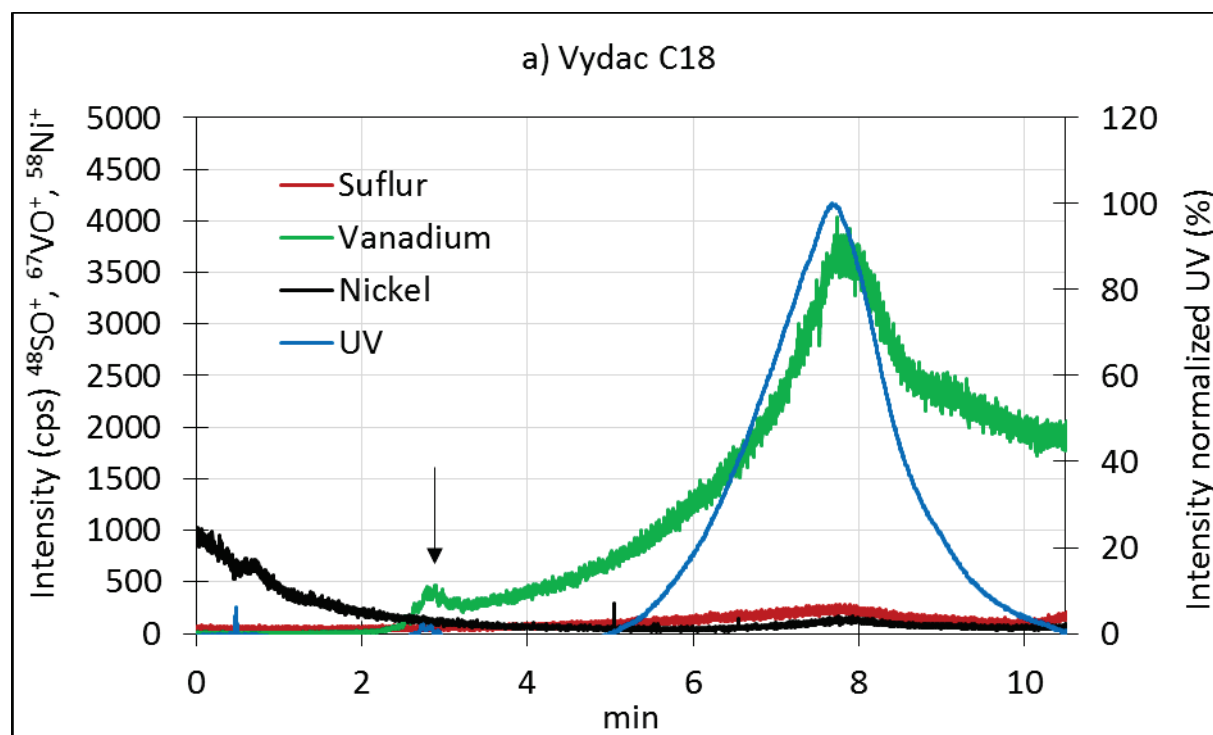
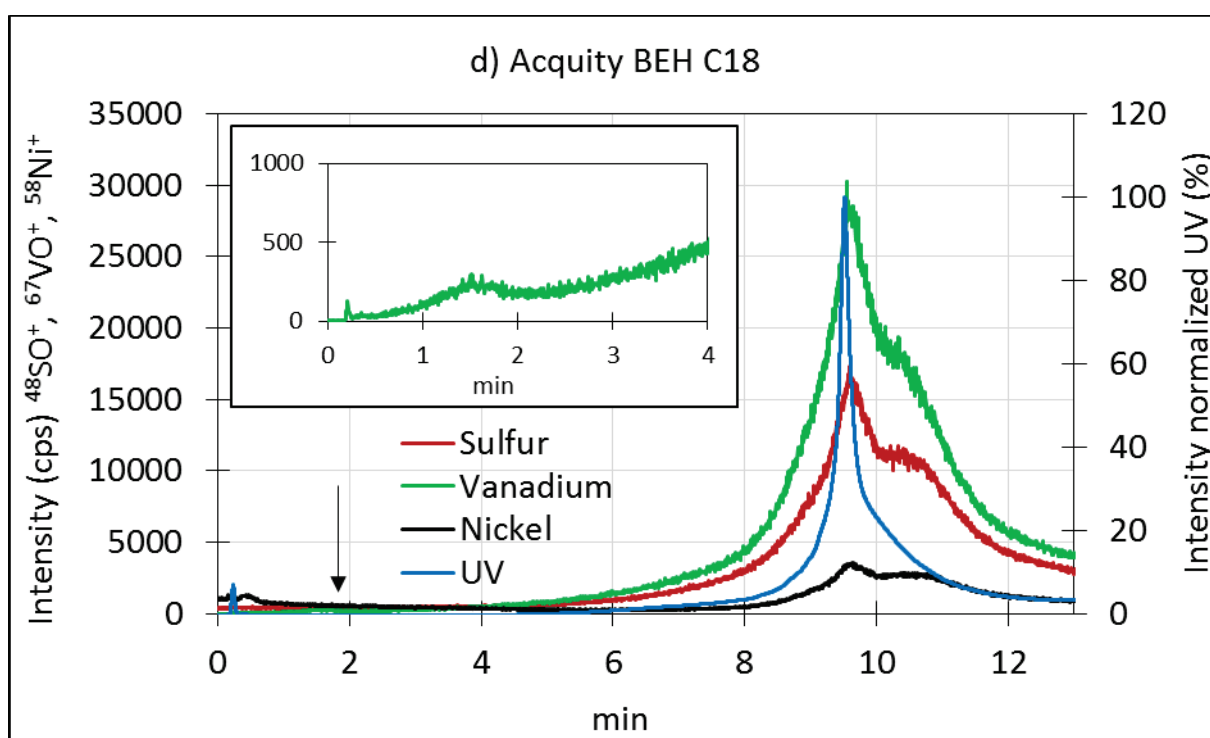
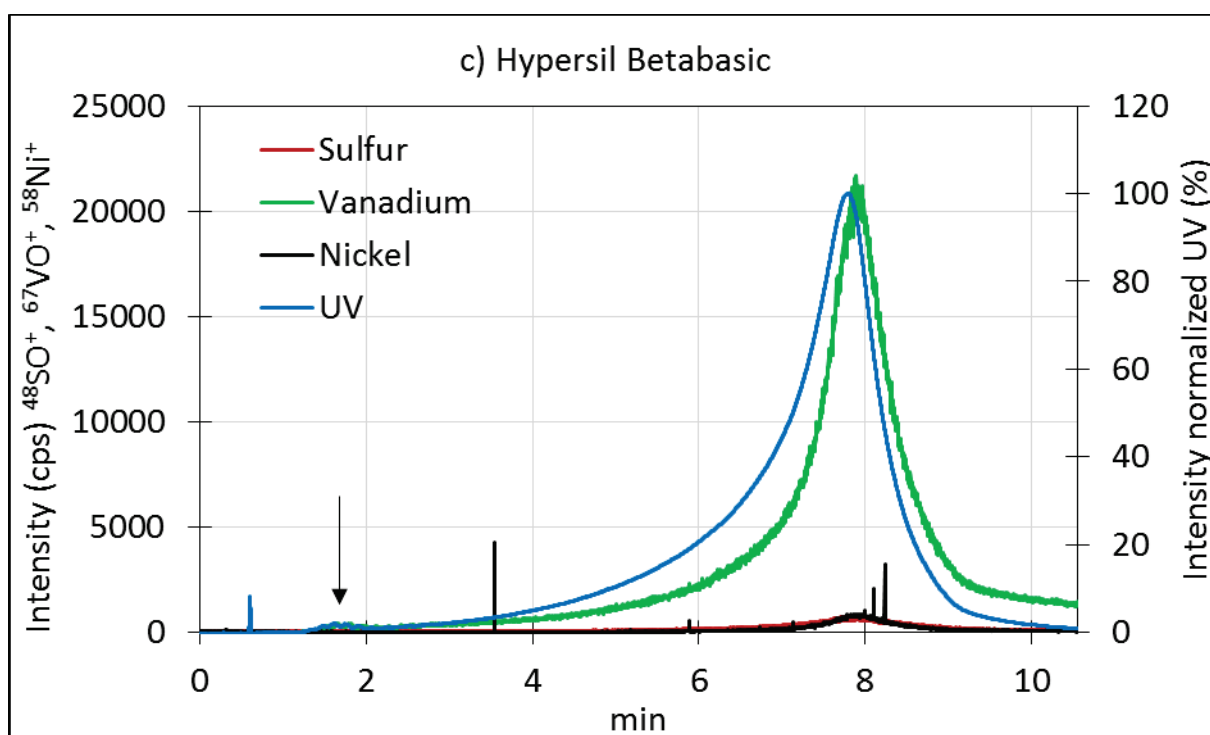


Table S1: Characteristics of the stationary phases and operating conditions

Column name	Abbreviation	Manufacturer	Stationary phase chemistry	d _c (mm)	L _c (mm)	d _p (μm)	Pore Size (Å)	Flow rate (mL/min)	Injection volume (μL)
Acquity BEH C18	BEH C18	Waters	Octadecyl (silica)	2.1	5	1.7	130	0.8	1
Vydac C18	C18	Grace	Polymeric Octadecyl (silica)	2.1	15	5	300	0.8	1
Hypersil Betabasic	C8 Betabasic	Thermo Fisher	Octyl (Silica)	2.1	15	3	150	0.8	3
Zorbax SB-CN	SB-CN	Agilent	Cyano propyl (Silica)	4.6	15	5	80	1	15

Fig S2: Chromatograms obtained for asphaltene fraction with a) Vydac C18, b) Zorbax SB-CN, c) Hypersil Betabasic and d) Acquity BEH C18 columns with ICP-MS/MS detection for sulfur, vanadium and nickel and with UV (407 nm) detection. The Porphyrin peak is indicated by a black arrow.





B. SENSIBILITE DU PLASMA EN PRESENCE DE SOLVANTS ORGANIQUES POUR LES ANALYSES DE SPECIATION

Comme introduit précédemment, un gradient d'élution est utilisé en seconde dimension de séparation, impliquant une variation au cours du temps de la composition de la phase mobile entrant dans le plasma. Au vu de la méthode développée préalablement, la proportion de THF augmente linéairement tout au long de l'analyse. Cette modification de THF modifie les conditions de plasma induisant une variation de la réponse concernant les éléments d'intérêt, au cours de l'analyse. Dans un objectif quantitatif, il est souhaitable de s'affranchir de ces instabilités de plasma. Plusieurs approches ont pour cela été répertoriées à ce jour [1] :

- une approche basée sur une méthode de dilution isotopique en-ligne a été répertoriée dans la littérature pour s'affranchir de telles contraintes [2–5]. Cette approche est basée sur l'ajout, post-colonne, d'un élément enrichi isotopiquement. Cette technique est seulement applicable dans le cas d'éléments constitués de plusieurs isotopes stables et qui ne sont pas interférés,
- certains auteurs, quant à eux, choisissent d'effectuer des corrections mathématiques de la sensibilité de la réponse de l'élément en fonction du pourcentage de solvant organique introduit [7,8]. Cette approche relativement simple à mettre en œuvre, présente l'inconvénient d'être peu reproductible et dépendante de la stabilité de l'appareillage dans le temps,
- enfin, la dernière méthode proposée consiste à installer en amont de la détection une pompe de make-up, permettant l'arrivée d'un contre-gradient assurant une composition constante en solvant organique dans le plasma [9,10]. En revanche, l'instrumentation est conséquente et difficile à mettre en œuvre en routine, nécessitant l'ajout supplémentaire de module de pompe et de té.

L'introduction de solvant organique dans le plasma est en soit un défi. Comme détaillé dans le chapitre I de cette thèse, l'ajout d'oxygène est indispensable pour éviter tout risque de bouchage des cônes. L'utilisation d'un gradient d'oxygène additionnel peut aussi être employé pour contrer les instabilités dans le plasma dues au gradient d'élution. En effet, l'oxygène utilisé en amont de la torche à plasma servant à oxyder les espèces carbonées, est dans la grande majorité du temps optimisé pour une composition de phase mobile fixe, mais avec cette méthode il est possible de faire varier la quantité d'oxygène entrant dans le plasma. Pour cela un contrôleur de débit de gaz est nécessaire dans le but de piloter ce débit de gaz et de l'adapter au type de solvants utilisés au cours de l'analyse. L'utilisation de cet outil en association avec les méthodes préalablement décrites (dilution isotopique, contre gradient,

équations de correction) peut permettre de s'affranchir des fluctuations de la sensibilité en fonction de la teneur en solvant organique et d'améliorer le ratio signal sur bruit (S/B) [6].

Dans ces travaux, il nous a paru intéressant d'évaluer la sensibilité du détecteur vis-à-vis du standard de porphyrine, en fonction de la teneur en solvant causant les plus grandes instabilités plasmatiques : le THF. Ce standard est l'un des seuls composés à l'heure actuelle représentant une famille de composés, contenant des éléments vanadium et nickel, isolés et identifiés dans les échantillons complexes d'intérêts que sont les coupes lourdes pétrolières.

Pour réaliser cette étude, onze solutions contenant un standard de porphyrine, à 2 ppm, dans différents pourcentages de THF ont été analysées en infusion par ICP-MS/MS, dans le but de visualiser la réponse du détecteur sur l'élément vanadium ($m/z=67$). Les mélanges de phases mobiles s'échelonnent de 0 % de THF (soit 100 % d'un mélange 80/20 ACN/H₂O) à 100 % de THF (soit 0 % d'un mélange 80/20 ACN/H₂O), simulant les teneurs en solvant organique perçues par le plasma au cours d'un gradient en phase inverse, comme effectué dans la section précédente. Chacune de ces solutions est infusée via la pompe péristaltique de l'ICP-MS/MS, et le niveau de signal est reporté sur le graphique Figure 4-1. Pour cette étude, les paramètres de plasma sont ceux détaillés dans la section A du chapitre IV, en présence de 100 % THF, ces conditions étant les plus défavorables pour le plasma engendrant un risque d'extinction de celui-ci si les paramètres ne sont pas optimisés.

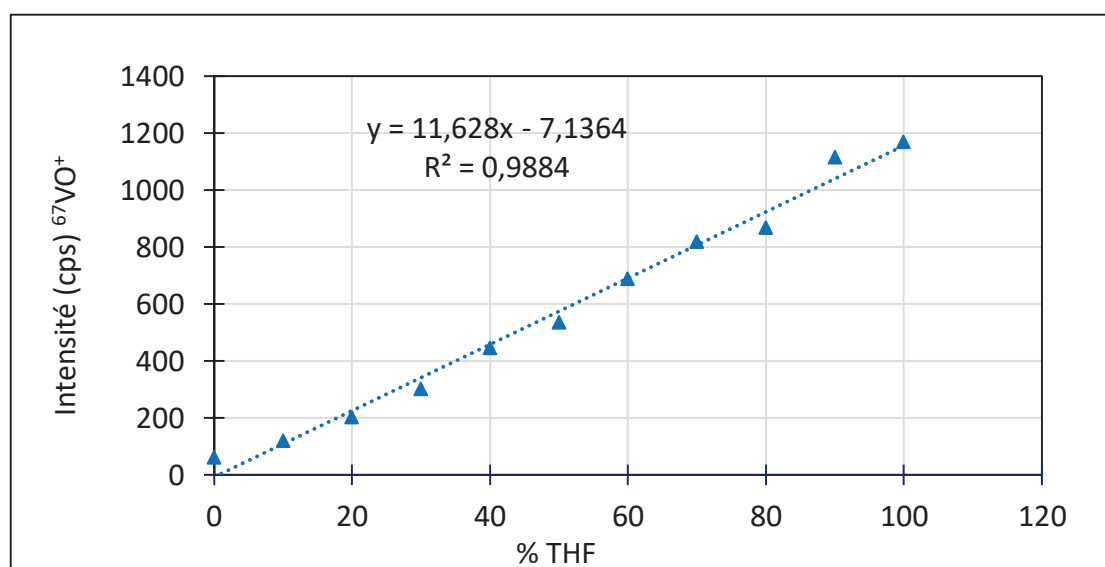


Figure 4-1 : Evolution de l'intensité du signal d'oxyde de porphyrine en fonction du pourcentage de THF dans le plasma dans un mélange 80/20 ACN/H₂O. (Conditions d'analyses : porphyrine 2 ppm, 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ via la pompe péristaltique, puissance générateur : 1500 W, débit du gaz auxiliaire : 0.9 L/min, Débit de gaz plasma : 15 L/min, profondeur de la torche : 7 mm, débit de gaz de nébulisation : 0.45 L/min, débit de gaz optionnel O₂ : 50 %)

Au travers de ces résultats, on remarque que l'intensité du signal augmente de façon linéaire lorsque le pourcentage de THF augmente, ceci indiquant bien que la sensibilité est étroitement liée au type de solvant introduit dans le plasma ainsi qu'au pourcentage de THF.

Pour valider cette observation le rendement de nébulisation est mesuré au cours du gradient d'élution en sortie de chambre de nébulisation. Pour cela, la solution évacuée par le drain de la chambre est collectée toutes les minutes, jusqu'à atteindre 100 % de THF, pour être ensuite pesée dans des flacons préalablement tarés. Cette masse est directement soustraite à la masse collectée toutes les minutes en entrée du nébuliseur permettant ainsi d'obtenir le rendement massique de nébulisation dans ces conditions. Le rendement de nébulisation, présenté Figure 4-2, augmente en fonction du pourcentage de THF présent dans le plasma. En effet, la volatilité du THF est supérieure à celle de l'ACN et de l'eau ce qui augmente son rendement de nébulisation au sein du système d'introduction de l'échantillon au cours du gradient. Une plus grande quantité de solvant est introduite dans le plasma ce qui explique en partie les différences de sensibilité observées au cours du gradient d'élution.

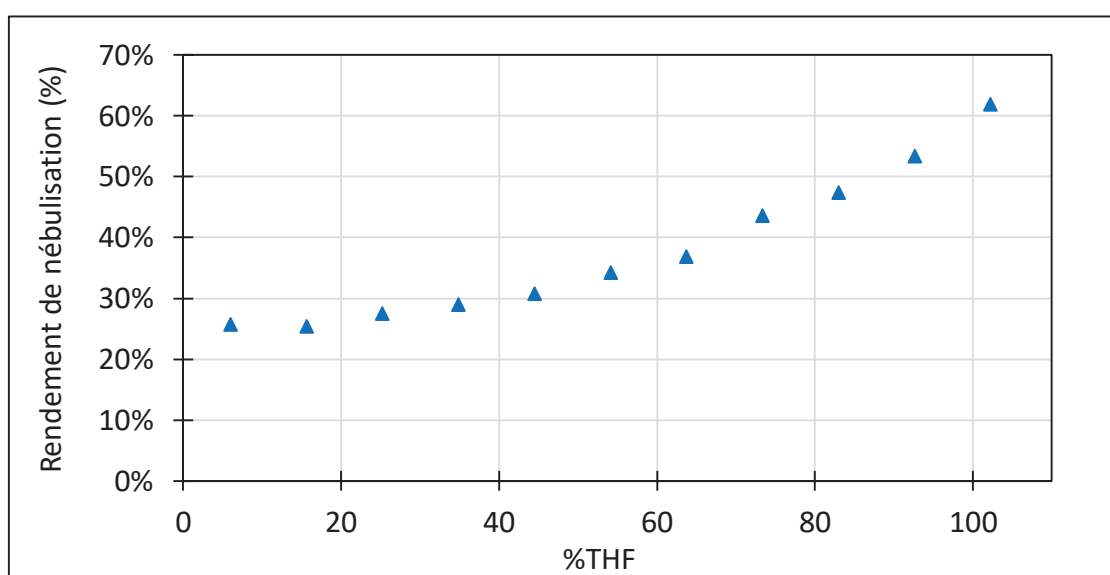


Figure 4-2 : Rendement de nébulisation obtenu avec le nébuliseur PFA-LC et la chambre de nébulisation IsoMist lors de l'analyse de seconde dimension en RPLC. Les conditions d'analyse sont détaillées dans la section A. Plasma optimisé pour 100 % THF.

Ce phénomène confirme que les cartographies obtenues dans la partie A de ce chapitre ne peuvent être utilisées à des fins quantitatives.

La fonction de correction obtenue Figure 4-1 ($y = 11.628x - 7.1364$), dans le cas du vanadium, peut permettre de corriger les contours plots obtenus dans la section précédente en corrigeant l'intensité du signal représentée grâce à l'échelle de couleur. L'hypothèse sous-jacente à cette étude, repose sur le fait que l'ICP-MS/MS fournit une réponse qui est indépendante de la structure moléculaire sous laquelle se trouve l'élément d'intérêt. *Klencsár et al.* ayant démontré dans le cas de l'élément chlore que le facteur de réponse, en fonction du pourcentage de solvant organique, est le même que l'élément se trouve sous sa forme inorganique ou organique. Cette hypothèse restera toutefois à confirmer pour s'assurer de la validité de ce modèle.

Lors du retraitement des données, une correction de la matrice 2D initiale est possible. Pour cela, chacun des points de rétention de la matrice obtenue dans le cas du vanadium sont multipliés par la fonction inverse de l'équation de correction préalablement obtenue ($y = 11.628x + 1740.9426$). Il est donc alors possible de comparer visuellement les cartographies 2D obtenues avant et après retraitement (Figure 4-3 a) et Figure 4-3 b) respectivement). Le pic porphyrinique suspecté aux environs de 1.8 min est plus intense sur la Figure 4-3 b) que sur la Figure 4-3 a), en contrepartie les composés lourds, largement retenus en RPLC apparaissent quant à eux beaucoup moins intenses. Pour vérifier la validité de cette méthodologie, une séparation de composés modèles et de concentrations connues pourrait être envisagée dans le but de vérifier les valeurs des aires de façon quantitative. Ce raisonnement pourrait être appliqué pour les deux autres éléments d'intérêts, soufre et nickel, à condition d'avoir à disposition des standards pour chacun des éléments.

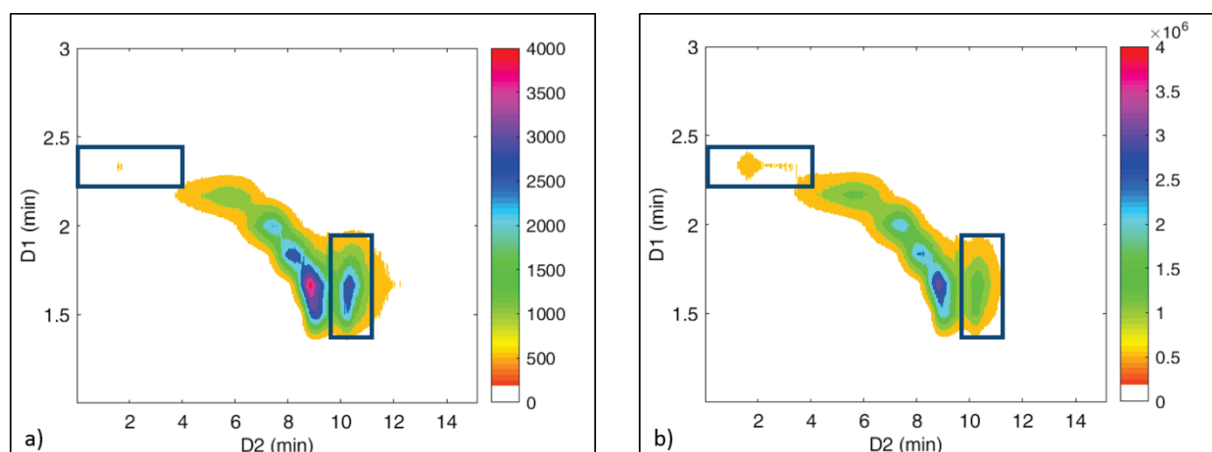


Figure 4-3 : Cartographies 2D de la fraction asphaltène obtenue par SECxRPLC-ICP-MS/MS avec en a) sans correction d'échelle, et en b) avec équation de correction. Les conditions d'analyse sont détaillées dans la section A. Plasma optimisé pour 100 % THF.

Une autre des solutions proposées, au vu de la littérature, pourrait être d'utiliser une pompe de contre-gradient qui permettrait de s'affranchir des fluctuations de la teneur en solvant organique dans le plasma en ajoutant un make-up à la phase mobile qui sort de la colonne. Pour simuler un tel comportement, le montage précédent a été repris et modifié en ajoutant avant le plasma une pompe additionnelle et un té permettant de mélanger les deux solutions. Ce nouveau montage est représenté sur la Figure 4-4. Pour chacune des onze solutions présentées précédemment, une solution opposée en pourcentage de THF (sans porphyrine) est envoyée en isocratique et l'intensité du signal résultant de ce make-up est représentée sur le graphique Figure 4-5.

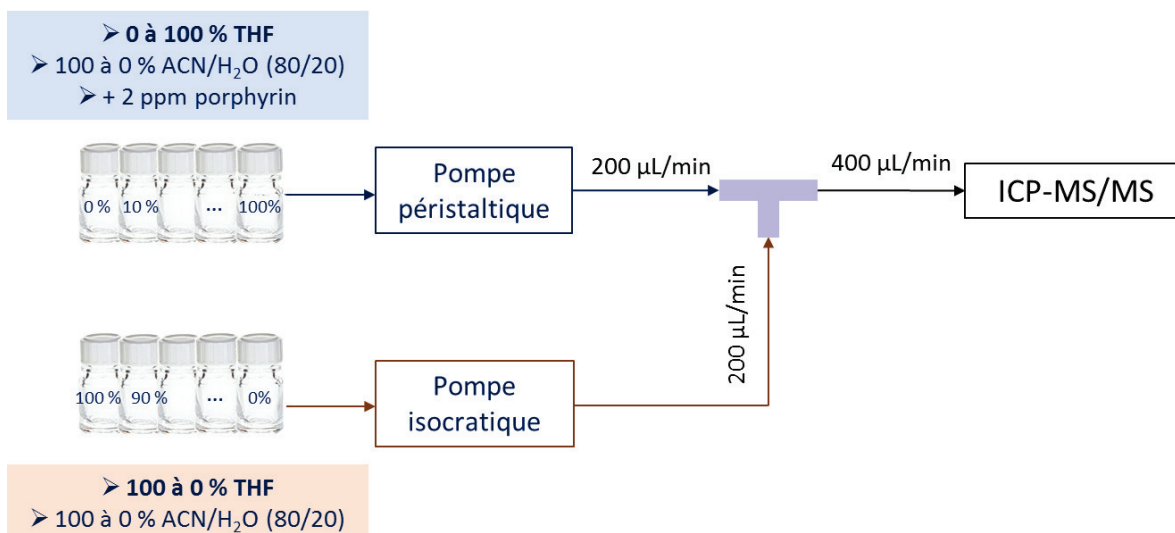


Figure 4-4 : Schéma du montage simulant un contre-gradient avant l'entrée dans le détecteur

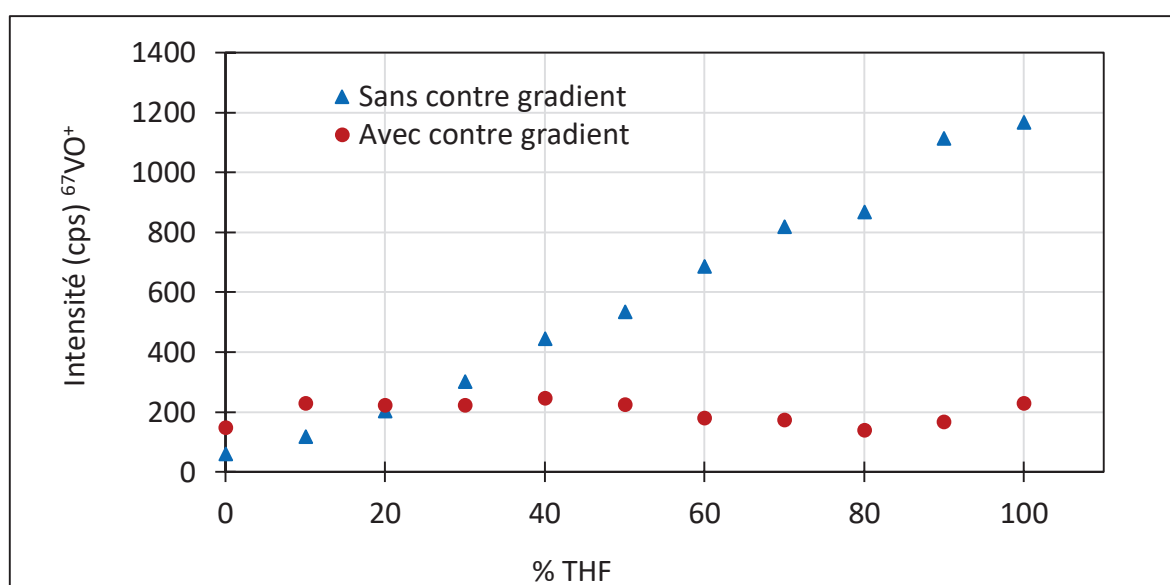


Figure 4-5 : Evolution de l'intensité du signal en fonction du pourcentage de THF pour un montage sans contre-gradient (triangle bleu) et avec contre-gradient (rond rouge). (Conditions d'analyses : porphyrine 2 ppm, 200 µL/min via la pompe péristaltique, et 200 µL/min via la pompe de contre-gradient, puissance générateur : 1500 W, débit du gaz auxiliaire : 0.9 L/min, Débit de gaz plasmagène : 15 L/min, profondeur de la torche : 7 mm, débit de gaz de nébulisation : 0.45 L/min, débit de gaz optionnel O₂ : 50 %)

Ces résultats montrent que l'utilisation d'un contre-gradient permet de lisser le signal et de s'affranchir des variations provenant du gradient de phase mobile dans une analyse réelle. En effet, dans le cas de la porphyrine une valeur moyenne de 200 cps est observée. En revanche, l'intensité du signal est affectée par le phénomène de dilution se produisant dans le té et une dispersion additionnelle est apportée via un tel montage (comme explicité dans le chapitre 2). Ce développement instrumental paraît intéressant pour résoudre les problèmes de sensibilité dans le plasma, mais il nécessite tout de même un lourd montage en parallèle des instrumentations propres au couplage de la chromatographie liquide bidimensionnelle

avec l'ICP-MS/MS. Ce montage peut s'avérer difficile à implémenter dans un contexte industriel. D'autre part, la compatibilité de certains solvants avec les appareillages, tel que le THF, nécessite des précautions particulières (changement des clapets des pompes par exemple) pour supporter le THF sans risque d'endommager les systèmes. Enfin, le nébuliseur choisi dans ces travaux (PFA-LC), pour limiter la dispersion, possède un débit optimal de travail de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Si un contre gradient est utilisé en amont de celui-ci, il faudrait utiliser un diviseur de débit en sortie de colonne pour ne pas dépasser cette valeur limite en sortie de make-up. Hors, l'impact négatif d'un diviseur de débit sur la dispersion a largement été discuté dans le chapitre 2 de ces travaux de thèse.

En conclusion, un contre-gradient est une solution difficile à mettre en œuvre à une échelle industrielle, et plus spécifiquement dans le domaine pétrolier (présence de THF), mais il s'avère être une solution fonctionnelle qui peut être nécessaire à mettre en œuvre lors du développement d'analyses quantitatives.

CONCLUSIONS

Au travers de ce chapitre, le couplage de la chromatographie liquide bidimensionnelle avec l'ICP-MS/MS a pu être mis en place pour parvenir à une meilleure caractérisation des produits pétroliers lourds.

Les mécanismes de rétention retenus pour l'analyse des composés lourds du pétrole sont la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC). Le choix des conditions de première et seconde dimension (SECxRPLC ou RPLCxSEC) s'est fait en tenant compte des contraintes générées par chacun des modes de rétention (ratio de split, dimension de colonnes en SEC, nombre de fractions en seconde dimension...). Lors du développement méthodologique, la comparaison du mode en-ligne et du mode hors-ligne a été réalisée en s'appuyant sur la capacité de pics ainsi que sur le facteur de dilution estimé à l'aide d'outils prédictifs tels que l'approche Pareto. Au vu des capacités de pics obtenues, le mode hors-ligne SECxRPLC offre le plus grand pouvoir de séparation, 2600 contre 1480 pour le mode en-ligne RPLCxSEC, pour un temps d'analyse de 2.5 h.

C'est donc ce dernier mode qui est retenu pour l'analyse des fractions lourdes du pétrole. Les cartographies des fractions SARA (Saturés, Aromatiques, Résines, et Asphaltènes), obtenues à l'aide de cette méthode sont comparées et apportent des informations additionnelles à la seule analyse 1D. Le poids moléculaire des espèces présentes dans ces fractions peut être relié à l'hydrophobie des molécules grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide bidimensionnelle.

Enfin, concernant le développement d'analyses quantitatives, des travaux additionnels seront nécessaires dans le futur pour s'affranchir des instabilités de plasma au cours des gradients d'élution. Car même si l'utilisation d'un contre-gradient semble pouvoir contrebalancer les effets indésirables du gradient de solvant, aucune analyse n'a pu être réalisée pour l'heure en application directe sur des échantillons complexes pétroliers.

RÉFÉRENCES

- [1] B. Klencsár, S. Li, L. Balcaen, F. Vanhaecke, High-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma – Mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) for quantitative metabolite profiling of non-metal drugs, *TrAC Trends Anal. Chem.* 104 (2018) 118–134. doi:10.1016/j.trac.2017.09.020.
- [2] L. Rottmann, K.G. Heumann, Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 221–227. doi:10.1007/BF00322473.
- [3] G. Koellensperger, S. Hann, J. Nurmi, T. Prohaska, G. Stingeder, Uncertainty of species unspecific quantification strategies in hyphenated ICP-MS analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1047–1055. doi:10.1039/B302565A.
- [4] F. Cuyckens, L.I.L. Balcaen, K. De Wolf, B. De Samber, C. Van Looveren, R. Hurkmans, F. Vanhaecke, Use of the bromine isotope ratio in HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1717–1729. doi:10.1007/s00216-007-1761-6.
- [5] B. Meermann, M. Bockx, A. Laenen, C. Van Looveren, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, Speciation analysis of bromine-containing drug metabolites in feces samples from a human in vivo study by means of HPLC/ICP-MS combined with on-line isotope dilution, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 439–448. doi:10.1007/s00216-011-5339-y.
- [6] B. Meermann, M. Kießhauer, Development of an oxygen-gradient system to overcome plasma instabilities during HPLC/ICP-MS measurements using gradient elution, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 2069–2075. doi:10.1039/C1JA10177C.
- [7] B. Klencsár, L. Balcaen, F. Cuyckens, F. Lynen, F. Vanhaecke, Development and validation of a novel quantification approach for gradient elution reversed phase high-performance liquid chromatography coupled to tandem ICP-mass spectrometry (RP-HPLC-ICP-MS/MS) and its application to diclofenac and its related compounds, *Anal. Chim. Acta.* 974 (2017) 43–53. doi:10.1016/j.aca.2017.04.030.
- [8] C. Siethoff, I. Feldmann, N. Jakubowski, M. Linscheid, Quantitative determination of DNA adducts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 421–426. doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199904)34:4<421::AID-JMS790>3.0.CO;2-I.
- [9] T. Górecki, F. Lynen, R. Szucs, P. Sandra, Universal Response in Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3186–3192. doi:10.1021/ac060078j.
- [10] A.S. Pereira, M. Schelfaut, F. Lynen, P. Sandra, Design and evaluation of a multi-detection system composed of ultraviolet, evaporative light scattering and inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the analysis of pharmaceuticals by liquid

chromatography, J. Chromatogr. A. 1185 (2008) 78–84.
doi:10.1016/j.chroma.2008.01.030.

Chapitre 5 - COMPARAISON D'ECHANTILLONS COMPLEXES

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

Article 4

"Speciation of sulfur, vanadium and nickel in heavy crude oils by comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry"

M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Talanta (2019), submitted

INTRODUCTION

La conversion des fractions les plus lourdes du pétrole en produits à haute valeur ajoutée représente un défi important, étant donné la raréfaction des pétroles conventionnels (pétroles légers) [1]. Les résidus atmosphériques (RAs) ou résidus sous vide (RSVs), obtenus respectivement dans les raffineries par distillation atmosphérique ou distillation sous vide, concentrent des quantités importantes d'hétéroatomes et de métaux [2]. Les molécules soufrées ainsi que celles contenant du nickel et/ou du vanadium, sont responsables de la corrosion des unités ainsi que de l'empoisonnement des catalyseurs. La caractérisation de ces espèces, à l'aide d'analyse de spéciation, dans ces matrices pétrolières est nécessaire pour améliorer les technologies de démétallation et de désulfuration au sein des unités de raffinage.

Le chapitre précédent a permis de détailler la méthode bidimensionnelle développée au cours de cette thèse couplée à une détection spécifique. Dans ce dernier chapitre nous nous sommes donc intéressés à l'application de cette méthode à haut pouvoir de résolution sur des échantillons d'une grande complexité. Pour cela, cinq résidus sous vide présentant des rendements de conversion différents au sein des raffineries ont été comparés pour les trois éléments d'intérêts (S, V et Ni). L'obtention de contours plot 2D permet une comparaison visuelle des échantillons entre eux ainsi que pour chacun des éléments.

Cette comparaison est rendue possible grâce à l'utilisation de « masques » permettant de mettre en lumière l'absence ou la présence de certaines familles de composés dans des matrices données. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'origine géographique des pétroles bruts ayant permis l'obtention de ces coupes lourdes, dans le but d'évaluer si l'origine géographique pouvait être corrélée aux profils des images 2D obtenues grâce à cette méthode. Ces travaux sont présentés au travers d'une publication prochainement soumise dans Talanta.

A. COMPARAISON D'ÉCHANTILLONS COMPLEXES

La méthode, préalablement décrite dans le chapitre IV, est appliquée à différents échantillons issus des coupes lourdes du pétrole et de provenance différentes. Les cartographies 2D obtenues sont comparées visuellement dans le but d'obtenir des informations relatives au poids moléculaire et à l'hydrophobie des espèces présentes. Ces résultats sont présentés sous forme d'article scientifique dans la suite de cette section.

Article 4

"Speciation of sulfur, vanadium and nickel in heavy crude oils by comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry"

M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Talanta (2019), submitted

Speciation of sulfur, vanadium, and nickel in heavy crude oils by comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry

Marie Bernardin^{1,2}, Agnès Le Masle², Frédérique Bessueille-Barbier¹, Charles-Philippe Lienemann², Sabine Heinisch^{*1}

(1) Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, ENS Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

(2) IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize France

*Corresponding author: Tel: +33 437 423 551;

E-mail address: sabine.heinisch@univ-lyon1.fr (Sabine Heinisch)

Abstract

Two-dimensional liquid chromatography combining Size Exclusion Chromatography (SEC) and Reversed-Phase Liquid Chromatography (RPLC) was used with Inductively Coupled Plasma tandem Mass Spectrometry (ICP-MS/MS) as specific detection for the comparison of petroleum samples showing a high level of complexity. This multi-dimensional technique was proved to be an attractive tool to analyze both Vacuum Residues (VRs) and Atmospheric Residue (AR), coming from refinery processes. They were analyzed without prior fractionation and could be differentiated according to their vanadium, nickel and sulfur distributions in one single analysis. The first dimension provides information about molecular weight while the second one about hydrophobicity. Comparison of five VRs, with different geographical origins, were made possible by superimposing on each 2D-contour plot a mask, which enabled to discriminate seven groups of compounds for the three elements with various degrees of hydrophobicity and molecular weights. An additional group of compounds was observed for nickel. Those compounds were poorly retained in SEC but also in RPLC, suggesting the presence of polar high molecular weight compounds. In view of this study, the metal distribution appears to be significantly different depending on both the VR origin and the considered element.

Keyword

Vacuum residue – Two-dimensional liquid chromatography – SECxRPLC-ICP-MS/MS – Speciation – Vanadium – Sulfur – Nickel – 2D-contour plots

1. Introduction

Because of the decline of light and conventional oils over the last decades, the demand for the characterization of heavy crude oils has rapidly grown [1]. For petroleum industry, the challenge is to convert heavy fractions enriched in metals and heteroatoms [2] into lighter products. Sulfur, vanadium and nickel, naturally present in large amounts in crude oils, are concentrated in the vacuum residue, resulting from the vacuum distillation unit in refinery processes as shown in Fig.1 [3–5].

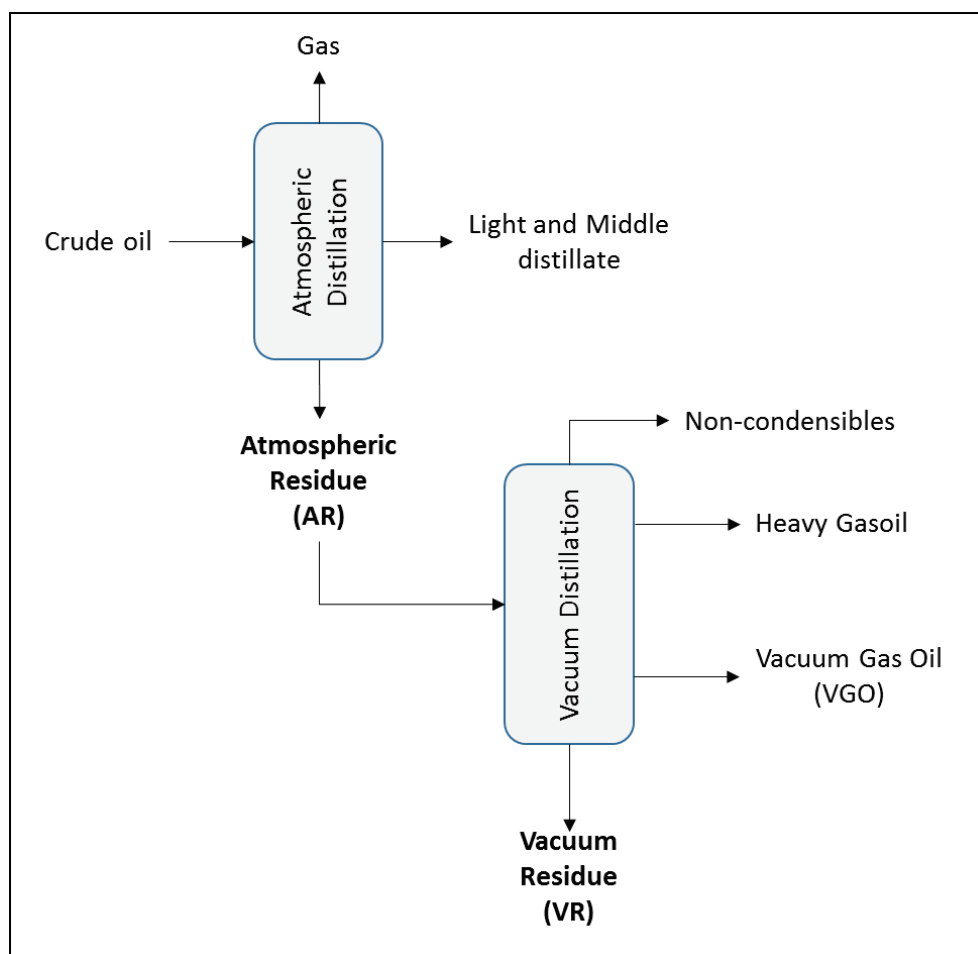


Figure 1: Schematic representation of petroleum refinery. Adapted from [3]

Heteroatoms and metals have a detrimental effects on catalysts due to the decomposition of metal complexes during hydrodesulfurization and catalytic cracking operations which results in a metal deposition on catalysts [5]. It is admitted that vanadium and nickel deposits lead to a decrease in both activity and lifetime of catalysts [5–7] and that vanadium may degrade the selectivity of catalysts used for cracking by blocking its active sites, thereby increasing coke formation and hence reducing gasoline yields [8]. In addition, vanadium forms sodium vanadates, inducing the corrosion of metal surface [8]. Sulfur is present in large amounts in crude oils. It has to be carefully managed due to its contribution

to the increasing problem of atmospheric pollution, sulfur oxides being emitted when fuel with a high sulfur content is combusted [9]. The total concentrations of these elements in heavy crude oils is known. They are listed in Table 1 for some relevant vacuum residues [10].

Geographical origin	Vanadium^(a) ($\mu\text{g/g}$)	Nickel^(a) ($\mu\text{g/g}$)	Sulfur^(b) (mg/g)
Saudi Arabia	97	28	42
Russia	170	50	27
Iraq	183	58	55
Congo	10	85	4
Canada	317	115	57

^(a) from [10,11], ^(b) measured values obtained from IFPEN

Table.1 Vanadium (V), nickel (Ni) and sulfur (S) contents in Vacuum Residues depending on their geographical origins.

Until recently, only three families were described by speciation analysis in heavy crude oils, based on their molecular weight. The speciation technique was Gel Permeation Chromatography (GPC) coupled to Inductively Coupled Plasma High-Resolution Mass Spectrometry (GPC-ICP-HRMS). Heavy crude oils could be roughly separated into three fractions: High (HMW), Medium (MMW) and Low (LMW) Molecular Weight compounds [4,10,12,13]. LMW compounds were suspected to be metalloporphyrins with vanadium, nickel [4]. MMW and HMW compounds form larger structures with metalloporphyrins either trapped or present in nanoaggregates [14–17]. Considering such analytical technique, the size of metal complexes can be assessed, thereby allowing the development of catalysts with suitable pore sizes, which is essential for hydrodemetallation and hydrodesulfurization processes.

However, the sole molecular weight information is not sufficient to characterize complex matrices. Recently, we applied two dimensional liquid chromatography to the speciation of a fractionated petroleum sample [18]. The conditions for size exclusion chromatography (SEC) coupled to Reversed-Phase Liquid Chromatography (SECxRPLC) were optimized and successfully applied to the speciation of SARA fractions (Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes) obtained from a heavy crude oil. The aim of the present study was to apply this novel analytical approach to even more complex heavy oil samples including vacuum residues (VRs) and atmospheric residues (ARs), not subject to any preliminary fractionation or treatment as SARA fractions. The entire samples (VRs and ARs) were thus directly analyzed in SECxRPLC-ICP-MS/MS. An AR, coming from Venezuela exhibiting a high content of metals and heteroatoms, could be used to build a mask. This one was used for comparing VRs from different geographical origins, the conversion yield of both hydrodesulfurization and hydrodemetallation processes being strongly related to the geographical origin of the crude oil and hence to the corresponding vacuum residue.

2. Experimental section

1.1. Chemicals and reagent

Tetrahydrofuran (THF) unstabilized UHPLC/MS grade was purchased from Biosolve Chimie SARL (Dieuze, France). Acetonitrile LC-MS grade (ACN) was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Water was obtained from Elga water purification system (Veolia water STI, Le Pless Robinson, France). SPEX CertiPrep (Metuchen, NJ, USA) Co, Ce, Y, Tl, Li monoelemental standards in 2 % HNO₃ (1000 µg/L) were used to prepare the multielement standard solution used for the system calibration. This solution with 10 ppb Co, Ce, Y, Tl, Li diluted in acetonitrile was used for daily calibration of the ICP-MS/MS.

1.2. Sample Preparation

Vacuum residues (VRs) and atmospheric residue (AR) coming from vacuum distillation and atmospheric distillation respectively, in the refinery process of crude oil, were supplied from IFPEN (Fig.1). The atmospheric residue (Venezuela) and the five vacuum residues were obtained from several crude oils and were named according to their geographical origin. VRs are listed in Table 1, as well as the type of the crude oil, the metal (vanadium and nickel) and sulfur contents according to data found in the literature [10]. VR and AR samples were diluted 60 times in THF prior to analysis.

1.3. Instrumentation

Chromatographic separations were achieved using an Infinity 1290 liquid chromatography system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), for both dimensions. This instrument includes a high-pressure binary solvent manager with a maximum delivery flow-rate of 5 mL/min, an autosampler with a flow-through needle of 20 µL injection sample loop, a column oven with a maximum temperature of 100 °C. The measured dwell volume was 300 µL. The instrument control was performed by Mass Hunter. The outlet of the column was connected to a T-union P-727 (from Upchurch, Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) with zero dead volume as flow-splitter. To ensure that the nebulizer works in proper condition, the split ratio was set to 1:1 for every analysis, to achieve a mobile phase flow rate of 400 µL/min. Detection was performed using an Agilent 8800 ICP-MS/MS system (Agilent Technologies) with a PFA-LC nebulizer (Elemental Scientific Omaha, Nebraska USA), an IsoMist device (Courtage Analysis Service, Mont Saint Aignan, France) with a Twinnabar spray chamber as Sample Introduction System (SIS). The spray chamber temperature was set at -2°C by Peltier effect. The system was equipped with a quartz torch with a 1 mm i.d. injector (Agilent Technologies). The following ICP-MS/MS parameters were chosen: plasma power of 1500 W, auxiliary gas flow rate of 0.9 L/min, plasma gas flow rate of 15 L/min, sampling depth of 7 mm, carrier gas of 0.45 L/min. Viton[®] tubings (SCP Science, Villebon-sur-Yvette, France) were used

for the correct use of the peristaltic pump with an organic solvent such as THF. Oxygen was mixed to the argon gas flow (20 % of O₂ in Ar) and added through the HMI tubing on the ICP-MS/MS and set at 0.5 L/min, to ensure a stable plasma and to avoid carbon deposit on the surface of the cones (sampler and skimmer). The quantity of oxygen required to avoid plasma issues with organic solvent was optimized by visually assessing C₂ emission band. Platinum was used for the sampling cone and the skimmer cone instead of nickel as usual, for the inertness of the platinum. The analyzer unit of the instrument consisted of two quadrupole mass analyzers and an octopole collision-reaction cell placed between them. Vanadium, sulfur, and nickel were detected in MS/MS mode with O₂ as a reaction gas in the cell. The vanadium 51 was shifted to the mass ratio $m/z = 67$ (⁶⁷VO⁺), sulfur 32 was shifted to the mass ratio $m/z = 48$ (⁴⁸SO⁺). Nickel was not shifted and was analyzed at $m/z = 58$ (⁵⁸Ni⁺). The reaction gas flow-rate was optimized at 0.3 mL/min O₂ as previously described in our previous paper [18]. Data acquisition and instrumental control were performed by MassHunter software (Agilent). 2D-data were processed using calculation tools developed under Excel and Matlab to construct a matrix enabling the construction of 2D-contour plots.

1.4. SECxRPLC-ICP-MS/MS method

As thoroughly described in our previous work [18], the conditions of two-dimensional chromatography were as follows:

In the first separation (¹D): an APC XT 125 (150 x 4.6 mm, 2.5 μm, 125 Å) column, proposed for effective molecular weights ranging from 1000 to 30000 g/mol), an injection volume of 15 μL, THF as mobile phase, 0.8 mL/min, 30 °C as column temperature.

In the second dimension (²D): an ACQUITY BEH C₁₈ (50 x 2.1 mm, 1.7 μm) column, ACN:H₂O, 80:20, (v/v) for solvent A, THF for solvent B; 1 % - 99 % B (0-10.2 min); 99 % B (10.2-15.2 min); 99 % - 1 % B (15.2-15.3 min); 1 % B (15.3-15.8 min), an injection volume of 5 μL, 0.8 mL/min, 30 °C as column temperature. Off-line fractionation was performed manually every 10 s. The vials collecting the fractions from the first dimension were further placed in the auto-sampler to be analyzed in the second dimension. Same above conditions were used for one-dimensional chromatography.

3. Results and discussion

The aim of this work was to compare the potential of two-dimensional liquid chromatography (SECxRPLC) to that of conventional separation techniques (SEC or RPLC) when dealing with the speciation of petroleum samples. 5 vacuum residues coming from 5 different origins (Saudi Arabia, Russia, Iraq, Congo, and Canada) were thus analyzed by SEC, RPLC and SECxRPLC, in order to obtain separations with a specific detection of vanadium,

nickel and sulfur. The speciation of these three elements, within a single analysis, was made possible by ICP-MS/MS (triple quadrupole MS), much more specific than conventional ICP-MS.

3.1. SEC-ICP-MS/MS

The total metal content of the five vacuum residues of interest were assessed by ICP-MS [10,11]. The obtained values are listed in Table 1. Canada VR appeared to be the most enriched among the 5 VRs, with a vanadium content of 317 $\mu\text{g/g}$ and a nickel content of 115 $\mu\text{g/g}$. For all VRs, the sulfur content is much higher (e.g 57 mg/g for Canada VR). In our study, the 5 five VRs were analyzed with an ICP-MS/MS detection, using an APC XT 125 column (150 x 4.6 mm, 2.5 μm) instead of a conventional GPC column (300 x 7.8 mm, 5 μm) as used by Caumette et al. [10,11]. Although the total content of each element in each VR was not measured, it was important to verify whether the results obtained by this analytical method were consistent with the published results. For vanadium and nickel, the peak area obtained for each VR was compared to the peak area obtained for the most enriched one (i.e. Canada VR). The related ratios between both values are represented in Fig.2 for both vanadium (Fig.2a) and nickel (Fig.2b).

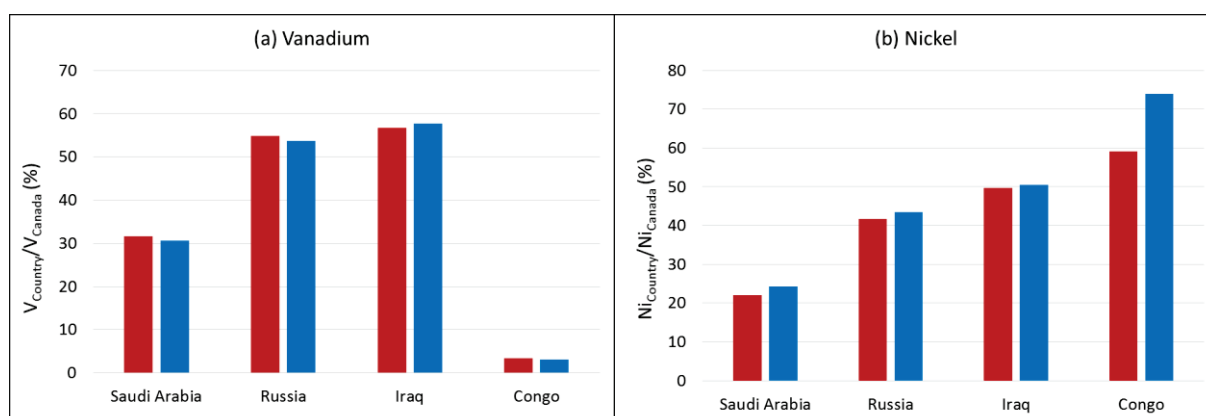


Figure 2: Ratio of (a) Vanadium and (b) Nickel contents between a given country VR and Canada VR. The ratio is assessed by the peak areas obtained in SEC-ICP/MS (red bars) or by element content values obtained in ICP-MS (blue bars) as given in Table 1.

Similarly, Figs.2a and 2b show, for each VR, the ratio between its element content and that of Canada VR (values given in Table 1). It was satisfying to observe that our results obtained in SEC-ICP-MS/MS, assessed by the ratio of peak areas (red bars) and reported ones [10,11], assessed by the ratio of element contents (blue bars), were very similar, suggesting that our analytical technique (SEC-ICP-MS/MS) can provide the same results in term of total element content and does not lead to any adsorption phenomenon which could be specific to a given VR. A slight difference is yet noticeable for nickel in case of Congo VR between our measures and former reported ones [10,11]. That could be explained by the presence of unstable nickel species and/or by a lower sensitivity in case of nickel, giving rise to a larger variability of nickel content. Regarding speciation analysis, the reduction of the analysis time

(4 min vs 60 min) along with the decrease of solvent consumption (3 mL vs 40 mL) are some clear advantages of our proposed SEC method compared to the one previously developed with a longer and larger column packed with larger particle size.

The overlaid separations of two VRs (Russia and Iraq) are presented in Figs.3a, 3b, and 3c with a specific detection of sulfur, vanadium, and nickel respectively.

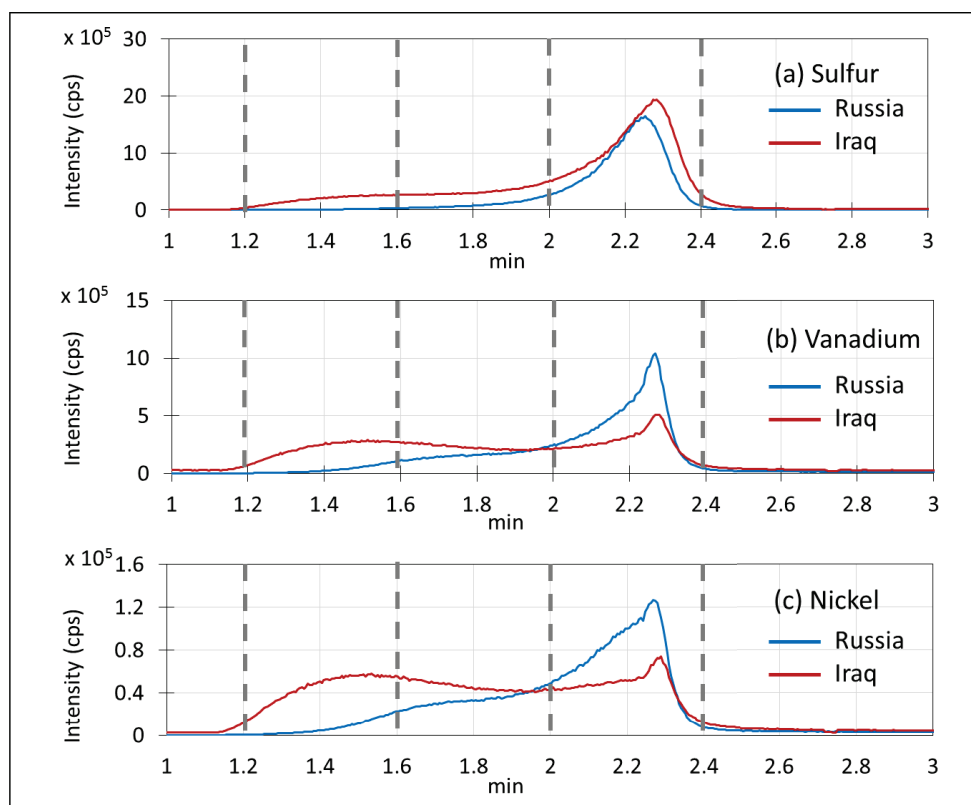


Figure 3: Overlaid separations of two Vacuum Residues (Russia VR and Iraq VR) in SEC-ICP-MS/MS with specific detection of (a) Sulfur ($^{48}\text{SO}^+$), (b) Vanadium ($^{67}\text{VO}^+$), and (c) Nickel ($^{58}\text{Ni}^+$). Grey dotted lines delimit 4 notable retention ranges. Conditions given in the experimental section.

Three retention ranges (delimited by grey dotted lines in Fig.3) corresponding to three mass ranges can be pointed out: (i) between 1.2 min (total exclusion time) and 1.6 min for HMW compounds, (ii) between 1.6 min and 2 min for MMW compounds and (iii) between 2 min and 2.4 min (total permeation time) for LMW compounds. As can be seen, all the separations cover the entire retention window ranging from the total exclusion time (1.2 min) to the total permeation time (2.4 min). The comparison of the obtained separations by considering either the different VR origins (Russia or Iraq) or the different elements (S, V or Ni) gives rise to some interesting observations: (i) by comparing the separations on the basis of elements, it appears that the presence of HMW and MMW compounds is less marked for sulfur (Fig.3a) than for vanadium (Fig.3b) and nickel (Fig.3c). In case of Russia VR, only LMW compounds seem to contain sulfur; (ii) by comparing the separations on the basis of VR origins, it can be observed that whereas the separation profiles are quite similar for sulfur between

the two VRs (Fig.3a), they are significantly different for vanadium (Fig.3b) and nickel (Fig.3c) with a reversed repartition of the masses. The peak of LMW compounds is more intense in case of Russia VR whereas the peak of HMW compounds is more intense in case of Iraq VR, suggesting that Iraq VR was more enriched in HMW compounds than Russia VR which appears to be the opposite as regards LMW compounds. These observations show that residues coming from different geographical origins can exhibit different mass distribution for the three elements and furthermore that SEC hyphenated to ICP-MS/MS can provide useful information to compare petroleum matrices despite a continuum profile. However, the comparison of different VRs, only based on the molecular weight distribution of heteroatoms or metals, is likely to be not sufficient for improving conversion processes of heavy crude oils in petroleum industry.

3.2. RPLC-ICP-MS/MS

The second studied analytical approach was RPLC-ICP-MS/MS. The overlaid separations of Iraq and Russia VRs are presented in Fig.4 with a specific detection of sulfur (Fig.4a), vanadium (Fig.4b), and nickel (Fig.4c).

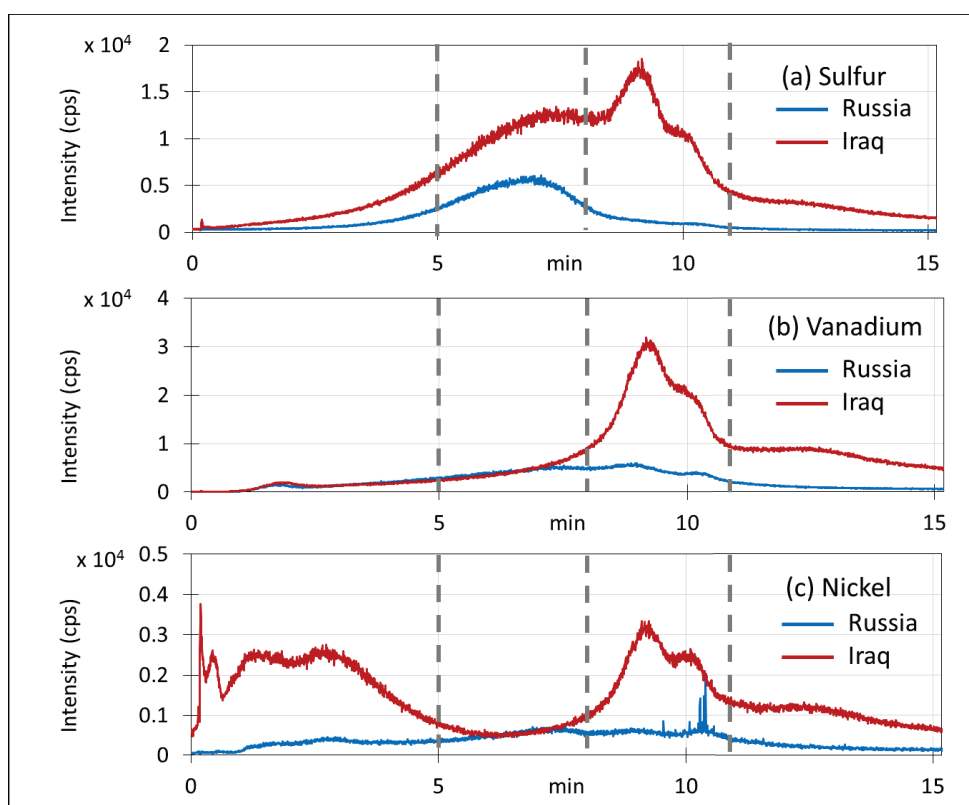


Figure 4: Overlaid separations of two Vacuum Residues (Russia VR and Iraq VR) in RPLC-ICP-MS/MS with specific detection of (a) Sulfur ($^{48}\text{SO}^+$), (b) Vanadium ($^{67}\text{VO}^+$), and (c) Nickel (^{58}Ni). Grey dotted lines delimit 4 notable retention ranges. Conditions given in the experimental section.

Similarly to SEC, four retention ranges (delimited by grey dotted lines in Fig.4) can be pointed out in RPLC-ICP-MS/MS: (i) between 0 min and 5 min (polar compounds), (ii) between 5 min and 8 min (intermediate polar compounds), (iii) between 8 min and 11 min (hydrophobic compounds) and (iv) between 11 min and 15.2 min (highly hydrophobic compounds). Once again, the separations are significantly different depending on the origin of the residue and on the element and some observations can be made depending on the retention range:

(i) Below 5 min, for sulfur (Fig.4a), the signal intensity slightly increases with the retention time. It is higher for Iraq but the general trend is the same for the two VRs, indicating the presence of polar sulfur compounds; for vanadium (Fig.4b), the separation is exactly the same for both Iraq and Russia with the presence of a small peak at 1.8 min; for nickel (Fig.4c), a large continuous peak can be observed, much more intense in case of Iraq VR. As can be seen, in this retention range, the separation is quite different depending on the element considered.

(ii) Between 5 and 8 min, there is an intense peak for sulfur (Fig.4a), in both Iraq and Russia VRs (more intense in case of Iraq VR). This peak is not observed for vanadium or nickel (Figs.4b and 4c respectively). However, for these metal elements, a small bump can be observed in case of Russia VR.

(iii) Between 8 and 11 min, there is no significant differences between the three elements. Two distinct peaks are present in this retention range, much more intense in case of Iraq VR than of Russia VR.

(iv) Finally, between 11 and 15.2 min, the separation profile seems very similar between the geographic origins and between the elements. It is yet interesting to note that the signal did not reach the baseline even with a long isocratic step at 100 % THF, thereby confirming the presence of very highly hydrophobic compounds in heavy oils.

1D-RPLC performed as a single analysis can only provide information on the hydrophobicity of the molecules chelated with metals and heteroatoms. In view of the above, RPLC appears to be more informative than SEC. A two-dimensional approach combining SEC and RPLC is expected to provide much more interesting information by connecting information on molecular weight with information on hydrophobicity.

3.3. SECxRPLC-ICP-MS/MS

The conditions previously developed in SECxRPLC-ICP-MS/MS [18] were applied to both Iraq and Russia VRs. Resulting 2D-contour plots are shown in Fig 5 for sulfur, vanadium, and nickel.

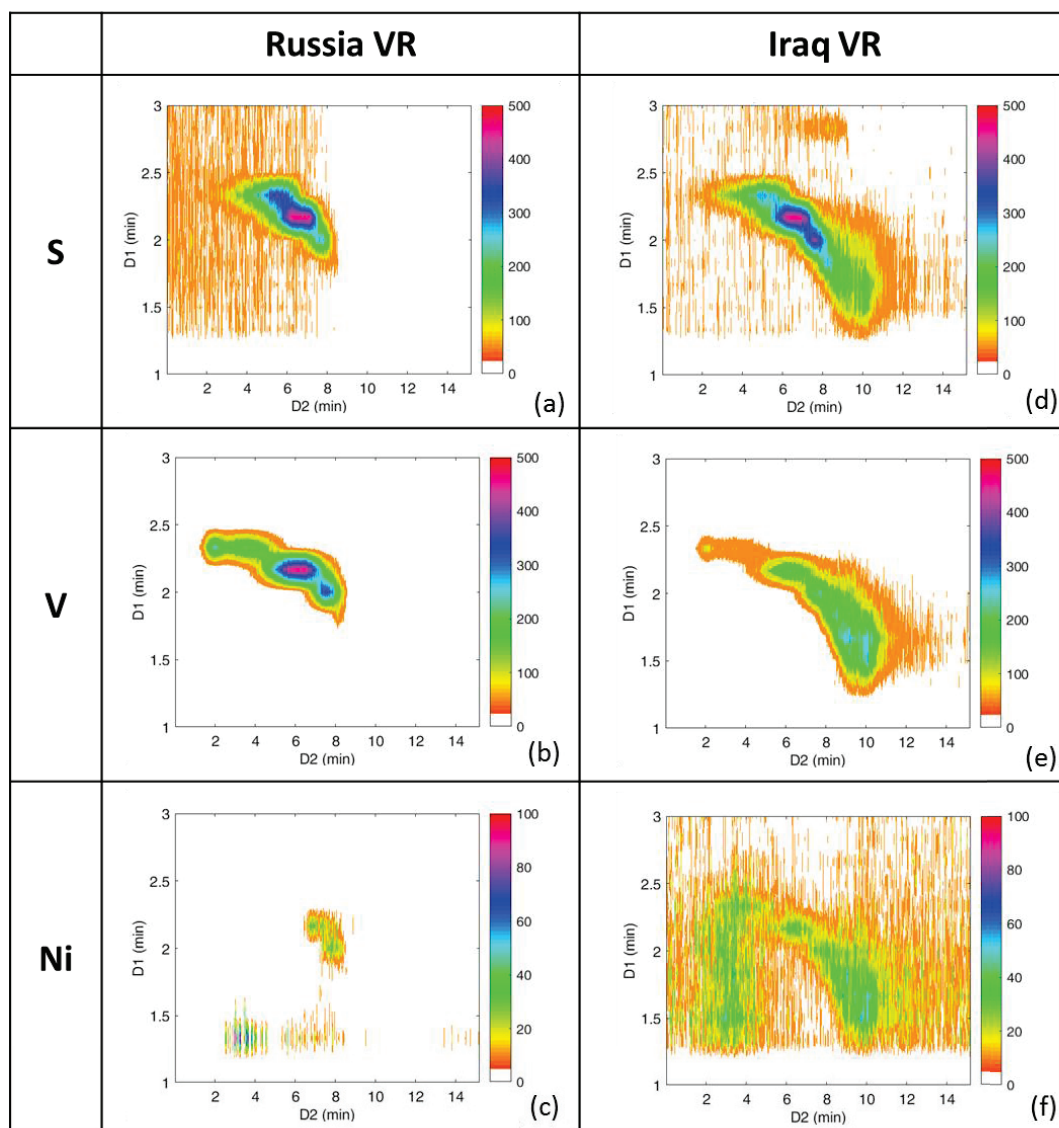


Figure 5: 2D-contour plots of (a, b, c) Russia VR and (d, e, f) Iraq VR obtained in SECxRPLC-ICP-MS/MS with specific detection of (a, d) Sulfur ($^{48}\text{SO}^+$), (b, e) Vanadium ($^{67}\text{VO}^+$), and (c, f) Nickel (^{58}Ni). Conditions given in the experimental section.

Such combination of two LC retention mechanisms in one single analysis was achieved for the first time for the speciation of petroleum samples. As expected from the above results, the contour plots are significantly different depending on the VR origin and on the considered element. Some differences are noticeable in Fig.5: (i) highly hydrophobic compounds with large molecular weights (HMW compounds) seem to be absent in Russia VR (Figs.5a, 5b, and 5c) while well detected in Iraq VR (Figs.5d, 5e, and 5f); (ii) additional information, compared to SEC and RPLC, can be provided by SECxRPLC for the poorly retained peak, detected in RPLC for vanadium (see Fig.4b and related discussion). This peak can only be linked to the spot located at the top left in Figs.5b and 5e and therefore to LMW polar compounds, most probably metalloporphyrins. This statement is also supported by the fact that such compounds does not seem to be present in case of sulfur (Figs.5a and 5b); (iii) more

surprisingly, an unexpected family of nickel compounds (Figs.5c and 5f) emerged in SECxRPLC. Those are poorly retained in SEC (HMW) but also in RPLC (non-hydrophobic compounds), suggesting the presence of HMW polar compounds in the specific case of nickel. This family of nickel compounds, not detected for any of the two other elements, clearly demonstrates the high degree of orthogonality between the two dimensions which makes RPLCxSEC much more informative than SEC alone, RPLC alone or even the two separation techniques successively considered.

In order to make an even better use of the potential of RPLCxSEC, 2D-contour plots were divided into different several regions. A highly concentrated sample (atmospheric residue from Venezuela) was chosen as relevant reference to delimit the regions for the three elements (Fig.6).

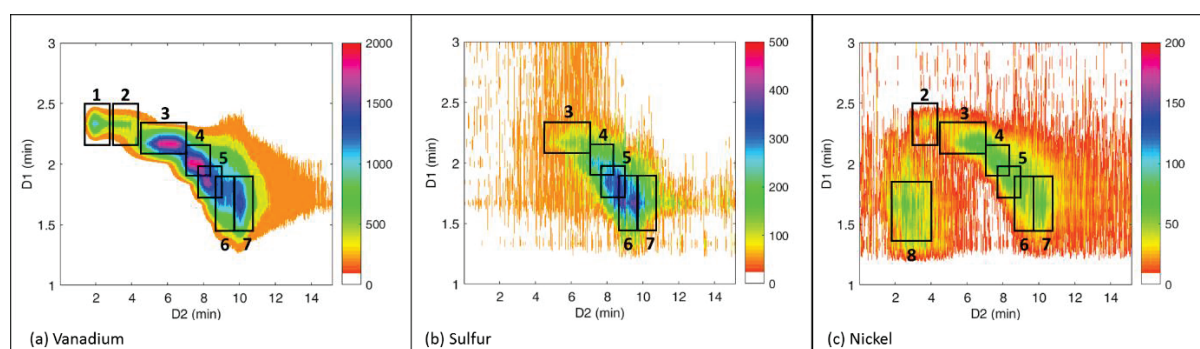


Figure 6: 2D-contour plots of an atmospheric residue (Venezuela AR) in SECxRPLC-ICP-MS/MS with specific detection of (a) Vanadium ($^{67}\text{VO}^+$), (b) Sulfur ($^{48}\text{SO}^+$), and (c) Nickel (^{58}Ni). 8 regions are delimited by 8 frames numbered #1 to #8. Conditions given in the experimental section.

8 regions, delimited by 8 frames in Fig.6, were selected from the fact that they contained distinct spots and hence distinct groups of compounds. As can be seen, 7 groups (#1 to #7) are common to the three elements. Group #8 corresponds to HMW polar compounds, only observed in case of nickel (Fig.6c) as previously discussed. Group #1 corresponds to LMW compounds (strongly retained in SEC) that are poorly retained in RPLC (polar compounds). Unlike Group #1, Group #7 corresponds to HMW compounds (poorly retained in SEC) that are strongly retained in RPLC (highly hydrophobic compounds). Both groups #1 and #2 were suspected to contain porphyrins compounds [18]. For Groups #3 to #5, SEC retention times decrease while RPLC ones increases, meaning that larger molecules are observed with higher hydrophobicity. Compounds of Groups #6 and #7 are coeluted in SEC while separated in RPLC. Compounds of Group #7 are more retained in RPLC, probably more hydrophobic than those of Group #6. The mask composed of these 8 delimited regions was then used to compare vacuum residues from different origins.

SECxRPLC-ICP-MS/MS was applied to the five vacuum residues of interest, leading to fifteen 2D-contour plots, considering the three elements (Figs.7a to 7o). In these figures, the intensity scale is the same for sulfur and vanadium while 5-fold lower for nickel (colorbar on

the right side of the figures). Differences in the spot intensities are revealed by the contour plots, depending on the origin of the crude oil but also on the element, thereby showing the advantage of analyzing the three elements by speciation within one single run. Same trends than the ones observed in AR are observed for the five VRs analyzed in this section showing the benefit of using the mask described previously.

(i) First of all, Congo VR (Figs.7e, 7j, and 7o) seems different from others VRs, with vanadium and sulfur barely not present in this heavy oil compared to nickel. Whereas in case of nickel (Fig.7o) an intense spot corresponding to Group #8 was detected.

(ii) On the other hand, Saudi Arabia (Figs.7a, 7f, and 7k), Canada (Figs.7c, 7h, and 7m) and Iraq VR (Figs.7d, 7i, and 7n) show comparable 2D-contour plots. Indeed Groups #1 to #8 are all present in those VRs, even if intensities can be slightly variable from a VR to another. For instance Canada VR seems more enriched in vanadium than Iraq and Saudi Arabia VR. As seen for Congo VR, Group #8 is more intense in Saudi Arabia VRs than in other VRs. In case of Canada VR, Group #8 seems shifted to large mass without any change in RPLC retention time compared to other Group #8. Additionally, for nickel 2D-contour plots, Group #2 was detected in Iraq VR (Fig.5n) contrary to others VRs, and Group #1 was not detected regardless of vacuum residues.

(iii) Finally, A significant difference can be pointed out for Russia VR compared to the others. When comparing 2D-contour plots in case of sulfur (Fig.7b) and vanadium (Fig.7g) for Russia VR, large mass, strongly retained in RPLC named Groups #6 and #7, seems to be absent. The total amount of sulfur, in Russia VR, is 27 mg/g, which is far below the sulfur content found in other VRs (42 mg/g for Saudi Arabia VR, 55 mg/g for Iraq VR and 57 mg/g for Canada VR), meaning that speciation analysis brings valuable information regarding the distribution of sulfur content in Russia VR. Such hyphenated technique does not indicate that sulfur compounds are less concentrated for every group compared to the others but highlights the fact that two groups are missing. Such difference for sulfur and vanadium compounds may have a direct impact on conversion efficiency during demetallation processes as the sulfur and vanadium distributions are significantly different from other residues. Additionally, Group #8 appears to be shifted to large mass and to more hydrophobic compounds.

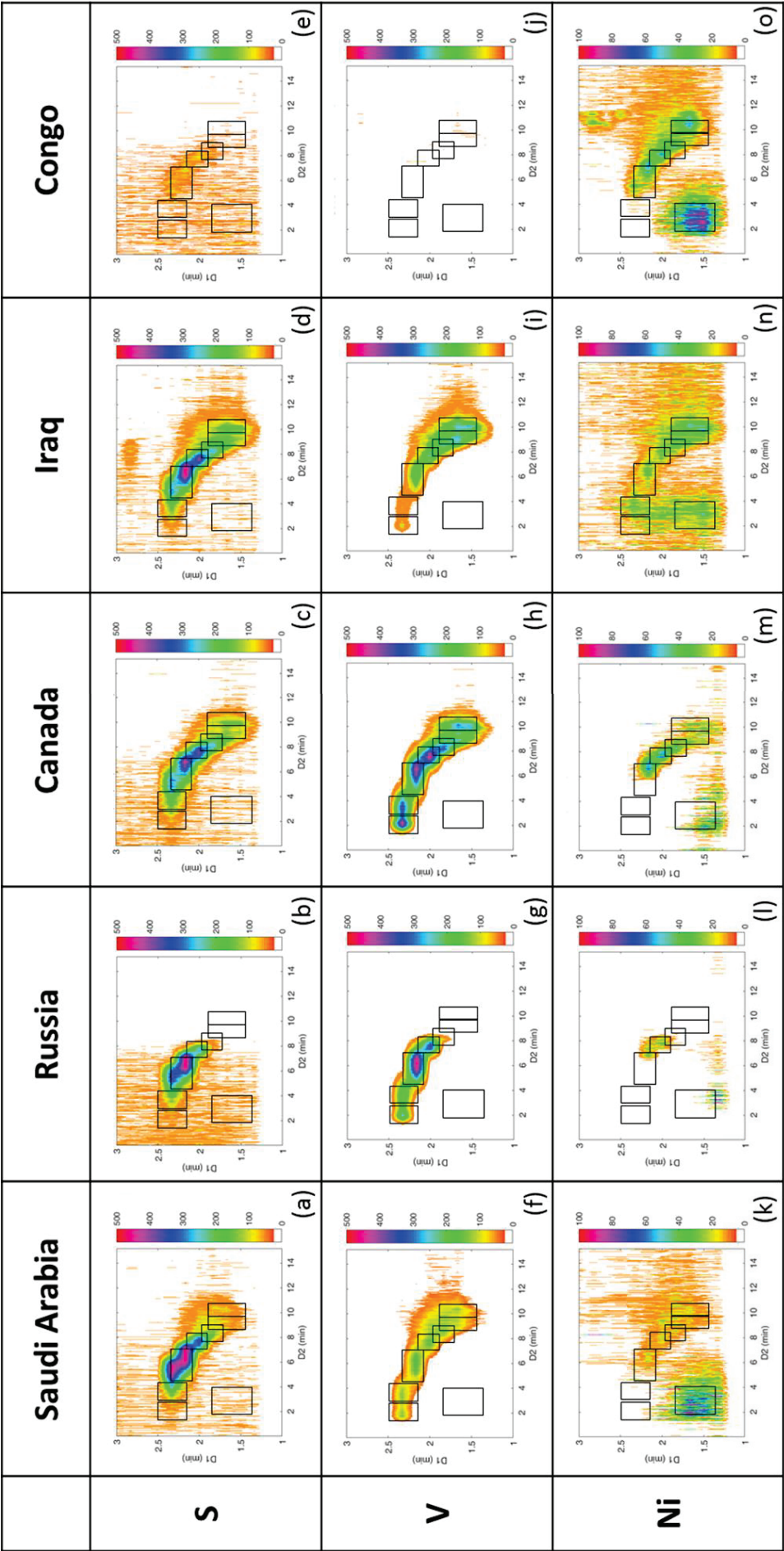


Figure 7: 2D-contour plots of 5 VRs in SECxRPLC-ICP-MS/MS: (a, f, k) Saudi Arabia VR, (b, g, l) Russia VR, (c, h, m) Canada VR, (d, i, n) Iraq VR, (e, j, o) Congo VR with specific detection of (a, b, c, d, e) Sulfur ($^{48}\text{SO}^+$), (f, g, h, i, j) Vanadium ($^{51}\text{VO}^+$) and (k, l, m, n, o) Nickel (^{58}Ni). The mask is defined in Fig. 6. Conditions given in the experimental section.

Particular attention should be worn on the spot corresponding to large mass poorly retained in SEC analysis and poorly retained in RPLC analysis, group #8. Indeed during demetallation processes, conversion efficiency can be really low for residues with high nickel content. The separation of molecules with such properties (low hydrophobicity and high molecular weight) is promising as being able to explain the behavior observed in such VRs. Such information may give additional clues regarding the conversion efficiency in demetallation processes of these vacuum residues.

A large-scale study could be considered in the future to investigate the potentiality to obtain 2D-contour plots fingerprints depending on the world region. Indeed, visual comparisons are made possible with 2D-contour plot masks (black frames), and a specific fingerprint could be then given for each type of vacuum residues, making possible the direct comparison of several samples. Thanks to two-dimensional liquid chromatography coupled to a specific detection new groups of compounds have also been detected, unknown until then. This last observation confirms that 1D-LC alone was not efficient enough to separate such compounds in complex petroleum matrices, and highlights the benefit of coupling two different separation mechanisms. Additionally, for petroleum industry, the comparison of 2D-contour plots of sulfur, vanadium, and nickel distributions, across the refinery processes could be a very interesting tool to have a better understanding of which species are present at each step of the process, and to limit the poisoning of catalysts used in refining units.

Even if successful results were achieved with SECxRPLC coupled to ICP-MS/MS for a qualitative point of view, quantitative analysis were not yet attainable. Indeed, by coupling SEC to RPLC the mobile phase composition in second dimension is continuously changing. A large amount of organic solvent can affect the sensitivity of the detection, as the plasma parameters are optimized for the higher quantity of organic solvent, which only occurs at the end of the elution gradient. To overcome such issue and to realize quantitative analysis in LC-ICP-MS/MS some authors reported the use of a counter-gradient [19,20], but such approach required the use of an additional gradient pump supporting THF solvent in our case, and such system was not available at the time of the study. Others approaches are cited in the literature such as the use of an on-line isotopic dilution [21], unfortunately, this approach is only applied for multi-isotopic element, not relevant in our study. Further work as to be performed to have access to quantitative analysis for petroleum complex matrices in the future.

4. Conclusion

Extensive knowledge on metal speciation is required to optimize demetallation processes of heavy crude oils when converting them into lighter products. As shown, neither SEC alone (separation according to the molecular weight) nor RPLC alone (separation according to molecular hydrophobicity) were efficient enough to draw relevant comparison of heavy crude oils coming from different origins. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography (RPLCxSEC) coupled to ICP-MS/MS, thus combining two retention

mechanisms in one single analysis was achieved for the first time for the speciation of petroleum samples. Five vacuum residues and one atmospheric residue containing a large amount of sulfur, vanadium, and nickel were first separated in SEC. The fractions collected were then separated in RPLC hyphenated to ICP-MS/MS. The visual comparison of the resulting 2D-contour plots was made possible by superimposing a mask composed of 8 frames which have been ascribed to 8 specific groups of compounds. This mask could be built from a much enriched petroleum sample which was selected as reference. By connecting information on molecular weight with information on hydrophobicity, significant differences between petroleum samples from various origins could be highlighted. Russia VR does not contain highly hydrophobic, and large molecules seem missing in its 2D-contour plot. On the other hand, Congo VR has a specific nickel distribution, likely characteristics of the refractory properties. Compounds detected in group #8 may help to develop catalysts suitable for large mass and highly hydrophobic molecules to enhance the demetallation processes. 2D-contour plots obtained by SECxRPLC-ICP-MS/MS used with masks have the potential to fingerprint oil samples according to their origin and for monitoring refining processes in term of metal speciation. Our comparison might allow the petroleum industry to partially understand VR behavior during demetallation and hydrodesulfurization steps, and to identify which families of compounds could lead to low conversion yield. Such an analytical approach could be used in the future for a visual comparison of contour plots of samples at different stage of the process. Furthermore, no pre-fractionation, such SARA method, is required with the developed method and separation can be performed on highly complex petroleum samples.

References

- [1] C.A. Islas-Flores, E. Buenrostro-Gonzalez, C. Lira-Galeana, Fractionation of petroleum resins by normal and reverse phase liquid chromatography, *Fuel*. 85 (2006) 1842–1850. doi:10.1016/j.fuel.2006.02.007.
- [2] S.L. Silva, A.M.S. Silva, J.C. Ribeiro, F.G. Martins, F.A. Da Silva, C.M. Silva, Chromatographic and spectroscopic analysis of heavy crude oil mixtures with emphasis in nuclear magnetic resonance spectroscopy: A review, *Anal. Chim. Acta*. 707 (2011) 18–37. doi:10.1016/j.aca.2011.09.010.
- [3] F.T. van Beek, R. Edam, B.W.J. Pirok, W.J.L. Genuit, P.J. Schoenmakers, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of heavy oil, *J. Chromatogr. A*. 1564 (2018) 110–119. doi:10.1016/j.chroma.2018.06.001.
- [4] G. Gascon, V. Vargas, L. Feo, O. Castellano, J. Castillo, P. Giusti, S. Acavedo, C.-P. Lienemann, B. Bouyssiere, Size Distributions of Sulfur, Vanadium, and Nickel Compounds in Crude Oils, Residues, and Their Saturate, Aromatic, Resin, and Asphaltene Fractions Determined by Gel Permeation Chromatography Inductively Coupled Plasma High-Resolution Mass Spectrometry, (2017). doi:10.1021/acs.energyfuels.7b00527.
- [5] J.F. Branthaver, Influence of Metal Complexes in Fossil Fuels on Industrial Operations, in: *Met. Complexes Foss. Fuels*, 1987: pp. 188–204.
- [6] S. Gutiérrez Sama, C. Barrère-Mangote, B. Bouyssièrre, P. Giusti, R. Lobinski, Recent trends in element speciation analysis of crude oils and heavy petroleum fractions, *TrAC Trends Anal. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.trac.2017.10.014.
- [7] F.G. Wandekoken, C.B. Duyck, T.C.O. Fonseca, T.D. Saint’Pierre, Method for the quantification of vanadyl porphyrins in fractions of crude oils by High Performance Liquid Chromatography–Flow Injection–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 119 (2016) 1–9. doi:10.1016/j.sab.2016.03.001.
- [8] A.M. McKenna, J.M. Purcell, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Identification of Vanadyl Porphyrins in a Heavy Crude Oil and Raw Asphaltene by Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry, *Energy Fuels*. 23 (2009) 2122–2128. doi:10.1021/ef800999e.
- [9] J.G. Speight, *Handbook of Petroleum Product Analysis: Speight/Handbook of Petroleum Product Analysis*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2014. doi:10.1002/9781118986370.
- [10] G. Caumette, C.-P. Lienemann, I. Merdrignac, B. Bouyssièrre, R. Lobinski, Fractionation and speciation of nickel and vanadium in crude oils by size exclusion chromatography-ICP MS and normal phase HPLC-ICP MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1123–1129. doi:10.1039/C003455J.

- [11] G. Caumette, LC-ICP MS coupling (Liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry) for the speciation analysis of metals in heavy petroleum, Thesis, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2009.
- [12] A. Desprez, B. Bouyssiere, C. Arnaudguilhem, G. Krier, L. Vernex-Loiset, P. Giusti, Study of the Size Distribution of Sulfur, Vanadium, and Nickel Compounds in Four Crude Oils and Their Distillation Cuts by Gel Permeation Chromatography Inductively Coupled Plasma High-Resolution Mass Spectrometry, (2014). doi:10.1021/ef500571f.
- [13] G. Gascon, J. Negrin, V. Garcia-Montoto, S. Acevedo, C.-P. Lienemann, B. Bouyssiere, Simplification of Heavy Matrices by Liquid–Liquid Extraction: Part I—How to Separate LMW, MMW, and HMW Compounds in Maltene Fractions of V, Ni, and S Compounds, *Energy Fuels*. 33 (2019) 1922–1927. doi:10.1021/acs.energyfuels.8b03974.
- [14] S. Acevedo, K. Guzmán, H. Labrador, H. Carrier, B. Bouyssiere, R. Lobinski, Trapping of Metallic Porphyrins by Asphaltene Aggregates: A Size Exclusion Microchromatography With High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection Study, *Energy Fuels*. 26 (2012) 4968–4977. doi:10.1021/ef3002857.
- [15] M.R. Gray, R.R. Tykwinski, J.M. Stryker, X. Tan, Supramolecular Assembly Model for Aggregation of Petroleum Asphaltenes, *Energy Fuels*. 25 (2011) 3125–3134. doi:10.1021/ef200654p.
- [16] O.P. Strausz, T.W. Mojelsky, E.M. Lown, The molecular structure of asphaltene: an unfolding story, *Fuel*. 71 (1992) 1355–1363. doi:10.1016/0016-2361(92)90206-4.
- [17] P. Zuo, S. Qu, W. Shen, Asphaltenes: Separations, structural analysis and applications, *J. Energy Chem*. 34 (2019) 186–207. doi:10.1016/j.jechem.2018.10.004.
- [18] M. Bernardin, A. Le Masle, F. Bessueille-Barbier, C.-P. Lienemann, S. Heinisch, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the characterization of sulfur, vanadium and nickel compounds in petroleum products, (2019), in press.
- [19] A.S. Pereira, M. Schelfaut, F. Lynen, P. Sandra, Design and evaluation of a multi-detection system composed of ultraviolet, evaporative light scattering and inductively coupled plasma mass spectrometry detection for the analysis of pharmaceuticals by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1185 (2008) 78–84. doi:10.1016/j.chroma.2008.01.030.
- [20] T. Górecki, F. Lynen, R. Szucs, P. Sandra, Universal Response in Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Anal. Chem*. 78 (2006) 3186–3192. doi:10.1021/ac060078j.
- [21] G. Koellensperger, S. Hann, J. Nurmi, T. Prohaska, G. Stingeder, Uncertainty of species unspecific quantification strategies in hyphenated ICP-MS analysis, *J. Anal. At. Spectrom*. 18 (2003) 1047–1055. doi:10.1039/B302565A.

CONCLUSIONS

La chromatographie liquide bidimensionnelle couplée à l'ICP-MS/MS permet l'analyse et la comparaison d'échantillons d'origines différentes. Ces travaux ont permis de montrer que la chromatographie liquide unidimensionnelle fournit un niveau d'information qui n'est pas suffisant étant donné la complexité de ces matrices et qui doit être amélioré à l'aide d'outils plus performants. Le couplage de deux dimensions de séparation, SEC et RPLC, a permis de lier les deux informations fournies par ces deux mécanismes de rétention. Il est en effet possible, grâce à la méthode développée dans cette thèse, d'avoir à la fois des informations concernant le poids moléculaire des espèces présentes mais aussi d'en connaître davantage sur le caractère hydrophobe de ces composés. Les résidus sous vide, issus du pétrole, employés au cours de ces travaux n'ont subi aucun fractionnement ou prétraitement et sont donc d'une grande complexité. L'obtention de cartographies 2D permet la comparaison visuelle d'échantillons d'origines géographiques différentes. L'utilisation de « masques » sur chacune de ces cartographies a permis de séparer huit familles de composés que l'on retrouve dans le cas du soufre, du vanadium et du nickel. Des différences significatives ont pu être observées inter-éléments ou inter-échantillons. Certaines familles de composées (classées de 1 à 8) n'étant pas présentes dans les cinq résidus sous vide analysés. Il pourrait être intéressant d'étendre ce type de comparaisons à un plus grand nombre d'échantillons, dans le but d'évaluer si en fonction des origines géographiques des coupes lourdes du pétrole des profils similaires sont observés.

RÉFÉRENCES

- [1] C.A. Islas-Flores, E. Buenrostro-Gonzalez, C. Lira-Galeana, Fractionation of petroleum resins by normal and reverse phase liquid chromatography, *Fuel*. 85 (2006) 1842–1850. doi:10.1016/j.fuel.2006.02.007.
- [2] S.L. Silva, A.M.S. Silva, J.C. Ribeiro, F.G. Martins, F.A. Da Silva, C.M. Silva, Chromatographic and spectroscopic analysis of heavy crude oil mixtures with emphasis in nuclear magnetic resonance spectroscopy: A review, *Anal. Chim. Acta*. 707 (2011) 18–37. doi:10.1016/j.aca.2011.09.010.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les recherches effectuées au cours de ces travaux de thèse ont permis le développement d'un nouveau couplage analytique (SECxRPLC-ICP-MS/MS) pour l'analyse par spéciation des métaux et hétéroatomes, présents dans le pétrole et ses fractions.

Tout d'abord, le développement de l'interface de couplage entre la chromatographie liquide bidimensionnelle et la détection spécifique nous est apparu être un point faible majeur. Dans la littérature, les auteurs ne donnent que très peu d'informations pour justifier leur choix quant à l'interface de couplage sélectionnée, celle-ci étant parfois peu ou pas du tout décrite. Pourtant, nous avons pu montrer que seul un très petit nombre de nébuliseurs et chambres de nébulisation, commercialement disponibles, semblent adaptés au couplage de la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) et de l'ICP-MS/MS. Un montage réalisé avec deux détecteurs en série (UV et ICP-MS/MS) a permis de comparer directement les variances générées par différents systèmes d'introduction d'échantillon. A travers la comparaison de 31 systèmes différents, il a été montré que seule l'interface composée d'un nébuliseur PFA-LC et d'une chambre de nébulisation IsoMist thermostatée, sont compatibles avec un système UHPLC (6 μL^2 de dispersion additionnelle) et par conséquent ne dégrade pas la séparation obtenue en amont de la détection. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que les systèmes préconisés par les fournisseurs sont rarement adaptés à des séparations UHPLC pour de la spéciation.

D'autre part, l'introduction de grandes quantités de solvants organiques dans le plasma étant très problématique, la réduction de la quantité introduite a été envisagée via l'utilisation d'un diviseur de débit en amont de la détection. Certains nébuliseurs fonctionnant en consommation totale nécessitent en effet de très faibles débits (quelques $\mu\text{L}/\text{min}$). Des nébuliseurs micro-concentriques quant à eux ne tolèrent que quelques centaines de $\mu\text{L}/\text{min}$. Ces travaux ont permis de montrer l'impact d'un split situé en amont du système d'introduction sur la dispersion totale et la nécessité de choisir judicieusement le rapport de split afin de limiter la contribution de la dispersion extra-colonne à la dispersion totale. Il a été montré qu'un très faible rapport de split (1/50) génère une variance additionnelle d'environ 200 μL^2 , induisant une perte d'efficacité de l'ordre de 90 % (pour une colonne de type UHPLC : 50 x 2.1 mm, 1.7 μm) ainsi, bien sûr, qu'une perte de sensibilité du même ordre. Enfin, des études complémentaires ont permis de statuer sur l'utilisation du connecteur en lien avec le nébuliseur PFA-LC, ainsi que sur l'utilisation de pièces additionnelles vendues avec l'ICP-MS/MS.

L'interface de couplage étant optimisée, le développement a porté sur la sélection des conditions de première et seconde dimension. Au vu de la littérature, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) semblait être une première dimension de choix étant donné la

grande gamme de masse des composés présents dans les échantillons pétroliers. La chromatographie à polarité des phases inversées (RPLC), offrant un mécanisme de rétention complémentaire à la SEC, a également été sélectionnée. L'objectif du couplage était d'obtenir une grande capacité de pics dans un temps d'analyse raisonnable (140 min) tout en maintenant un facteur de dilution peu élevé. Des études théoriques, basées sur une approche Pareto, ont permis de montrer que le couplage de la SECxRPLC-ICP-MS/MS en mode hors-ligne offrait une capacité de pics plus élevée (2600) que le couplage RPLCxSEC-ICP-MS/MS en mode en-ligne (1700).

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une analyse bidimensionnelle intégrale est réalisée, dans le cas de produits pétroliers, avec une détection spécifique des éléments vanadium, nickel et soufre. Cette méthode, appliquée à des fractions SARA du pétrole, a permis de montrer le bénéfice d'une séparation bidimensionnelle comparée à deux séparations unidimensionnelles consécutives. Ce type de couplage permet d'obtenir, en une seule analyse, à la fois une information sur le poids moléculaire, mais aussi sur l'hydrophobie des espèces vanadium, nickel et soufrées présentes. Malheureusement, cette analyse ne peut être à l'heure actuelle rendue quantitative, la réponse du détecteur étant dépendante de la quantité de solvant organique dans le plasma, la quantité variant au cours du gradient d'élution utilisé dans la seconde dimension. Deux méthodes ont été testées pour apporter une solution à ce problème. L'utilisation d'une équation de correction ou d'un contre gradient a été étudiée.

Grâce à cette méthode, plusieurs fractions lourdes du pétrole, d'origines différentes, ont pu être analysées. L'obtention de cartographies 2D a permis une comparaison visuelle de ces échantillons. Pour faciliter la comparaison des cartographies deux à deux, un masque comportant le contour de 8 familles de composés a été utilisé. La superposition du masque et de la cartographie 2D permet ainsi de juger de la présence ou de l'absence d'une des huit familles identifiées. Ceci permet par exemple de remarquer que certaines familles ne sont pas présentes dans les cartographies du soufre, ou encore de noter la présence de familles méconnues à l'heure actuelle dans les cartographies du nickel (composés à haut poids moléculaire et à faible caractère hydrophobe). Ce sont autant d'informations cruciales qui ont pu être fournies aux personnes en charge de la conversion de ces produits lourds, pour leur permettre de mieux comprendre la réactivité de certains pétroles.

Les études présentées dans ce travail permettent d'envisager plusieurs perspectives :

- (i) Les analyses quantitatives ne sont pour l'heure pas envisageables dans le cas du couplage de la RPLC avec l'ICP-MS/MS pour des matrices pétrolières complexes. Des études complémentaires pourraient être menées à la suite de cette thèse dans l'objectif de s'affranchir des contraintes liées au gradient de solvants en seconde dimension. Il serait peut-être intéressant de pouvoir modifier les conditions de plasma au cours du temps et d'obtenir un plasma optimisé quel que soit la teneur

en solvant introduite dans celui-ci. D'autre part, un contre-gradient pourrait être envisagé sous réserve que tous les modules du couplage soient adaptés à la présence de solvant tel que le THF.

- (ii) Les structures moléculaires des huit familles identifiées ne sont pour l'heure pas connues. Un couplage en parallèle de l'ICP-MS/MS, avec un spectromètre de masse en sortie la chromatographie liquide, pourrait permettre d'apporter une information moléculaire et non plus seulement élémentaire. Ces deux techniques complémentaires pourraient permettre d'obtenir simultanément des informations et d'avancer davantage dans la caractérisation de ces matrices pétrolières.
- (iii) Le potentiel du couplage SECxRPLC-ICP-MS/MS développé dans ce manuscrit a été démontré. Il serait maintenant intéressant d'étendre la gamme d'échantillons analysés, avec comme objectif de pouvoir utiliser cet outil comme moyen de comparaison de l'efficacité d'un procédé. Pour cela des échantillons se situant à différentes étapes de la conversion pourraient être analysés.
- (iv) Enfin, si les échantillons deviennent de plus en plus variés, il sera intéressant d'automatiser la comparaison des contour-plots 2D et de passer à de l'analyse d'images via un outil informatisé.

ANNEXES

ANNEXE 1 : OPTIMISATION DES PARAMETRES DE PLASMA DANS UNE SOLUTION ACETONITRILE POUR DIFFERENTS SYSTEMES D'INTRODUCTION.

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Twinnabar	Micromist		• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 40 • Gaz de nébulisation : 0.60 L/min • Chambre non thermostatée
Twinnabar	PFA-LC		• Sampling depth : 6 mm • Optional gas : 40 % • Gaz de nébulisation : 0.60 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Twinnabar	Burgener	The graph for the Burgener nebulizer shows two y-axes. The left y-axis represents Intensity (cps) from 0 to 3000. The right y-axis represents Taux d'oxyde (%) from 0 to 150,000. The x-axis represents Gas de nébulisation (L/min) from 0 to 1.0. Four data series are plotted: CPS Y (orange circles), CPS Li (blue circles), CPS TI (grey circles), and oxide ratio (yellow circles). Intensity for all three CPS peaks around 0.6 L/min, with CPS TI reaching the highest value (~2800 cps). The oxide ratio peaks at approximately 0.75 L/min (~120,000 %).	• Sampling depth : 6 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.55 L/min • Chambre non thermostatée
Twinnabar	Opalmist	The graph for the Opalmist nebulizer shows two y-axes. The left y-axis represents Intensity (cps) from 0 to 10,000. The right y-axis represents Taux d'oxyde (%) from 0 to 50,000. The x-axis represents Gas de nébulisation (L/min) from 0.1 to 0.9. Four data series are plotted: CPS Li (blue circles), CPS Y (orange circles), CPS TI (grey circles), and oxide ratio (yellow circles). Intensity for all three CPS peaks around 0.6 L/min, with CPS Li reaching the highest value (~8,500 cps). The oxide ratio peaks at approximately 0.7 L/min (~40,000 %).	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.35 L/min • Chambre non thermostatée
Twinnabar	Savillex	The graph for the Savillex nebulizer shows two y-axes. The left y-axis represents Intensity (cps) from 0 to 12,000. The right y-axis represents Taux d'oxyde (%) from 0 to 30,000. The x-axis represents Gas de nébulisation (L/min) from 0 to 0.8. Four data series are plotted: CPS Li (blue circles), CPS Y (orange circles), CPS TI (grey circles), and oxide ratio (yellow circles). Intensity for all three CPS peaks around 0.6 L/min, with CPS Li reaching the highest value (~10,500 cps). The oxide ratio peaks at approximately 0.6 L/min (~25,000 %).	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.40 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Agilent 8800	Micromist		• Sampling depth : 4 mm • Optional gas : 23 % • Gaz de nébulisation : 0.75 L/min • Chambre non thermostatée
Agilent 8800	PFA-LC		• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 20 % • Gaz de nébulisation : 0.55 L/min • Chambre non thermostatée
Agilent 8800	Crossflow		• Sampling depth : 3 mm • Optional gas : 25 % • Gaz de nébulisation : 0.75 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Agilent 8800	Burgener		• Sampling depth : 4 mm • Optional gas : 20 % • Gaz de nébulisation : 0.30 L/min • Chambre non thermostatée
Impact bead	Micromist		• Sampling depth : 6 mm • Optional gas : 35 % • Gaz de nébulisation : 0.65 L/min • Chambre non thermostatée
Impact bead	PFA-LC		• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 35 % • Gaz de nébulisation : 0.60 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Impact bead	Burgener	Graph showing Intensity (cps) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Burgener nebulizer. The intensity for Li, Y, and Tl peaks around 0.8 L/min, while the oxide ratio peaks around 1.1 L/min.	• Sampling depth : 4 mm • Optional gas : 35 % • Gaz de nébulisation : 0.55 L/min • Chambre non thermostatée
Impact bead	Opalmist	Graph showing Intensity (cps) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Opalmist nebulizer. The intensity for Li, Y, and Tl peaks around 0.7 L/min, while the oxide ratio peaks around 0.8 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 35 % • Gaz de nébulisation : 0.55 L/min • Chambre non thermostatée
Spectro Large	Micromist	Graph showing Intensity (cps) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Micromist nebulizer. The intensity for Li, Y, and Tl peaks around 0.8 L/min, while the oxide ratio peaks around 1.2 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.90 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Spectro Large	PFA-LC	Graph showing intensity (cps) and oxide ratio (%) vs nebulization gas flow (L/min) for PFA-LC. The intensity (CPS Li, CPS Y, CPS Tl) peaks around 0.7 L/min. The oxide ratio peaks around 1.1 L/min.	• Sampling depth : 6 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.85 L/min • Chambre non thermostatée
Spectro Large	Burgener	Graph showing intensity (cps) and oxide ratio (%) vs nebulization gas flow (L/min) for Burgener. The intensity (CPS Li, CPS Y, CPS Tl) peaks around 0.7 L/min. The oxide ratio peaks around 1.1 L/min.	• Sampling depth : 6 mm • Optional gas : 40 % • Gaz de nébulisation : 0.70 L/min • Chambre non thermostatée
Spectro Large	Crossflow	Graph showing intensity (cps) and oxide ratio (%) vs nebulization gas flow (L/min) for Crossflow. The intensity (CPS Li, CPS Y, CPS Tl) peaks around 0.7 L/min. The oxide ratio peaks around 1.1 L/min.	• Sampling depth : 10 mm • Optional gas : 40 % • Gaz de nébulisation : 0.90 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Single pass	Micromist	Graph showing Intensity (CPS) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Micromist nebulizer. The intensity for Li (blue), Y (orange), and Ti (grey) peaks around 1.4 L/min, while the oxide ratio (yellow) peaks around 1.6 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 35 % • Gaz de nébulisation : 1.30 L/min • Chambre non thermostatée
Single pass	PFA-LC	Graph showing Intensity (CPS) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the PFA-LC nebulizer. The intensity for Li (blue), Y (orange), and Ti (grey) peaks around 0.8 L/min, while the oxide ratio (yellow) peaks around 0.6 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 40 % • Gaz de nébulisation : 0.75 L/min • Chambre non thermostatée
Single pass	Burgener	Graph showing Intensity (CPS) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Burgener nebulizer. The intensity for Li (blue), Y (orange), and Ti (grey) peaks around 0.6 L/min, while the oxide ratio (yellow) peaks around 0.4 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.50 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Single pass	Crossflow		• Sampling depth : 10 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.90 L/min • Chambre non thermostatée
PC ³	PFA-LC		• Sampling depth : 3 mm • Optional gas : 15 % • Gaz de nébulisation : 0.75 L/min • Chambre thermostatée à -5°C
PC ³	Micromist		• Sampling depth : 3 mm • Optional gas : 20 % • Gaz de nébulisation : 0.65 L/min • Chambre thermostatée à -5°C

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
PC ³	Burgener	Graph showing Intensity (cps) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Burgener nebulizer. The intensity for CPS Li (blue), CPS Y (orange), CPS Ti (grey), and oxide ratio (yellow) is plotted. The intensity peaks around 0.35 L/min, while the oxide ratio peaks around 0.3 L/min.	• Sampling depth : 3 mm • Optional gas : 15 % • Gaz de nébulisation : 0.55 L/min • Chambre thermostatée à -5°C
PC ³	Opalmist	Graph showing Intensity (cps) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Opalmist nebulizer. The intensity for CPS Li (blue), CPS Y (orange), CPS Ti (grey), and oxide ratio (yellow) is plotted. The intensity peaks around 0.35 L/min, while the oxide ratio peaks around 0.3 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 25 % • Gaz de nébulisation : 0.35 L/min • Chambre thermostatée à -5°C
PC ³	Savillex	Graph showing Intensity (cps) and Taux d'oxyde (%) versus Gaz de nébulisation (L/min) for the Savillex nebulizer. The intensity for CPS Li (blue), CPS Y (orange), CPS Ti (grey), and oxide ratio (yellow) is plotted. The intensity peaks around 0.4 L/min, while the oxide ratio peaks around 0.3 L/min.	• Sampling depth : 5 mm • Optional gas : 25 % • Gaz de nébulisation : 0.4 L/min • Chambre thermostatée à -5°C

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Spectro Small	PFA-LC		• Sampling depth : 8 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.85 L/min • Chambre non thermostatée
Spectro Small	Micromist		• Sampling depth : 8 mm • Optional gas : 45 % • Gaz de nébulisation : 0.85 L/min • Chambre non thermostatée
Spectro Small	Burgener		• Sampling depth : 8 mm • Optional gas : 50 % • Gaz de nébulisation : 0.50 L/min • Chambre non thermostatée

Chambre de nébulisation	Nébuliseur	Intensité en fonction du gaz de nébulisation	Paramètres optimisés
Isomist	PFA-LC	The graph displays four data series against gas flow rate (L/min) on the x-axis (0.2 to 1.2). The left y-axis represents intensity in counts per second (cps), ranging from 0 to 80,000. The right y-axis represents the oxide ratio in percentage, ranging from 0 to 5,000. The series are: Cps Li (blue circles), Cps Y (orange circles), Cps Tl (grey circles), and oxide ratio (yellow circles). Cps Li peaks at ~70,000 cps at 0.8 L/min. Cps Y peaks at ~20,000 cps at 0.8 L/min. Cps Tl peaks at ~40,000 cps at 0.8 L/min. The oxide ratio peaks at ~4,000% at 0.8 L/min.	• Sampling depth : 9 mm • Optional gas : 27 % • Gaz de nébulisation : 0.80 L/min • Chambre thermostatée à -2°C
Chambre à consommation totale	PFA-LC	Difficile de faire varier le débit de gaz de nébulisation, car risque d’extinction du plasma important	• Sampling depth : 9 mm • Optional gas : 50 % • Gaz de nébulisation : 0.51 L/min • Chambre non thermostatée