



**HAL**  
open science

# La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase liquide et supercritique : vers une description plus détaillée des mélanges complexes oxygénés et hydrocarbonés

Carole Reymond

## ► To cite this version:

Carole Reymond. La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase liquide et supercritique : vers une description plus détaillée des mélanges complexes oxygénés et hydrocarbonés. Chimie analytique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1177 . tel-03342296

**HAL Id: tel-03342296**

**<https://theses.hal.science/tel-03342296>**

Submitted on 13 Sep 2021

**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 : xxx



## **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 09/10/2020, par :  
**Carole Reymond**

---

# **La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase liquide et supercritique - Vers une description plus détaillée des mélanges oxygénés et hydrocarbonés**

---

Devant le jury composé de :

Cabooter, Deirdre	Professeure associée	Université KU Leuven	Rapporteuse
Veuthey, Jean-Luc	Professeur	Université de Genève	Rapporteur
Salvador, Arnaud	Professeur	Université de Lyon	Examinateur
Waffo-Téguo, Pierre	Professeur	Université de Bordeaux	Examinateur
West, Caroline	Professeure	Université d'Orléans	Examinatrice
Colas, Cyril	Ingénieur de recherche	CNRS	Examinateur
Le Masle, Agnès	Ingénieure de recherche	IFPEN	Examinatrice
Charon, Nadège	Ingénieure de recherche	IFPEN	Directrice de thèse
Falletti, Olivier	Ingénieur de recherche	Arkema	Invité



# **Université Claude Bernard – LYON 1**

Administrateur provisoire de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-Président de la Commission de Recherche

Directeur Général des Services

M. Frédéric FLEURY

M. Hamda BEN HADID

M. Didier REVEL

M. Philippe CHEVALLIER

M. Jean-François MORNEX

M. Pierre ROLLAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Faculté d'Odontologie

Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux

Faculté de Médecine Lyon-Est

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)

Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

Doyenne : Mme Dominique SEUX

Doyenne : Mme Carole BURILLON

Doyen : M. Gilles RODE

Directeur : M. Xavier PERROT

Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)

Département Informatique

Département Mécanique

Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)

Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)

Institut National du Professorat et de l'Éducation

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Observatoire de Lyon

Polytechnique Lyon

UFR Biosciences

UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)

UFR Faculté des Sciences

Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO

Directeur : M. Behzad SHARIAT

Directeur M. Marc BUFFAT

Directeur : M. Gérard PIGNAULT

Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Directeur : M. Christophe VITON

Directrice : Mme Isabelle DANIEL

Directeur : M. Emmanuel PERRIN

Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER

Directeur : M. Yannick VANPOULLE

Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



## **La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase liquide et supercritique - Vers une description plus détaillée des mélanges complexes oxygénés et hydrocarbonés**

Ces travaux de thèse ont porté sur la caractérisation de mélanges complexes oxygénés avec l'étude d'échantillons issus de la biomasse lignocellulosique, et de mélanges complexes hydrocarbonés via l'exemple des coupes lourdes pétrolières. La complexité chimique de ces deux types d'échantillon est propre à chacun et provient de multiples facteurs : i) les produits issus de la transformation de la biomasse lignocellulosique sont constitués de composés oxygénés étendus sur une large gamme de polarité, de masse moléculaire mais aussi de concentration, ii) les coupes lourdes pétrolières possèdent des milliers de constituants hydrocarbonés ainsi que des composés soufrés et azotés. Dans les deux cas, l'objectif de ces travaux de recherche est d'améliorer la connaissance de la composition des échantillons, ce qui est indispensable pour développer des procédés de transformation encore plus performants. Pour atteindre cet objectif, des méthodes séparatives adaptées aux propriétés des échantillons ont été mises en place et couplées à la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). Une méthodologie via l'utilisation de plans d'expériences a été proposée afin d'optimiser l'interface entre la dimension de séparation et la HRMS. Dans le cas des échantillons issus de la biomasse, dans un premier temps, le couplage de la chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée (RPLC) et de la HRMS avec une source electrospray (ESI) et une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) a permis une première description des échantillons. Des expériences de fragmentations successives ont mis en évidence des structures inédites. Par la suite, une méthode de chromatographie bidimensionnelle en ligne (LCxLC) dédiée à l'analyse des composés les plus polaires a été optimisée et couplée à la HRMS. La mobilité ionique (IMS) a également été étudiée afin d'évaluer son intérêt au sein des couplages réalisés. Dans le cas des coupes lourdes pétrolières, une méthode associant la chromatographie de partage centrifuge (CPC) en première dimension, la chromatographie en phase supercritique (SFC) en deuxième dimension couplée à la HRMS avec une source de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) en tant que troisième dimension s'est révélée être une approche pertinente pour quantifier les hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les distillats sous vide. Ce couplage hors-ligne de la CPC à la SFC a permis de construire des cartographies 2D organisées selon le degré d'insaturation et le nombre de cycles aromatiques des composés détectés, reflétant la composition détaillée des échantillons investigués. Pour terminer, les avantages et inconvénients de l'ensemble des méthodes développées au cours de cette thèse ont été discutés. Les spécificités des deux spectromètres de masse utilisés (FT-ICR et timsTOF) sont comparées en termes de résolution, vitesse d'acquisition et mécanismes de fragmentation. Une capacité de pics a été évaluée pour chaque couplage, ce qui a permis de les positionner les uns par rapport aux autres en perspective de la complexité des échantillons, du traitement des données et du besoin analytique.

**Mots clés :** biomasse lignocellulosique, distillat sous vide, chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase supercritique, chromatographie de partage centrifuge, spectrométrie de masse haute résolution, mobilité ionique, couplages multidimensionnels, analyse structurale.

## **Hyphenation of mass spectrometry with liquid and supercritical fluid chromatographies - Towards an in-depth description of complex oxygenated and hydrocarbon samples**

This PhD thesis focused on the characterisation of complex oxygenated samples coming from transformation of lignocellulosic biomass and complex hydrocarbon samples related to heavy petroleum oil cuts. The chemical complexity of these two types of sample is specific to each one and comes from multiple factors: i) lignocellulosic biomass products are made up of oxygenated compounds spread over a wide range of polarity, molecular weight and concentration. Petroleum heavy cuts have thousands of hydrocarbons, sulphur and nitrogen compounds. In both cases, the objective of this research work is to improve the knowledge on the sample composition in order to optimise even more efficiently conversion processes. For this purpose, separation methods adapted to the properties of the samples have been set up and hyphenated with high-resolution mass spectrometry (HRMS). A methodology through the use of experimental designs has been proposed in order to optimise the interface between chromatographic methods and HRMS. In the case of products resulting from biomass conversion, in a first step the hyphenation of reverse phase liquid chromatography (RPLC) with HRMS using electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) sources allowed a first description of the samples. Successive fragmentation experiments revealed novel chemical structures. Thereafter, an on-line two-dimensional (LCxLC) chromatography method dedicated to the analysis of the most polar compounds was optimised and coupled to HRMS. Ion mobility (IMS) was also studied in order to evaluate its interest within the hyphenations carried out. For heavy petroleum cuts, a method combining centrifugal partition chromatography (CPC) as a first dimension, supercritical fluid chromatography (SFC) as a second one coupled with HRMS using atmospheric pressure photo-ionization source (APPI) as a third dimension proved to be a relevant approach for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons vacuum gas oils. This off-line hyphenation of SFC and CPC allowed to get well-organised 2D maps according to the unsaturation level and the number of aromatic rings of the detected compounds, reflecting the detailed composition of the samples. Finally, the advantages and disadvantages of all the methods developed during this PhD were discussed. The special features of the two mass spectrometers used (FT-ICR and timsTOF) are compared in terms of resolution, acquisition speed and fragmentation mechanisms. A peak capacity was evaluated for each hyphenated method, which allowed to position them against each other in terms of sample complexity, data processing and analytical requirement.

**Keywords:** lignocellulosic biomass, vacuum gas oil, liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, centrifugal partition chromatography, high-resolution mass spectrometry, ion mobility, multidimensional hyphenations, structural analysis.



# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Deirdre Cabooter et Jean-Luc Veuthey d'avoir accepté de rapporter ces travaux de thèse. Je remercie également l'ensemble des membres du jury à savoir Arnaud Salvador, Pierre Waffo-Téguo, Caroline West ainsi qu'Olivier Falletti.

J'adresse mes remerciements à Cécile Barrère-Tricca, Nathalie Schildknecht et Jérémie Ponthus de m'avoir fait confiance et permis de réaliser ma thèse au sein de la direction Physique et Analyse. Je remercie particulièrement Jérémie pour son soutien pendant ces trois années.

Mes remerciements les plus chaleureux vont naturellement à mes encadrants et directrice de thèse. Nadège, ma directrice (mais finalement aussi encadrante), tu as su me pousser à toujours aller plus loin, à approfondir, à représenter, traiter les données dans tous les sens possibles et inimaginables pour en faire ressortir le meilleur. Ton optimisme à toute épreuve m'a permis de persévérer même dans les moments difficiles. Mille mercis à Cyril, sûrement une des personnes les plus compétentes que je connaisse et que j'ai eu la chance d'avoir comme encadrant. Ta culture scientifique m'a toujours épaté ! Malgré la distance, tu as toujours été disponible pour suivre l'avancement de ma thèse, répondre à toutes mes questions, sans parler des corrections des articles et manuscrit. Enfin, Agnès, ma dernière encadrante et pas des moindres. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Bien plus qu'un soutien, tu t'es parfois (souvent) battue pour la réussite de ma thèse. Dommage qu'on n'ait finalement pas eu à faire ce voyage à Orléans avec la SFC dans ta voiture ;) De toutes les compétences que tu m'as transmises, je citerai cette capacité à mettre en valeur et en lumière mes résultats. Encore une fois, merci à vous trois.

Je remercie l'ensemble du pôle 3, en particulier Alexandra pour ton aide en spectrométrie de masse, mais aussi tes élans de motivation. Merci également à Sophie pour toutes les manip qu'on a faites ensemble ainsi qu'à Romain pour les sauvetages en LC. Bien évidemment, un énorme merci à Hanane et Naima (malgré votre abandon du pôle 3). Sans vous ces trois années auraient été bien tristes. Je vous remercie pour votre aide dans le labo, mais surtout pour toutes les discussions, histoires sans fin et fous rires qu'on a eus ensemble. Les pauses-café avec vous vont me manquer !

Je remercie Pascal Duchêne, Abdelaziz Faraj, Luc Davy et Benoit Celse pour leur aide que ce soit pour le traitement des données, la construction de plans d'expériences ou la compréhension des procédés.

Je remercie ensuite mes co-bureaux : Alexis, Lina, Anne-Charlotte et Joël. Je tiens à remercier particulièrement Alexis avec qui j'ai pu avoir des discussions à n'en plus finir. Je pense que j'aurais pu présenter ta thèse et toi la mienne ;) Notre publication en témoigne. Merci à tous les thésards et ex-thésards que j'ai eu la chance de connaître : Laurianne, David, Angélique, Johan, Damien, Adrien, Paul, Ana Teresa, Julien, Marie, Maxime, Alexandre, Etienne, Clément, ...

Je réserve mes derniers remerciements à mes proches. Tout d'abord à mes amis que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés le jour de ma soutenance : Marie, Mélou, Julie, Adrien et Jen. Merci à mes parents, Nicole et Philippe, de m'avoir soutenu pendant toutes ces années d'études (peut-être pour devenir pâtissière un jour ;) ) Merci à Julien et Marie, mais aussi à Mathis qui arrive à me détendre avec sa petite tête d'ange ! Je remercie également Chantal, René et Eloïse.

Merci Valentin pour ton soutien pendant ces trois années.



# Communications

---

Ces travaux ont fait l'objet de cinq publications scientifiques publiées dans des revues à comité de lecture :

- A rational strategy based on experimental designs to optimize parameters of a liquid chromatography-mass spectrometry analysis of complex matrices, *Talanta* (2019)  
C. Reymond, A. Le Masle, C. Colas, N. Charon
- Characterization of liquid-liquid extraction fractions from lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2020)  
C. Reymond, A. Dubuis, A. Le Masle, C. Colas, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon
- On-line two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for the separation of carbohydrates from lignocellulosic biomass, *Journal of Chromatography A* (2020)  
C. Reymond, A. Le Masle, C. Colas, N. Charon
- Input of an Off-Line, Comprehensive, Three-Dimensional Method (CPC×SFC/HRMS) to Quantify Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vacuum Gas Oil, *Analytical Chemistry* (2020)  
C. Reymond, A. Le Masle, C. Colas, N. Charon
- A three-dimensional semi-quantitative method to monitor the evolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from vacuum gas oil feedstocks to lighter products, *Fuel* (2021)  
C. Reymond, A. Le Masle, C. Colas, N. Charon

Ces travaux ont été présentés dans les congrès suivants :

- SEP 2019 (Paris, France), Flash Poster, « Le couplage LC/HRMS<sup>n</sup> : de l'optimisation par plans d'expériences à l'élucidation structurale - Application à une matrice complexe issue de paille de blé »
- HPLC 2019 (Milan, Italie), Communication orale, « Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass products based on a chemometric optimized LC-UV/HRMS<sup>n</sup> method »
- HTC 2020 (Ghent, Belgique), Communication orale, « High potential of a three dimensional approach (CPC×SFC/HRMS) analyse HPAH in vacuum gas oil »



# Sommaire

---

<b>ABREVIATIONS PRINCIPALES</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>CHAPITRE 1 – CONTEXTE ET ETAT DE L’ART</b> .....	<b>- 15 -</b>
1. INTRODUCTION.....	- 17 -
2. LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE .....	- 17 -
2.1. <i>Composition</i> .....	- 17 -
2.2. <i>Conversion</i> .....	- 19 -
2.3. <i>L’analyse moléculaire de matrices ex-biomasse dans la littérature</i> .....	- 19 -
2.4. <i>Conclusion de l’état de l’art et problématique</i> .....	- 26 -
3. LES COUPES PETROLIERES LOURDES .....	- 26 -
3.1. <i>Contexte</i> .....	- 26 -
3.2. <i>Conversion des distillats sous vide par hydrocraquage</i> .....	- 27 -
3.3. <i>L’analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans la littérature</i> .....	- 29 -
3.4. <i>Conclusion de l’état de l’art et problématique</i> .....	- 33 -
4. LE COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE .....	- 34 -
4.1. <i>Généralités</i> .....	- 34 -
4.2. <i>Couplage LC/MS : spécificités et problématiques</i> .....	- 36 -
4.3. <i>Le couplage de la spectrométrie de masse avec la LC versus la SFC</i> .....	- 41 -
4.4. <i>Les plans d’expériences pour l’optimisation de méthode</i> .....	- 43 -
4.5. <i>Traitement, exploitation et visualisation des données multidimensionnelles</i> .....	- 44 -
4.6. <i>Conclusion</i> .....	- 48 -
5. CONCLUSION DU CHAPITRE .....	- 48 -
<b>OBJECTIF ET METHODOLOGIE DE LA THESE</b> .....	<b>- 51 -</b>
<b>CHAPITRE 2 – PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>- 57 -</b>
1. INTRODUCTION.....	- 59 -
2. MATERIAUX.....	- 59 -
2.1. <i>Échantillons</i> .....	- 59 -
2.2. <i>Molécules modèles</i> .....	- 61 -
2.3. <i>Solvants</i> .....	- 64 -
3. INSTRUMENTATION ET METHODES .....	- 65 -
3.1. <i>Analyse de mélanges issus de la biomasse</i> .....	- 65 -
3.2. <i>Analyse de mélanges hydrocarbonés</i> .....	- 71 -
4. TRAITEMENT DES DONNEES .....	- 74 -
4.1. <i>Création et exploitation des plans d’expériences</i> .....	- 74 -
4.2. <i>Visualisation des données MS</i> .....	- 74 -
4.3. <i>Obtention d’une liste de formules brutes associées à un temps de rétention</i> .....	- 74 -
4.4. <i>Exploitation des spectres de fragmentation</i> .....	- 75 -
<b>CHAPITRE 3 – METHODOLOGIE D’OPTIMISATION DU COUPLAGE LC/HRMS PAR PLANS D’EXPERIENCES ...</b> -	<b>77 -</b>
1. INTRODUCTION.....	- 79 -

2.	METHODOLOGIE POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'IONISATION ET DE DESOLVATATION .....	- 80 -
3.	ADAPTATION DES CONDITIONS LC POUR LE COUPLAGE.....	- 82 -
3.1.	<i>Dispersion liée au split entre la LC et la HRMS.....</i>	- 83 -
3.2.	<i>Position de la source d'ionisation.....</i>	- 86 -
3.3.	<i>Impact des additifs.....</i>	- 87 -
4.	PLANS D'EXPERIENCES COMPOSITES CENTRES POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS DES SOURCES ESI ET APCI.....	- 90 -
5.	APPLICATION DES METHODES OPTIMISEES A UNE HUILE DE PYROLYSE .....	- 97 -
6.	CONCLUSION .....	- 101 -
<b>CHAPITRE 4 – COUPLAGE RPLC-UV/HRMS<sup>N</sup> POUR CARACTERISER DES ECHANTILLONS DE BIOMASSE PRE-FRACTIONNES .....</b>		<b>- 103 -</b>
1.	INTRODUCTION.....	- 105 -
2.	PRESENTATION RPLC-UV/HRMS DES ECHANTILLONS DE BIOMASSE AQUEUX .....	- 106 -
3.	FRACTIONNEMENT PAR EXTRACTIONS LIQUIDE-LIQUIDE SUCCESSIVES .....	- 107 -
4.	CARACTERISATION DES FRACTIONS PAR RPLC/HRMS <sup>N</sup> .....	- 108 -
4.1.	<i>Fraction aqueuse 3.....</i>	- 110 -
4.2.	<i>Fraction organique 2.....</i>	- 113 -
4.3.	<i>Fraction organique 3.....</i>	- 114 -
4.4.	<i>Fraction aqueuse 1.....</i>	- 116 -
5.	INTERET ET FIABILITE DES BASES DE DONNEES .....	- 123 -
5.1.	<i>Présentation des plateformes.....</i>	- 124 -
5.2.	<i>Exemples d'application.....</i>	- 128 -
6.	CONCLUSION .....	- 131 -
<b>CHAPITRE 5 – COUPLAGE RPLC×RPLC/HRMS EN LIGNE ET MOBILITE IONIQUE POUR L'ANALYSE DES OLIGOMERES DE SUCRES.....</b>		<b>- 135 -</b>
1.	INTRODUCTION.....	- 137 -
2.	NATURE DES SUCRES D'INTERET .....	- 138 -
3.	DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE EN LIGNE RPLC×RPLC/HRMS .....	- 139 -
3.1.	<i>Choix des phases stationnaire et mobile en première dimension (D1).....</i>	- 140 -
3.2.	<i>Choix de la phase stationnaire en seconde dimension (D2).....</i>	- 143 -
3.3.	<i>Dimensionnement de la méthode LC×LC .....</i>	- 144 -
3.4.	<i>Application de la méthode optimisée.....</i>	- 149 -
4.	GAIN APORTE PAR LE COUPLAGE RPLC×RPLC/HRMS EN COMPARAISON A LA RPLC/HRMS.....	- 151 -
5.	INTERET DE LA MOBILITE IONIQUE EN TANT QUE 3EME OU 4EME DIMENSION.....	- 153 -
5.1.	<i>Couplage RPLC/IMS/HRMS et comparaison à la RPLC×RPLC/HRMS.....</i>	- 153 -
5.2.	<i>Pour aller plus loin, la RPLC×RPLC/IMS/HRMS.....</i>	- 159 -
6.	CONCLUSION .....	- 161 -
<b>CHAPITRE 6 – COUPLAGE CPC, SFC ET HRMS POUR LA QUANTIFICATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES COUPES PETROLIERES LOURDES.....</b>		<b>- 163 -</b>
1.	INTRODUCTION.....	- 165 -
2.	DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE CPC×SFC/HRMS .....	- 167 -
2.1.	<i>Optimisation de la séparation SFC/HRMS .....</i>	- 167 -
2.2.	<i>La chromatographie de partage centrifuge en tant que première dimension.....</i>	- 172 -
3.	DES CARTOGRAPHIES 2D ORGANISEES .....	- 175 -
4.	LA CPC×SFC/HRMS, UNE METHODE QUANTITATIVE .....	- 180 -
4.1.	<i>Évaluation des effets de matrice.....</i>	- 180 -
4.2.	<i>Taux de récupération des échantillons.....</i>	- 181 -
4.3.	<i>Méthodologie pour quantifier les hydrocarbures aromatiques alkylés.....</i>	- 182 -

5.	APPLICATION DE LA METHODE CPC×SFC/HRMS A PLUSIEURS DSV .....	- 185 -
5.1.	<i>Description des cartographies</i> .....	- 185 -
5.2.	<i>Quantification des HAP dans les DSV</i> .....	- 187 -
5.3.	<i>Composés soufrés et azotés</i> .....	- 191 -
6.	SUIVI DE LA CONCENTRATION DES HAP AU COURS DES PROCEDES DE CONVERSION .....	- 192 -
6.1.	<i>Suivi de l'unité avec un débit de recycle nul</i> .....	- 193 -
6.2.	<i>Suivi de l'unité avec un débit de recycle non nul</i> .....	- 194 -
7.	CONCLUSION .....	- 196 -
<b>CHAPITRE 7 – LES METHODES MULTIDIMENSIONNELLES, UNE COURSE A LA RESOLUTION .....</b>		<b>- 199 -</b>
1.	INTRODUCTION.....	- 201 -
2.	DES ECHANTILLONS AVEC UNE COMPLEXITE VARIEE .....	- 202 -
3.	LE DEVELOPPEMENT DE METHODES MULTIDIMENSIONNELLES EN REPONSE A LA COMPLEXITE .....	- 203 -
3.1.	<i>La chromatographie en phase liquide bidimensionnelles en ligne versus hors-ligne</i> .....	- 204 -
3.2.	<i>La spectrométrie de masse haute résolution, une nécessité</i> .....	- 208 -
3.3.	<i>Vers des couplages à trois et quatre dimensions avec la mobilité ionique</i> .....	- 216 -
4.	POUVOIR RESOLUTIF DES COUPLAGES ET INTERETS .....	- 220 -
4.1.	<i>Pouvoir résolutif des couplages réalisés</i> .....	- 220 -
4.2.	<i>Besoin et intérêt d'une grande résolution</i> .....	- 222 -
5.	ÉCHANTILLONS COMPLEXES : VERS UN DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE ET UN TRAITEMENT DES DONNEES COMPLEXES...	- 223 -
5.1.	<i>Du développement analytique au traitement de données multidimensionnelles</i> .....	- 223 -
5.2.	<i>Perspectives pour l'analyse structurale</i> .....	- 224 -
6.	CONCLUSION .....	- 229 -
<b>CONCLUSIONS GENERALES.....</b>		<b>- 231 -</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>		<b>- 235 -</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>- 239 -</b>
1.	ANNEXES CHAPITRE 3 .....	- 240 -
2.	ANNEXES CHAPITRE 4 .....	- 241 -
3.	ANNEXES CHAPITRE 5 .....	- 245 -
4.	ANNEXES CHAPITRE 6 .....	- 247 -



# Abréviations principales

---

ABPR	Régulateur de contre-pression
ACN	Acétonitrile
ANOVA	Analyse de la variance
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
API	Source d'ionisation à pression atmosphérique
APPI	Photo-ionisation à pression atmosphérique
BPC	<i>Base peak chromatogram</i>
CCD	Pan centré composite
CID	Fragmentation induite par collision
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
D1	Première dimension
D2	Seconde dimension
D3	Troisième dimension
DAD	Détecteur à barrette de diodes
DBE	Nombre d'insaturations
DCM	Dichlorométhane
DC-VGO	Distillat sous vide provenant d'un procédé de conversion
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSV	Distillat sous vide
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
EIM	<i>Extracted ion mobilogram</i>
ESI	Electrospray
FA	Acide formique
FT-ICR/MS	Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GC×GC	Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle
H/C	Nombre d'atomes d'hydrogène sur nombre d'atomes de carbone
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HEPT	Heptane
HDT	Hydrotraitement
HCK	Hydrocraquage
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile
HPAEC	Chromatographie d'échange d'anions
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
IE	Energie d'ionisation
IMS	Spectrométrie de mobilité ionique
IPA	Isopropanol
K	Coefficient de partage
LC	Chromatographie en phase liquide
LCC	Complexe lignine-carbohydrate

LC×LC	Chromatographie en phase liquide bidimensionnelle
LLE	Extraction liquide-liquide
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MeOH	Méthanol
m/m	Proportions massiques
MM	Mélange modèle
MS	Spectrométrie de masse
MTBE	Méthyl <i>tert</i> -butyl éther
NARP	Chromatographie à polarité de phase inversée en milieu non-aqueux
nC	Nombre d'atomes de carbone
NPLC	Chromatographie en phase normale
O/C	Nombre d'atomes d'oxygène sur nombre d'atomes de carbone
PA	Affinité protonique
PGC	Phase stationnaire en carbone graphite
Q	Quadripôle
RPLC	Chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée
S/B	Signal sur bruit
SARA	Saturé, aromatique, résine, asphaltène
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SFC	Chromatographie en phase supercritique
SPE	Extraction sur phase solide
SRVGO	Distillat sous vide de distillation directe
THF	Tétrahydrofurane
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
TOF	Temps de vol
TOL	Toluène
U.A.	Unité arbitraire
UCO	Charge non convertie
UV	Ultraviolet
v/v	Proportions volumiques

# Liste des figures

FIGURE 1 : PRINCIPAUX COMPOSANTS ET STRUCTURES DE LA LIGNOCELLULOSE [5].....	- 18 -
FIGURE 2 : SPECTRES DE MASSE D'UNE BIO-HUILE OBTENUS EN (A) ESI NEGATIF, (B) APCI NEGATIF, (C) ESI POSITIF ET (D) APCI POSITIF [22] .....	- 20 -
FIGURE 3 : DIAGRAMME DE VAN KREVELEN REPRESENTANT L'ANALYSE ESI-FT-ICR/MS D'UNE HUILE DE PYROLYSE DE MISCANTHUS EN MODE NEGATIF SANS ADDITIF (CERCLES JAUNES) ET EN MODE POSITIF AVEC DE L'ACETATE DE SODIUM (CERCLES BLEUS) [26] -	- 21 -
FIGURE 4 : TIC OBTENU EN ESI NEGATIF APRES SEPARATION RPLC D'UN ECHANTILLON D'HERBE PRETRAITE PAR ORGANOSOLV ET CHROMATOGRAMMES DES IONS EXTRAITS POUR 3 FAMILLES DE COMPOSES (LIGNINE MONOMERIQUE, DIMERIQUE ET COMPLEXE LIGNINE-SUCRE) ET IDENTIFICATIONS ASSOCIEES [ADAPTEE DE [38]] .....	- 22 -
FIGURE 5 : EXEMPLES DE FRAGMENTATION D'UN SUCRE ET NOMENCLATURE ASSOCIEE [73] .....	- 24 -
FIGURE 6 : FRAGMENTATION MS <sup>2</sup> DE L'OLIGOMERE GALA5 EN ESI- [64] .....	- 25 -
FIGURE 7 : PRINCIPALES COUPES PETROLIERES OBTENUES APRES DISTILLATIONS ATMOSPHERIQUE ET SOUS VIDE ASSOCIEES AUX TEMPERATURES D'EBULLITION, NOMBRES D'ATOMES DE CARBONE ET D'ISOMERES .....	- 27 -
FIGURE 8 : SCHEMA DES PROCEDES D'HYDROCRAQUAGE EN UNE ET DEUX ETAPES .....	- 27 -
FIGURE 9 : MECANISMES D'HYDROCRAQUAGE D'UNE PARAFFINE [84] .....	- 28 -
FIGURE 10 : MECANISME DE FORMATION DES HAP SELON SULLIVAN <i>ET AL.</i> [85] .....	- 29 -
FIGURE 11 : CHROMATOGRAMMES D'UN GAZOLE LOURD (NOIR) ET DE DEUX EFFLUENTS HYDROTRAITES (GRIS) OBTENUS EN NPLC AVEC UNE DETECTION UV A 254 NM [93].....	- 30 -
FIGURE 12 : CHROMATOGRAMMES UV D'UNE FRACTION ENRICHIE ET PAUVRE EN SOUFRE POUR UNE CHARGE D'HYDROCRAQUAGE (GAUCHE) ET UN ECHANTILLON PARTIELLEMENT HYDROTRAITE (DROITE) [96] .....	- 30 -
FIGURE 13 : IMPACT DE LA NATURE DU DOPANT EN APPI POSITIF SUR LES AIRES DES IONS [M] <sup>++</sup> DE 14 HAP [120] .....	- 32 -
FIGURE 14 : COMPARAISON (A) DU NOMBRE TOTAL DE COMPOSES DETECTES ET (B) DU NOMBRE DE COMPOSES DETECTES AU SEIN DE CHAQUE FAMILLE CHIMIQUE AVEC ET SANS PREFRACTIONNEMENT D'UN PETROLE BRUT [113] .....	- 33 -
FIGURE 15 : ZONES DE MASSES MOLECULAIRES ET DE POLARITES ADAPTEES A CHACUNE DES TROIS PRINCIPALES SOURCES D'IONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE [132] .....	- 35 -
FIGURE 16 : LOGARITHME DE LA REPONSE RELATIVE DES COMPOSES A 10 μM PAR RAPPORT AU METHANOL (INJECTION EN FLUX CONTINU (FIA) DANS DIFFERENTS SOLVANTS) [136] .....	- 38 -
FIGURE 17 : DIAGRAMME DE PHASES DU CO <sub>2</sub> EN BLEU ET POUR DES MELANGES CO <sub>2</sub> /MeOH EN VERT [153] .....	- 41 -
FIGURE 18 : CLASSIFICATION DE PHASES STATIONNAIRES PAR LA METHODE LSER (INTERACTIONS E : π-π ; S : DIPOLE-DIPOLE ; A : HYDROGENES AVEC ACIDES ; B : HYDROGENES AVEC BASES ; V : DISPERSIVES (DIPOLE INDUIT), D <sup>+</sup> ET D <sup>-</sup> : IONIQUES) [154] .	- 42 -
FIGURE 19 : CONFIGURATIONS DES INTERFACES SFC/MS COMMERCIALES.....	- 43 -
FIGURE 20 : (A) OPTIMISATION CONSISTANT A FAIRE VARIER UNE VARIABLE A LA FOIS (POINTS RONDS). LE POINT REMPLI CORRESPOND A L'OPTIMUM DETERMINE TANDIS QUE L'ETOILE CORRESPOND AU REEL OPTIMUM (B) CONCEPTION D'UN PLAN COMPOSITE CENTRE [163] .....	- 44 -
FIGURE 21 : NOMBRE DE FORMULES BRUTES POSSIBLES AVEC ET SANS LES 7 REGLES MISES EN PLACE EN FONCTION DE LA MASSE MESUREE POUR 1200 MOLECULES CHOISIES ALEATOIREMENT (TOLERANCE DE 3 PPM EN MASSE ET ± 5% D'ERREUR SUR L'INTENSITE DE L'ISOTOPE) [172] .....	- 46 -
FIGURE 22 : NOMBRE DE CANDIDATS EN FONCTION DU TYPE D'ACQUISITION MS REALISE [173] .....	- 47 -
FIGURE 23 : LES TROIS AXES DE LA METHODOLOGIE DE CETTE THESE .....	- 53 -
FIGURE 24 : AGENCEMENT DES CHAPITRES DE CETTE THESE .....	- 54 -
FIGURE 25 : PROVENANCE DES ECHANTILLONS ISSUS DE LA CONVERSION DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE ANALYSES AU COURS DE CETTE THESE .....	- 59 -
FIGURE 26 : SCHEMA DE L'UNITE D'HYDROCRAQUAGE .....	- 61 -
FIGURE 27 : SCHEMA DU LTQ/FT-ICR/MS (SOURCE : THERMOFISHER SCIENTIFIC) .....	- 67 -
FIGURE 28 : FONCTIONNEMENT DU BOOSTER (SCHEMA REALISE PAR LA SOCIETE SPECTROSWISS) .....	- 68 -
FIGURE 29 : SCHEMA DU TIMS/TOF (SOURCE : BRUKER).....	- 69 -

FIGURE 30 : ILLUSTRATION DU TIMS (SOURCE : BRUKER) .....	- 70 -
FIGURE 31 : COLONNE CPC [176] .....	- 72 -
FIGURE 32 : ETAPES D'UNE ANALYSE CPC EN MODE DESCENDANT .....	- 72 -
FIGURE 33 : CONFIGURATION DE L'INTERFACE SFC/HRMS .....	- 73 -
FIGURE 34 : INTERFACE NARP/HRMS .....	- 74 -
FIGURE 35 : PARAMETRES INCLUS DANS LE PLAN D'EXPERIENCES (EN ROUGE) ET CEUX OPTIMISES EN AMONT (EN VIOLET) POUR LA SOURCE ESI .....	- 81 -
FIGURE 36 : METHODOLOGIE D'OPTIMISATION DU COUPLAGE LC/HRMS PAR PLANS D'EXPERIENCES.....	- 82 -
FIGURE 37 : MONTAGE POUR CALCULER LES DISPERSIONS A PLUSIEURS RATIOS DE SPLIT .....	- 83 -
FIGURE 38 : RATIO DE SPLIT MESURE EXPERIMENTALEMENT VERSUS RATIO DE SPLIT THEORIQUE .....	- 85 -
FIGURE 39 : POURCENTAGE DE PLATEAUX THEORIQUES RESTANTS EN FONCTION DU RATIO DE SPLIT .....	- 86 -
FIGURE 40 : IMPACT DE LA POSITION DE LA SOURCE D'IONISATION APCI (GAUCHE) ET ESI (DROITE) EN MODE NEGATIF POUR QUATRE MOLECULES MODELES.....	- 86 -
FIGURE 41 : IMPACT DE L'ACIDE FORMIQUE, DE L'HYDROXYDE D'AMMONIUM ET DU FORMIATE D'AMMONIUM SUR LES AIRES DES IONS [M-H] <sup>-</sup> DES QUATRE MOLECULES EN ESI ET APCI NEGATIF .....	- 87 -
FIGURE 42 : IMPACT DE L'ACIDE FORMIQUE SUR LA FORMATION DES IONS [M-H] <sup>-</sup> ET [M+HCOO] <sup>-</sup> EN APCI NEGATIF POUR (A) L'ACIDE SYRINGIQUE ET (B) L'ACIDE VANILLIQUE .....	- 89 -
FIGURE 43 : IMPACT DE (A) L'ACIDE FORMIQUE, (B) HYDROXYDE ET (C) FORMIATE D'AMMONIUM SUR LES AIRES DES IONS [M+H] <sup>+</sup> DES QUATRE MOLECULES MODELES EN APCI POSITIF .....	- 89 -
FIGURE 44 : IMPACT (A) DE L'HYDROXYDE ET (B) FORMIATE D'AMMONIUM SUR LE TYPE D'IONS FORME PAR LE SYRINGOL EN APCI POSITIF .....	- 90 -
FIGURE 45 : VALEURS PREDITES EN FONCTION DES VALEURS EXPERIMENTALES AVEC (A) UN MODELE QUADRATIQUE AVEC INTERACTIONS (B) UN MODELE LINEAIRE AVEC INTERACTIONS ET (C) UN MODELE LINEAIRE SANS INTERACTIONS DANS LE CAS DE LA REPONSE DE L'ACIDE VANILLIQUE EN APCI NEGATIF.....	- 94 -
FIGURE 46 : VALEURS PREDITES EN FONCTION DES VALEURS EXPERIMENTALES AVEC UN MODELE QUADRATIQUE AVEC INTERACTIONS TRIPLES DANS LE CAS DE LA REPONSE DE L'ACIDE VANILLIQUE EN APCI NEGATIF .....	- 94 -
FIGURE 47 : SURFACE DE REPONSE DE LA TENSION DU CAPILLAIRE DE TRANSFERT EN FONCTION DE SA TEMPERATURE POUR L'ACIDE VANILLIQUE EN APCI NEGATIF (LES GAZ NEBULISANT, SECHANT ET LA TEMPERATURE DU FOUR TUBULAIRE SONT FIXES A 30 U.A., 20 U.A. ET 350°C).....	- 95 -
FIGURE 48 : DESIRABILITES INDIVIDUELLES DE CHAQUE COMPOSE MODELE DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES EN APCI NEGATIF. - 96 -	- 96 -
FIGURE 49 : IMPACT DE LA MODIFICATION DES PARAMETRES DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES SUR LA FONCTION DE DESIRABILITE GLOBALE, L'ACIDE VANILLIQUE ET LE 4-HYDROXYBENZALDEHYDE.....	- 96 -
FIGURE 50 : CHROMATOGRAMMES UV A 254 NM (EN ROUGE) ET BPC EN ESI NEGATIF (EN BLEU) D'UNE HUILE DE PYROLYSE ... - 97 -	- 97 -
FIGURE 51 : SPECTRES DE MASSE D'UNE HUILE DE PYROLYSE OBTENUS AVEC ET SANS METHODE DE SEPARATION EN AMONT DE LA SOURCE ESI NEGATIF.....	- 98 -
FIGURE 52 : DISTRIBUTION QUALITATIVE DU NOMBRE D'ATOMES D'OXYGENE DES COMPOSES DETECTES EN ESI NEGATIF PAR LC/HRMS (EN BLEU) ET PAR INFUSION (EN ROUGE) .....	- 98 -
FIGURE 53 : DIAGRAMME DE VENN REPRESENTANT LE NOMBRE DE FORMULES BRUTES IDENTIFIEES DANS LES QUATRE MODES D'IONISATION.....	- 100 -
FIGURE 54 : DIAGRAMME DE VAN KREVELEN D'UNE HUILE DE PYROLYSE RAPIDE DE BOIS .....	- 100 -
FIGURE 55 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS EN UV A 254 NM ET EN ESI NEGATIF (TIC) DE DIFFERENTS ECHANTILLONS AQUEUX ISSUS DE LA CONVERSION BIOCHIMIQUE DE BIOMASSES LIGNOCELLULOSIQUES (COLONNE DE TYPE C18, PHASES MOBILES (A) EAU + 0,01% DE FA / (B) MeOH + 0,01% DE FA, GRADIENT DE 1% A 99% DE B ENTRE 4 ET 30 MIN).....	- 106 -
FIGURE 56 : AGRANDISSEMENT DU CHROMATOGRAMME UV A 254 NM DE L'ECHANTILLON B1.....	- 107 -
FIGURE 57 : PROTOCOLE LLE POUR LE FRACTIONNEMENT DES ECHANTILLONS AQUEUX ISSUS DE LA CONVERSION DE LA BIOMASSE - 107 -	- 107 -
FIGURE 58 : CHROMATOGRAMMES UV A 254 NM DE L'ECHANTILLON B1 NON-FRACTIONNE ET DES QUATRE FRACTIONS LLE (COLONNE DE TYPE C18, PHASES MOBILES (A) EAU + 0,01% DE FA / (B) MeOH + 0,01% DE FA, GRADIENT DE 1% A 99% DE B ENTRE 4 ET 30 MIN).....	- 108 -

FIGURE 59 : DIAGRAMME DE VENN REPRESENTANT LE NOMBRE DE FORMULES BRUTES IDENTIFIEES DANS LES DIFFERENTS MODES D'IONISATION. SEULES LES FORMULES BRUTES SONT COMPTABILISEES ICI ; LES ISOMERES N'ONT PAS ETE CONSIDERES. ....	109 -
FIGURE 60 : DIAGRAMME DE VAN KREVELEN REGROUPANT L'ENSEMBLE DES COMPOSES DETECTES POUR LES QUATRE FRACTIONS LLE .-	109 -
FIGURE 61 : (A) DIAGRAMME DE VAN KREVELEN POUR AQ3, (B) DBE EN FONCTION DE LA MASSE MOLECULAIRE ET (C) PERTES OBSERVEES EN ESI NEGATIF EN MS <sup>2</sup> (POINTS ROUGE) ET DE MS <sup>3</sup> A MS <sup>7</sup> (POINTS AVEC UN CONTOUR NOIR) .....	112 -
FIGURE 62 : (A) DIAGRAMME DE VAN KREVELEN POUR ORG2, (B) DBE EN FONCTION DE LA MASSE MOLECULAIRE ET (C) PERTES EN MS <sup>2</sup> ET MS <sup>3</sup> OBSERVEES EN ESI POSITIF. ....	114 -
FIGURE 63 : (A) DIAGRAMME DE VAN KREVELEN POUR ORG3, (B) DBE EN FONCTION DE LA MASSE MOLECULAIRE ET (C) PERTES EN MS <sup>2</sup> (POINTS ROUGES) ET DE MS <sup>3</sup> A MS <sup>6</sup> (POINTS AVEC UN CONTOUR NOIR) OBSERVEES EN ESI NEGATIF. ....	115 -
FIGURE 64 : DIAGRAMME DE VAN KREVELEN POUR AQ1. DES COULEURS ONT ETE UTILISEES POUR DIFFERENCIER LES COMPOSES PEU RETENUS EN RPLC (AVEC MOINS DE 12% DE MeOH EN PHASE MOBILE EN ORANGE ET VERT) DE CEUX ELUES PLUS TARD (NOIR ET GRIS). LES DETECTIONS EN MODES POSITIF ET NEGATIF ONT EGALEMENT ETE DIFFERENCIEES.....	117 -
FIGURE 65 : DBE DES COMPOSES IDENTIFIES DANS AQ1 EN FONCTION DE LEUR MASSE MOLECULAIRE (EN BLEU : LES COMPOSES ELUES AVEC MOINS DE 12% DE MeOH EN RPLC ; EN NOIR CEUX ELUES AVEC PLUS DE 12%) .....	117 -
FIGURE 66 : PERTES OBSERVEES SUITE A LA FRAGMENTATION CID (MS <sup>2</sup> A MS <sup>7</sup> ) EN ESI NEGATIF DE AQ1 .....	119 -
FIGURE 67 : BPC OBTENU EN ESI NEGATIF POUR AQ1 ET DIAGRAMME DE VAN KREVELEN ASSOCIE AVEC EN ROUGE LES PICS ANNOTES SUR LE BPC .....	119 -
FIGURE 68 : FRAGMENTATION CID DU COMPOSE B EN ESI NEGATIF ET POSITIF. L'INTENSITE RELATIVE DE CHAQUE FRAGMENT EST INDIQUEE ENTRE PARENTHESES. ....	120 -
FIGURE 69 : FRAGMENTATION CID DES COMPOSES A, C ET D EN ESI NEGATIF. L'INTENSITE RELATIVE DE CHAQUE FRAGMENT EST INDIQUEE ENTRE PARENTHESES. ....	121 -
FIGURE 70 : SPECTRES DE FRAGMENTATION MS <sup>2</sup> DES COMPOSES A, B ET Γ.....	122 -
FIGURE 71 : STRATEGIES POUR L'EXPLOITATION AUTOMATISEE DE SPECTRES DE FRAGMENTATION .....	123 -
FIGURE 72 : SCORE 1 (EN ORANGE, « METFRAG »), SCORE 2 (EN MARRON, « SPECTRALSIMILARITY »), SCORE 3 (EN VERT, « EXACTSPECTRALSIMILARITY ») ET SCORE FINAL (EN BLEU) POUR LES CANDIDATS ISSUS DE L'INTERROGATION DE LA BASE DE DONNEES PUBCHEM VIA L'OUTIL METFRAG SUR LES DONNEES MS ET MS <sup>2</sup> DE L'ACIDE VANILLIQUE .....	126 -
FIGURE 73 : SPECTRES MS <sup>2</sup> PREDITS PAR CFM-ID EN MODE NEGATIF POUR L'ACIDE VANILLIQUE A TROIS ENERGIES (A) 10, (B) 20 ET (C) 40 V.....	126 -
FIGURE 74 : SPECTRE MS <sup>2</sup> EXPERIMENTAL DE L'ACIDE VANILLIQUE EN ESI NEGATIF.....	127 -
FIGURE 75 : SCHEMATISATION DE LA REDUCTION DU NOMBRE DE DIMENSIONS DU MODELE DE MARKOV UTILISE PAR CFM-ID..-	127 -
FIGURE 76 : COMPARAISON DU SPECTRE EXPERIMENTAL (HAUT) ET DU SPECTRE ISSU DE LA LIBRAIRIE DE CFM-ID (BAS) .....	128 -
FIGURE 77 : CHROMATOGRAMMES OBTENUS LORS DE L'ANALYSE RPLC/HRMS DE L'ECHANTILLON A1 EN ESI POSITIF, ESI NEGATIF ET UV A 210 NM.....	139 -
FIGURE 78 : BPC ENTRE m/z 100-1000 EN ESI NEGATIF AVEC LA COLONNE (A) HYPERCARB ET (B) PLRP-S (SE REFERER AU TABLEAU 25 POUR L'IDENTITE DES PICS LABELISES DE 1 A 8) .....	140 -
FIGURE 79 : EIC DE L'ACIDE SULFURIQUE (± 0,005) AVEC LA COLONNE HYPERCARB POUR TROIS PROPORTIONS DE FA DANS L'EAU ET LE METHANOL.....	141 -
FIGURE 80 : EIC DES HUIT COMPOSES DU TABLEAU 25 OBTENUS AVEC 0,01 ET 0,5% DE FA .....	141 -
FIGURE 81 : BPC ENTRE m/z 50-1000 EN ESI NEGATIF AVEC MeOH, ACN OU IPA + 0,5% DE FA (v/v) COMME PHASE MOBILE ORGANIQUE POUR L'ELUTION DES ANALYTES DE L'ECHANTILLON A1 SUR LA COLONNE HYPERCARB .....	142 -
FIGURE 82 : BPC ENTRE m/z 50-1000 OBTENU EN ESI NEGATIF LORS DE LA SEPARATION DE L'ECHANTILLON A1 VIA LA COLONNE HYPERCARB AVEC UN GRADIENT DE 0 A 99% D'IPA + 0,5% FA (v/v) DE 4 A 30 MIN .....	143 -
FIGURE 83 : BPC ENTRE m/z 50-1000 EN ESI NEGATIF OBTENUS LORS DE L'ANALYSE DE L'ECHANTILLON A1 AVEC SIX COLONNES CHROMATOGRAPHIQUES DIFFERENTES (GRADIENT Eau/MeOH + 0,01% FA). LES RECTANGLES EN POINTILLES NOIRS INDIQUENT LA ZONE D'ELUTION DES COMPOSES D'INTERET.....	144 -
FIGURE 84 : EIC DE (A) LA VANILLINE ET (B) LA SALICINE PREPAREES DANS 50/50 Eau/IPA (v/v) POUR DIFFERENTS VOLUMES D'INJECTION (CONDITIONS : GRADIENT DE 0 A 100% DE MeOH EN 1 MIN AVEC UN DEBIT DE 1,25 ML/MIN) .....	146 -

FIGURE 85 : EIC DE (A) LA VANILLINE ET (B) LA SALICINE PREPAREES DANS 50/50 EAU/IPA (v/v) ET INJECTEES EN SECONDE DIMENSION AVEC PLUSIEURS GRADIENTS EAU/MEOH (CONDITIONS : GRADIENT EN 1 MIN AVEC UN DEBIT DE 1,25 mL/MIN, $V_{INJ}$ 10 $\mu$ L) .....	147 -
FIGURE 86 : EIC DE LA VANILLINE EN ESI NEGATIF AVEC TROIS COMPOSITIONS DE SOLVANT (25, 50 ET 90% D'IPA) INJECTEES VIA LE PASSEUR AUTOMATIQUE (NOIR) OU DES BOUCLES D'ECHANTILLONNAGE DE 20 $\mu$ L (ROUGE) (CONDITIONS : GRADIENT DE 0 A 100% MEOH EN 1 MIN AVEC UN DEBIT DE 1,25 mL/MIN, $V_{INJ}$ 10 $\mu$ L) .....	147 -
FIGURE 87 : BPC DE $m/z$ 50 A 1000 DE L'ECHANTILLON A1 ANALYSE DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES DE PREMIERE DIMENSION ...	148 -
FIGURE 88 : EIC DE LA VANILLINE EN ESI NEGATIF DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES DE LA SECONDE DIMENSION (SOLVANT D'INJECTION : 50% IPA).....	149 -
FIGURE 89 : CHROMATOGRAMME 2D OBTENU LORS DE L'ANALYSE RPLC $\times$ RPLC/HRMS EN ESI NEGATIF DE L'ECHANTILLON A1. LE RECTANGLE EN POINTILLES REPRESENTE LA FENETRE D'ELUTION DES COMPOSES D'INTERET .....	150 -
FIGURE 90 : METHODOLOGIE DE CALCUL DE L'OCCUPATION DE L'ESPACE CHROMATOGRAPHIQUE .....	150 -
FIGURE 91 : EIC DE SIX IONS LISTES DANS LE TABLEAU 25 OBTENUS AVEC LE COUPLAGE (A) RPLC/HRMS ET (B) RPLC $\times$ RPLC/HRMS .....	152 -
FIGURE 92 : SPECTRES DE MASSE OBTENUS LORS DE L'ELUTION DE L'ION $m/z$ 471 EN (A) RPLC/HRMS A 0,85 MIN ET (B) EN RPLC $\times$ RPLC/HRMS A 133 MIN EN D1 ET 8 S EN D2.....	153 -
FIGURE 93 : CARTOGRAPHIE POUR L'ECHANTILLON A1 OBTENUE LORS DU COUPLAGE RPLC/IMS/HRMS REPRESENTANT L'INVERSE DE LA MOBILITE IONIQUE ( $1/K_0$ ) EN FONCTION DU TEMPS DE RETENTION .....	154 -
FIGURE 94 : SPECTRE DE MASSE OBTENU LORS DU COUPLAGE RPLC/IMS/HRMS A UN TEMPS DE RETENTION DE 0,9 MIN ET UN $1/K_0$ DE $0,95\pm 0,018$ V.s/ $cm^2$ .....	154 -
FIGURE 95 : CARTOGRAPHIES REPRESENTANT $1/K_0$ EN FONCTION DU TEMPS DE RETENTION POUR 6 IONS DU TABLEAU 25 DETECTES LORS DU COUPLAGE RPLC/IMS/HRMS.....	155 -
FIGURE 96 : SCHEMA REPRESENTANT LA FRAGMENTATION QUI A LIEU (A) EN AMONT DE L'IMS ET (B) APRES L'IMS .....	156 -
FIGURE 97 : (A) BPC DE L'ECHANTILLON A1 OBTENU LORS DU COUPLAGE RPLC/IMS/HRMS EN ESI NEGATIF, (B) SPECTRE DE MASSE DU PIC CHROMATOGRAPHIQUE A 1,2 MIN, (C) EIC ET (D) EIM DES QUATRE IONS .....	157 -
FIGURE 98 : EIM DES IONS $m/z$ 381 ET 763 ELUANT ENTRE 1,1 ET 1,2 MIN EN RPLC.....	158 -
FIGURE 99 : SPECTRES MS/MS DES IONS (A) $m/z$ 499, (B) $m/z$ 381 ET (C) $m/z$ 321 ELUANT ENTRE 1,1 ET 1,2 MIN EN RPLC -	158 -
FIGURE 100 : CARTOGRAPHIE REPRESENTANT $1/K_0$ EN FONCTION DU RAPPORT $m/z$ POUR LES COMPOSES ELUANT ENTRE 0 ET 5 MIN EN RPLC.....	159 -
FIGURE 101 : CARTOGRAPHIE REPRESENTANT $1/K_0$ EN FONCTION DU RAPPORT $m/z$ POUR LES COMPOSES ELUANT ENTRE 0 ET 205 MIN EN RPLC $\times$ RPLC .....	159 -
FIGURE 102 : (A) SPECTRE DE MASSE D'UN PIC CHROMATOGRAPHIQUE EN RPLC $\times$ RPLC ET (B) EIM DE L'ION $m/z$ 321 .....	160 -
FIGURE 103 : CARTOGRAPHIE $1/K_0$ EN FONCTION DU TEMPS DE RETENTION EN D2 ( $D1 = 126,4$ MIN) OBTENUE LORS DU COUPLAGE RPLC $\times$ RPLC/IMS/HRMS ASSOCIEE AUX SPECTRES MS SOUS LES PICS .....	160 -
FIGURE 104 : TEMPS DE RETENTION (A) DU PYRENE ET (B) DU CORONENE DANS LES DIFFERENTES CONDITIONS SFC .....	168 -
FIGURE 105 : TEMPS DE RETENTION (A) DU PYRENE ET (B) DU CORONENE AVEC LA COLONNE TORUS 2-PIC EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE LA PRESSION DE L'ABPR. ....	168 -
FIGURE 106 : CHROMATOGRAMMES UV A 302 NM OBTENUS AVEC UNE SEPARATION SUR LA COLONNE TORUS 2-PIC A (A) 55°C ET PLUSIEURS PRESSIONS ET (B) A 10,5 MPA ET PLUSIEURS TEMPERATURES .....	169 -
FIGURE 107 : CHROMATOGRAMMES SFC (MAX PLOT ENTRE 250 ET 400 NM) DE (A) DSV 4 ET (B) UCO <sub>1</sub> . LE BLANC (INJECTION DE TOLUENE) EST REPRESENTE EN POINTILLE NOIR. ....	169 -
FIGURE 108 : EIC DES IONS $[M]^{+\bullet}$ DU (A) PYRENE ET (B) CORONENE EN UTILISANT DU TOLUENE (ROUGE) OU DE L'ANISOLE (NOIR) COMME DOPANTS. ....	170 -
FIGURE 109 : SIMULATION DES DEBITS ENTRANT DANS LA SOURCE D'IONISATION POUR (A) UN DEBIT D'ANISOLE DE 100 $\mu$ L/MIN ET (B) 500 $\mu$ L/MIN.....	171 -
FIGURE 110 : AIRE EN SFC/HRMS DU D-PYRENE DANS UNE SOLUTION ETALON (CARRS NOIRS), DANS LES DSV 3 ET 4 ET L'UCO <sub>1</sub> DOPES .....	172 -
FIGURE 111 : PHOTOS DES SYSTEMES SOLVANTS AVEC ET SANS TIERS SOLVANT 30 S APRES L'AGITATION DE CES DERNIERS. ....	174 -

FIGURE 112 : CHROMATOGRAMMES CPC A 254 NM (A) DU DSV 4 ET (B) D'UN MELANGE MODELE. ....	- 175 -
FIGURE 113 : CARTOGRAPHIES CPC×SFC DU DSV 4 EN (A) UV ET (B) EN HRMS.....	- 175 -
FIGURE 114 : CARTOGRAPHIES CPC×SFC DE L'UCO <sub>1</sub> EN (A) UV ET (B) EN HRMS. ....	- 176 -
FIGURE 115 : DBE EN FONCTION DU NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE POUR LES COMPOSES DE TYPE C <sub>x</sub> H <sub>y</sub> DETECTES DANS LE DSV 4. LES ECHELLES DE COULEUR REPRESENTENT LES TEMPS DE RETENTION EN (A) CPC ET (B) SFC ; LA TAILLE DES POINTS CORRESPOND A L'AIRE DES IONS EXTRAITS EN APPI(+). ....	- 177 -
FIGURE 116 : DBE EN FONCTION DU NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE POUR LES COMPOSES DE TYPE C <sub>x</sub> H <sub>y</sub> DETECTES DANS LE DSV 4. L'ECHELLE DE COULEUR REPRESENTE LE TEMPS DE RETENTION EN NARP ; LA TAILLE DES POINTS CORRESPOND A L'AIRE DES IONS EXTRAITS EN APPI(+). ....	- 178 -
FIGURE 117 : CARTOGRAPHIE SPECIFIQUE DES COMPOSES C <sub>x</sub> H <sub>y</sub> DETECTES DANS LE DSV 4 EN APPI(+). LES AIRES COLOREES CORRESPONDENT A DES ZONES AVEC DES DBE DISTINCTS INDIQUES EN HAUT DE CHAQUE RECTANGLE. ....	- 179 -
FIGURE 118 : SCHEMA DE LA METHODE CPC×SFC/HRMS. ....	- 180 -
FIGURE 119 : AIRE EN HRMS DU D-PYRENE DANS UNE SOLUTION ETALON (CARRE NOIR) ET DANS LES DSV 3 ET 4 ET UCO <sub>1</sub> DOPES ET ANALYSES EN SFC/HRMS (ETOILES) ET CPC×SFC/HRMS (RONDS).....	- 181 -
FIGURE 120 : ETALONS DE HAP ALKYLES ETUDIES POUR LA COMPARAISON DES FACTEURS DE REPONSE. ....	- 182 -
FIGURE 121 : SPECTRES DE MASSE DU PYRENE ET DES PYRENES ALKYLES. ....	- 183 -
FIGURE 122 : CARTOGRAPHIES CPC×SFC/HRMS DES SIX DSV ANALYSES. LA ZONE D'ELUTION DES HAP ET COMPOSES SOUFRES EST ENCADREE EN NOIR, CELLE DES COMPOSES AZOTES EST ENCADREE EN ROUGE. ....	- 186 -
FIGURE 123 : CARTOGRAPHIES CPC×SFC/HRMS SPECIFIQUES DES COMPOSES C <sub>x</sub> H <sub>y</sub> DETECTES DANS LES SIX DSV ANALYSES. LES RECTANGLES COLORES CORRESPONDENT AUX ZONES D'ELUTION SELON LE DBE (SE REFERER A LA CARTOGRAPHIE F POUR LA LEGENDE). ....	- 187 -
FIGURE 124 : DBE EN FONCTION DU NC POUR (A) LE DSV 3 ET (B) LE DSV 5 ; LES LIGNES EN POINTILLEES CORRESPONDENT A LA MOYENNE PONDEREE DE NC.....	- 189 -
FIGURE 125 : MOYENNE PONDEREE DU NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE EN FONCTION DU DBE.....	- 190 -
FIGURE 126 : SPECTRES DE MASSE DES PRINCIPAUX COMPOSES APPARTENANT A LA FAMILLE DU PYRENE (DBE 12) DANS LE DSV 6 AVEC UN, DEUX ET TROIS ATOMES DE CARBONE DANS LA CHAINE ALKYLEE. ....	- 190 -
FIGURE 127 : SOMMES DES AIRES EN CPC×SFC/HRMS (A) DES COMPOSES SOUFRES ET (B) AZOTES DANS LES SIX DSV ET COMPARAISON AUX CONCENTRATIONS ELEMENTAIRES. ....	- 192 -
FIGURE 128 : SCHEMA DE L'UNITE D'HYDROCRAQUAGE .....	- 192 -
FIGURE 129 : ÉVOLUTION DES (A) CONCENTRATION DES HAP PAR DBE, (B) MOYENNE PONDEREE DU NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE POUR CHAQUE DBE ET (C) CONCENTRATION EN FONCTION DU NC POUR LE DBE 13 DANS LES VGO 2, HDT-T <sub>0</sub> ET UCO-T <sub>0</sub> *.....	- 193 -
FIGURE 130 : CONCENTRATIONS DES HAP EN FONCTION DU DBE POUR LE VGO 2 ET LES UCO-T <sub>1</sub> * .....	- 195 -
FIGURE 131 : (A) ÉVOLUTION DE LA MOYENNE PONDEREE DU NC POUR CHAQUE DBE ET (B) TENEURS EN HAP EN FONCTION DU NC POUR LE DBE 13 DANS LE VGO 2 ET LES UCO-T <sub>1</sub> * .....	- 196 -
FIGURE 132 : TEMPERATURE AU R2 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES HAP DANS LES UCO-T <sub>1</sub> *.....	- 196 -
FIGURE 133 : DES ECHANTILLONS COMPLEXES VERS DES DEVELOPPEMENTS DE METHODES ANALYTIQUES A PLUSIEURS DIMENSIONS. ....	- 203 -
FIGURE 134 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU BOOSTER DE SPECTROSWISS [SCHEMA REALISE PAR LA SOCIETE SPECTROSWISS].....	- 210 -
FIGURE 135 : COMPARAISON DES MODES MAGNITUDE SANS BOOSTER, MAGNITUDE AVEC BOOSTER ET ADSORPTION AVEC BOOSTER LORS DE L'ANALYSE D'UNE HUILE DE PYROLYSE EN RPLC/FT-ICR/MS.....	- 211 -
FIGURE 136 : COMPARAISON DU NOMBRE DE FORMULES BRUTES IDENTIFIEES PAR TRANCHE DE M/Z DANS LE MODE MAGNITUDE ET DANS LE MODE ADSORPTION AVEC BOOSTER .....	- 211 -
FIGURE 137 : NOMBRE DE FORMULES BRUTES IDENTIFIEES EN FONCTION DU NOMBRE D'ANALYSES SOMMEES .....	- 212 -
FIGURE 138 : COMPARAISON DU BRUIT SUR LES SPECTRES DE MASSE POUR UNE, DEUX ET DIX INJECTIONS EN LC .....	- 213 -
FIGURE 139 : TIC DE L'ECHANTILLON A1 OBTENUS SUR (A) LE TIMSTOF ET (B) LE FT-ICR ET TEMPS MESURE ENTRE DEUX SCANS TOUT DU LONG DE LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE. ....	- 214 -
FIGURE 140 : (A) LARGEUR A MI-HAUTEUR ET (B) RESOLUTION OBTENUES DANS LES CONDITIONS EMPLOYEES SUR LE TIMSTOF ET LE FT-ICR EN MODE MAGNITUDE, ADSORPTION ET ADSORPTION AVEC LE BOOSTER. ....	- 215 -

FIGURE 141 : COMPARAISON DE LA FRAGMENTATION DE L'ION $m/z$ 325,0927 (A) DANS LE LTQ ET (B) DANS UNE CELLULE DE COLLISION .....	216 -
FIGURE 142 : NOMBRE DE PUBLICATIONS REPERTORIEES SUR SCOPUS PAR ANNEE (LES MOTS CLES INDIQUES DANS LA LEGENDE DEVANT ETRE COMPRIS DANS LE TITRE, LE RESUME OU LES MOTS CLES DES ARTICLES). .....	217 -
FIGURE 143 : (A) EIC DE L'ION $m/z$ 381,1052 $\pm$ 0,005, (B) MOBILGRAMME DE CET ION ELUANT A 1,6 MIN ET (C) SPECTRES MS/MS POUR LES COUPLES [ $m/z$ , TEMPS DE RETENTION] ET [ $m/z$ , TEMPS DE RETENTION, MOBILITE] .....	218 -
FIGURE 144 : MOBILGRAMMES DES IONS EXTRAITS (EIM) A PARTIR DU SPECTRE MS ISSU DE L'INTEGRATION DU PIC CHROMATOGRAPHIQUE ENTRE 12,7 ET 12,9 MIN ET DU SPECTRE MS/MS PROVENANT DE LA FRAGMENTATION DE L'ION $m/z$ 325,0926 (LE TRACE DES EIM A ETE REALISE AVEC UNE TOLERANCE DE $m/z \pm 0,005$ ) .....	219 -
FIGURE 145 : CAPACITE DE PICS DES COUPLAGES (HRMS = TIMSTOF) EN FONCTION DE LA CAPACITE DE PICS APPOREE PAR LA CHROMATOGRAPHIE. L'AIRES DES BULLES EST PROPORTIONNELLE AU TEMPS D'ANALYSE.....	223 -
FIGURE 146 : STRATEGIE POUR PASSER D'UNE ANALYSE NON-CIBLEE A UNE ANALYSE CIBLEE VIA LE CRIBLAGE BIOGUIDE OU LES OUTILS STATISTIQUES .....	225 -
FIGURE 147 : RESEAUX MOLECULAIRES OBTENUS A PARTIR D'UN MEME FICHIER MGF ISSU DES DONNEES DE FRAGMENTATION DE L'ECHANTILLON A1 SUR LE TIMSTOF SELON DIFFERENTS (A) SEUILS D'INTENSITE DES IONS FRAGMENTS ET (B) SCORES COSINUS (LA COULEUR DES NŒUDS REPRESENTE LE TEMPS DE RETENTION) .....	227 -
FIGURE 148 : RESEAU MOLECULAIRE OBTENU POUR L'ECHANTILLON A1 AVEC UN SEUIL D'INTENSITE DES IONS MS/MS DE 2000 ET UN SCORE COSINUS MINIMAL DE 0,65 .....	228 -

# Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COMPOSITION DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE EN FONCTION DU TYPE DE RESSOURCE [4] .....	- 18 -
TABLEAU 2 : PRINCIPALES PERFORMANCES DES ANALYSEURS .....	- 36 -
TABLEAU 3 : ENERGIES D'IONISATION DES GAZ API, SOLVANTS LC, DOPANTS ET ENERGIES EMISES PAR LES LAMPES UV [130] ....	- 39 -
TABLEAU 4 : RESUME DES CONDITIONS D'UTILISATION DES 3 SOURCES D'IONISATION .....	- 40 -
TABLEAU 5 : GAMMES DES RATIOS ENTRE ELEMENTS POUR 45000 FORMULES ISSUES DE LA BASE DE DONNEES WILEY ALLANT DE 30 A 1500 Da [172] .....	- 46 -
TABLEAU 6 : PROPRIETES DES DSV ETUDIES .....	- 60 -
TABLEAU 7 : CONDITIONS EXPERIMENTALES LORS DE L'ECHANTILLONNAGE DES PRODUITS HYDROTRAITES ET HYDROCRAQUES .....	- 61 -
TABLEAU 8 : COMPOSITION DES MELANGES DE MOLECULES MODELES MM1 ET MM2 EMPLOYES DANS LE CHAPITRE 3 .....	- 62 -
TABLEAU 9 : COMPOSITION DES MELANGES DE MOLECULES MODELES MM3, MM4 ET MM5 EMPLOYES DANS LE CHAPITRE 4 ..	- 63 -
TABLEAU 10 : COMPOSITION DU MELANGE DE MOLECULES MODELES MM6 EMPLOYE DANS LE CHAPITRE 6.....	- 64 -
TABLEAU 11 : CONDITIONS RPLC×RPLC.....	- 66 -
TABLEAU 12 : CONDITIONS DE DESOLVATION ET D'IONISATION OPTIMISEES POUR LE COUPLAGE RPLC/HRMS AVEC LE LTOQ/FT-ICR/MS.....	- 68 -
TABLEAU 13 : PARAMETRES DE LA SOURCE ESI LORS DU COUPLAGE DU TIMSTOF AVEC LA RPLC ET LA RPLC×RPLC .....	- 71 -
TABLEAU 14 : CONDITIONS CPC .....	- 71 -
TABLEAU 15 : RECAPITULATIF DES PARAMETRES OPTIMISES A CE STADE ET DE CEUX RESTANT A ETRE OPTIMISES VIA LES PLANS D'EXPERIENCES .....	- 90 -
TABLEAU 16 : CCD POUR LES QUATRE MODES D'IONISATION (UA CORRESPOND A DES UNITES ARBITRAIRES).....	- 92 -
TABLEAU 17 : ANOVA DU MODELE QUADRATIQUE POUR L'ACIDE VANILLIQUE EN APCI NEGATIF .....	- 93 -
TABLEAU 18 : CONDITIONS OPTIMISEES POUR LES QUATRE MODES D'IONISATION .....	- 95 -
TABLEAU 19 : EXEMPLES D'ISOMERES PRESENTS DANS UNE HUILE DE PYROLYSE SEPARES ET DETECTES PAR LC/HRMS.....	- 99 -
TABLEAU 20 : FRAGMENTATION DES COMPOSES MODELES DE TYPE ACIDE CARBOXYLIQUE EN ESI NEGATIF .....	- 111 -
TABLEAU 21 : FRAGMENTATION DE COMPOSES AVEC UN pKa > 12 EN ESI POSITIF .....	- 113 -
TABLEAU 22 : FRAGMENTATION DE COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES MODES POSITIF ET NEGATIF .....	- 115 -
TABLEAU 23 : STRUCTURES PROPOSEES PAR METFRAG ET CFM-ID POUR NEUF MOLECULES CONNUES FRAGMENTEES EN ESI NEGATIF - 129 -	- 129 -
TABLEAU 24 : STRUCTURES PROPOSEES PAR METFRAG, CFM-ID ET PAR TRAITEMENT MANUEL DES SPECTRES DE FRAGMENTATION .... - 131 -	- 131 -
TABLEAU 25 : PRINCIPAUX IONS DETECTES DANS L'ECHANTILLON A1 EN ESI NEGATIF ENTRE 0 ET 5 MIN EN RPLC/HRMS.....	- 139 -
TABLEAU 26 : ÉVALUATION DES EFFETS A L'INJECTION : OCCURRENCE DU PHENOMENE DE DEDOUBLEMENT DE PIC (INDIQUE EN ROUGE) SELON LE VOLUME D'INJECTION ( $V_{inj}$ ) ET LE POURCENTAGE D'IPA POUR (A) LA VANILLINE ET (B) LA SALICINE.....	- 146 -
TABLEAU 27 : RESUME DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES BIDIMENSIONNELLES .....	- 149 -
TABLEAU 28 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES METHODES RPLC/IMS/HRMS ET RPLC×RPLC/HRMS .....	- 159 -
TABLEAU 29 : GAMMES DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX ETUDIEES ET VALEURS DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES .....	- 170 -
TABLEAU 30 : TAUX DE RECUPERATION DES ETALONS ANALYSES PAR LA METHODE HORS-LIGNE CPC×SFC/HRMS .....	- 181 -
TABLEAU 31 : QUANTIFICATION DES HAP ALKYLES EN SFC/HRMS VIA LA TETE DE FAMILLE SELON LES METHODES #1 ET #2.....	- 184 -
TABLEAU 32 : QUANTIFICATION DES PYRENES ALKYLES EN SFC-UV VIA LA COURBE D'ETALONNAGE DU PYRENE.....	- 184 -
TABLEAU 33 : PROPRIETES DES DSV ETUDIES .....	- 185 -
TABLEAU 34 : CONCENTRATIONS DES HAP (EN PPM) PAR DBE DANS LES SIX DSV.....	- 188 -
TABLEAU 35 : PARAMETRES EXPERIMENTAUX DU PROCEDE PENDANT L'ECHANTILLONNAGE DES DIFFERENTS PRODUITS HDT ET UCO ... - 193 -	- 193 -
TABLEAU 36 : COMPARAISON DES CAPACITES DE PICS EXPERIMENTALES EFFECTIVES MESUREES EN UV DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES .....	- 206 -
TABLEAU 37 : CONDITIONS EXPERIMENTALES D'UNE METHODE RPLC×RPLC DEVELOPEE PAR LE MASLE ET AL. [30] .....	- 207 -

TABLEAU 38 : COMPARAISON DES LARGEURS DE PICS EN SECONDE DIMENSION ET DES CAPACITES DE PICS EFFECTIVES MESUREES EN UV ET EN MS.....	208 -
TABLEAU 39 : ESTIMATION DES DIFFERENTS FACTEURS CORRECTIFS POUR LE CALCUL DE LA CAPACITE DE PICS EFFECTIVE DES COUPLAGES .....	221 -
TABLEAU 40 : CAPACITES DE PICS THEORIQUES ET EFFECTIVES DES COUPLAGES DEVELOPPES AU COURS DE CETTE THESE .....	222 -

# **Introduction générale**

---

De nos jours **les sciences analytiques sont appelées à caractériser des échantillons de plus en plus complexes**. Par ailleurs, le niveau de détail requis sur la composition des mélanges est toujours plus poussé et amène les scientifiques à utiliser des approches multi-techniques ainsi qu'à développer des **méthodes multidimensionnelles orthogonales**.

Au sein d'IFP Énergies nouvelles, plusieurs procédés sont développés afin de valoriser au maximum les ressources en énergie. Or, l'optimisation de ces procédés de conversion requiert la connaissance de la composition des mélanges produits. Au cours de cette thèse, deux types de mélanges complexes ont été étudiés :

- Le premier type de mélange provient de la conversion de la biomasse lignocellulosique via des procédés thermochimiques et biochimiques en vue de la production de biocarburants ainsi que de molécules plateformes biosourcées. La composition des liquides formés pendant la transformation de la biomasse diffère des produits d'origine fossile et n'est que relativement peu détaillée dans la littérature. **Un des axes de recherche de ces travaux a donc été d'améliorer la caractérisation des échantillons lignocellulosiques.**
- Le second type d'échantillon étudié correspond à des coupes lourdes pétrolières, et plus particulièrement aux distillats sous vide, de température d'ébullition comprise entre 350 et 650°C. Ce type de mélange à haut poids moléculaire n'a que peu de valeur commerciale et nécessite donc d'être converti en produits pétroliers plus légers tels que des essences, des kérosènes ou des gazoles. Bien que cette thématique soit ancienne, aucune méthode ne parvient encore à caractériser de manière quantitative ces échantillons de par les milliers d'analytes qui les constituent. Un focus particulier est accordé à l'analyse d'espèces de hautes masses moléculaires nommées « hydrocarbures polycycliques aromatiques » qui tendent à s'accumuler dans les unités industrielles et constituent actuellement une problématique importante dans le domaine du raffinage pétrolier. **Le second axe de cette thèse a donc consisté à développer une méthodologie de quantification des hydrocarbures polycycliques aromatiques** dans les distillats sous vide.

Dans un premier temps, **le contexte et un état de l'art** autour de la biomasse lignocellulosique et des coupes lourdes pétrolières sont décrits dans le **Chapitre 1** afin d'appréhender au mieux les enjeux et besoins analytiques sur ces deux types de mélanges complexes. Les chromatographies en phases liquide (LC) et supercritique (SFC) couplées à la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) apparaissant comme des solutions pour la caractérisation de nos échantillons, les spécificités et problématiques de leur couplage ainsi que du traitement des données en résultant sont également détaillées. Le **Chapitre 2** présente l'ensemble des équipements, méthodes et échantillons utilisés lors de ces travaux.

Le **Chapitre 3** présente une **méthodologie raisonnée via l'utilisation de plans d'expériences** pour optimiser les conditions de désolvatation et d'ionisation des analytes lors d'un couplage entre la chromatographie et la HRMS.

Les **Chapitres 4 et 5** sont consacrés à la **caractérisation d'échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique**. Plus précisément, le **Chapitre 4** s'attache à la **mise en œuvre d'expériences de fragmentations successives afin de proposer des structures développées** tandis que le **Chapitre 5** a pour **objectif d'améliorer la séparation des composés les plus polaires via la**

**chromatographie bidimensionnelle en ligne.** L'apport de la **mobilité ionique** comme dimension supplémentaire au sein des couplages développés est également discuté dans le Chapitre 5.

Le **Chapitre 6 est dédié au développement et à l'application d'une méthode quantitative pour les hydrocarbures polycycliques aromatiques présents dans les distillats sous vide.**

Pour terminer, le **Chapitre 7 a pour objectif de mettre en perspective l'ensemble des méthodes multidimensionnelles développées dans cette thèse au regard du besoin analytique et de la résolution apportée.** Certaines perspectives en termes de traitement et de valorisation des données acquises sont également discutées.



# **Chapitre 1 – Contexte et état de l'art**

---

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>2. LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE.....</b>	<b>- 17 -</b>
2.1. COMPOSITION.....	- 17 -
2.2. CONVERSION .....	- 19 -
2.3. L'ANALYSE MOLECULAIRE DE MATRICES EX-BIOMASSE DANS LA LITTERATURE .....	- 19 -
2.3.1. <i>Les composés oxygénés</i> .....	- 19 -
2.3.2. <i>Les sucres</i> .....	- 22 -
2.4. CONCLUSION DE L'ETAT DE L'ART ET PROBLEMATIQUE .....	- 26 -
<b>3. LES COUPES PETROLIERES LOURDES .....</b>	<b>- 26 -</b>
3.1. CONTEXTE.....	- 26 -
3.2. CONVERSION DES DISTILLATS SOUS VIDE PAR HYDROCRAQUAGE .....	- 27 -
3.3. L'ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LA LITTERATURE .....	- 29 -
3.4. CONCLUSION DE L'ETAT DE L'ART ET PROBLEMATIQUE .....	- 33 -
<b>4. LE COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....</b>	<b>- 34 -</b>
4.1. GENERALITES .....	- 34 -
4.2. COUPLAGE LC/MS : SPECIFICITES ET PROBLEMATIQUES.....	- 36 -
4.2.1. <i>Influence de la composition de la phase mobile</i> .....	- 37 -
4.2.2. <i>Choix de la géométrie de la colonne chromatographique et débit de la phase mobile</i> .....	- 39 -
4.2.3. <i>Influence des solvants « make-up »</i> .....	- 40 -
4.3. LE COUPLAGE DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE AVEC LA LC VERSUS LA SFC .....	- 41 -
4.3.1. <i>Principe de la SFC</i> .....	- 41 -
4.3.2. <i>Couplage SFC/MS</i> .....	- 42 -
4.4. LES PLANS D'EXPERIENCES POUR L'OPTIMISATION DE METHODE .....	- 43 -
4.5. TRAITEMENT, EXPLOITATION ET VISUALISATION DES DONNEES MULTIDIMENSIONNELLES .....	- 44 -
4.5.1. <i>Traitement des données brutes LC/MS ou SFC/MS</i> .....	- 45 -
4.5.2. <i>Identification des formules brutes</i> .....	- 45 -
4.5.3. <i>Exploitation des données MS<sup>n</sup></i> .....	- 46 -
4.6. CONCLUSION .....	- 48 -
<b>5. CONCLUSION DU CHAPITRE .....</b>	<b>- 48 -</b>

## 1. Introduction

L'augmentation de la consommation mondiale en énergie associée à une diminution des ressources fossiles se traduit à la fois par le développement d'énergies alternatives ainsi que par l'amélioration des technologies existantes liées à l'exploitation des énergies fossiles. L'objectif à court terme n'est pas de remplacer l'intégralité des ressources fossiles par des énergies renouvelables, mais davantage d'atteindre un mix énergétique [1,2].

Au sein de la famille des énergies renouvelables, la biomasse de première génération, à savoir les plantes oléagineuses et plantes sucrières, est d'ores et déjà intégrée à la production d'énergie actuelle notamment sous forme d'éthanol utilisé en complément dans les carburants fossiles [3]. La transformation d'un second type de biomasse, la biomasse lignocellulosique, apparaît également comme une ressource abondante pour la production de carburants et de produits chimiques valorisables [4,5]. Cette biomasse de seconde génération présente l'avantage de ne pas entrer en compétition directe avec les débouchés alimentaires à l'inverse de la biomasse de première génération. Toutefois, sa conversion est plus complexe et demande encore à être optimisée [6–8].

En parallèle, les raffineurs sont face à un challenge triple : (1) l'augmentation de la demande en produits légers, (2) l'augmentation de la part des coupes lourdes dans les pétroles bruts et (3) le durcissement des spécifications des produits [9]. Parmi les procédés permettant de convertir les distillats lourds en coupes plus légères, l'hydrocraquage est l'un des procédés permettant d'obtenir des coupes de grande qualité à haute valeur marchande [10]. Toutefois, au cours de ce dernier, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) se forment et tendent à s'accumuler, entraînant une forte diminution de l'activité des catalyseurs [11].

Les procédés de conversion, à la fois de la biomasse lignocellulosique et des coupes lourdes pétrolières, ne peuvent être optimisés sans une connaissance approfondie des molécules présentes dans les substrats de départ et dans les produits générés (également nommés « effluents » dans la suite de ce document). La caractérisation de ces derniers a pour but d'améliorer la compréhension des phénomènes physico-chimiques impliqués dans les mécanismes de conversion, ainsi que de nourrir des modèles de prédiction. Les sciences analytiques ont donc un rôle-clé dans le succès de ces développements industriels.

Ce chapitre vise dans un premier temps à décrire les deux matrices étudiées au cours de cette thèse et ainsi à soulever les verrous analytiques mis en jeu pour les caractériser. Un état de l'art reprendra les méthodes décrites dans la littérature pour l'analyse moléculaire des matrices issues de la biomasse lignocellulosique et des HAP dans les coupes lourdes pétrolières. Une attention particulière sera portée sur les développements de méthodes multidimensionnelles impliquant la chromatographie en phase liquide ou supercritique et la spectrométrie de masse. Ce chapitre sera clôturé par la description des spécificités et problématiques liées au couplage de ces instruments analytiques.

## 2. La biomasse lignocellulosique

### 2.1. Composition

La lignocellulose est le premier constituant de la matière végétale et ses ressources d'exploitation sont nombreuses et variées : déchets agricoles (paille de céréales, tiges...), déchets de l'exploitation

forestière et de l'industrie du bois ainsi que des cultures dédiées (peuplier, miscanthus...). La biomasse lignocellulosique est composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine en quantités variables selon la ressource (Tableau 1). Elle contient également jusqu'à 10% de substances minérales (cendres, silice...) [4].

Tableau 1 : Composition de la biomasse lignocellulosique en fonction du type de ressource [4]

	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine
<b>Bois dur</b>	40-55 %	24-40 %	18-25 %
<b>Bois tendre</b>	45-55 %	25-35 %	25-35 %
<b>Paille</b>	30-43 %	22-35 %	15-23 %
<b>Herbe</b>	25-40 %	35-50 %	10-30 %

La **structure tridimensionnelle rigide, complexe et très résistante** de ces trois composantes constitue la paroi végétale (Figure 1).

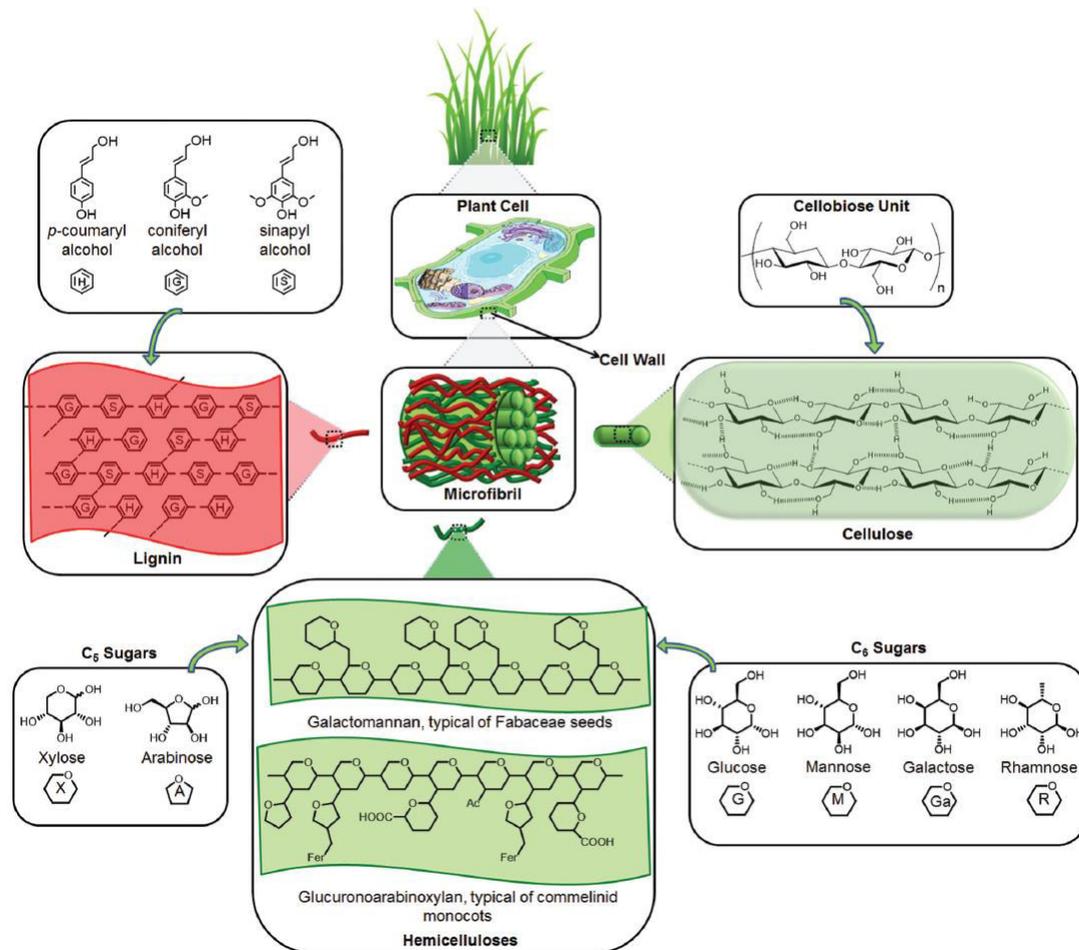


Figure 1 : Principaux composants et structures de la lignocellulose [5]

Le **cellulose** est un polymère composé d'unités de cellobiose correspondant à deux motifs de glucose reliés en position β-(1-4). Par hydrolyse, elle génère des glucoses par la suite fermentables en éthanol. Les **hémicelluloses** sont composées de chaînes linéaires ou ramifiées de différents sucres à 5 (xylose, arabinose) et 6 atomes de carbone (glucose, galactose, mannose, arabinose). Par ailleurs, les extrémités des hémicelluloses sont souvent substituées par des groupements acétyles et des acides tels que les acides glucuroniques et méthyl-glucuroniques ou encore des acides phénoliques comme l'acide férulique. Enfin, la **lignine**, macromolécule aromatique insoluble dans l'eau, est

formée par condensation de monolignols (alcool *p*-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique) non-fermentables [12].

## 2.2. Conversion

La valorisation de la biomasse lignocellulosique peut suivre différentes voies de transformation selon les produits finaux souhaités [7]. On distingue principalement deux voies de conversion : (1) la **conversion thermochimique** avec par exemple la voie *Biomass to Liquid* (BtL) dont l'objectif est de produire des biokérosènes et biogazoles et (2) la **conversion biochimique** dont le but est de produire notamment de l'éthanol [4].

Dans le cas de la conversion thermochimique (pyrolyse, combustion, gazéification), les produits ciblés sont des huiles de pyrolyse ou de liquéfaction et des gaz de synthèse. Ils sont utilisés, soit directement pour la production de vapeur ou d'électricité, soit convertis en biocarburants liquides ou en molécules biosourcées. Dans le cas de la pyrolyse rapide, la biomasse est amenée à des températures comprises entre 400 et 700°C. **L'huile obtenue, aussi appelée bio-huile, est un mélange complexe contenant de nombreuses familles de composés oxygénés** ainsi qu'une quantité importante d'eau (20-25% m/m) [8].

Lors de la conversion de la biomasse lignocellulosique via la filière biochimique, une première étape de prétraitement du substrat est nécessaire afin d'augmenter l'accessibilité de la cellulose aux enzymes d'hydrolyse. Un grand nombre de techniques de prétraitement est reporté dans la littérature (traitement hydrothermique, hydrolyse alcaline, etc.), toutefois la technique la plus répandue demeure l'hydrolyse acide [13]. Cette étape visant essentiellement à hydrolyser et solubiliser les hémicelluloses, produit une **matrice aqueuse constituée essentiellement de sucres simples et oligomériques ainsi que, dans une moindre mesure, de composés de dégradation des sucres (acide acétique, furfural, 5-hydroxyfurfural, etc.) et de molécules de lignine solubles dans l'eau**. Un pouvoir inhibiteur de certains composés formés sur l'hydrolyse enzymatique a déjà été démontré [14]. Suite au prétraitement, la cellulose peut être hydrolysée à l'aide d'enzymes spécifiques puis fermentée par des levures, produisant par exemple de l'éthanol dans le cas de la fermentation alcoolique.

## 2.3. L'analyse moléculaire de matrices ex-biomasse dans la littérature

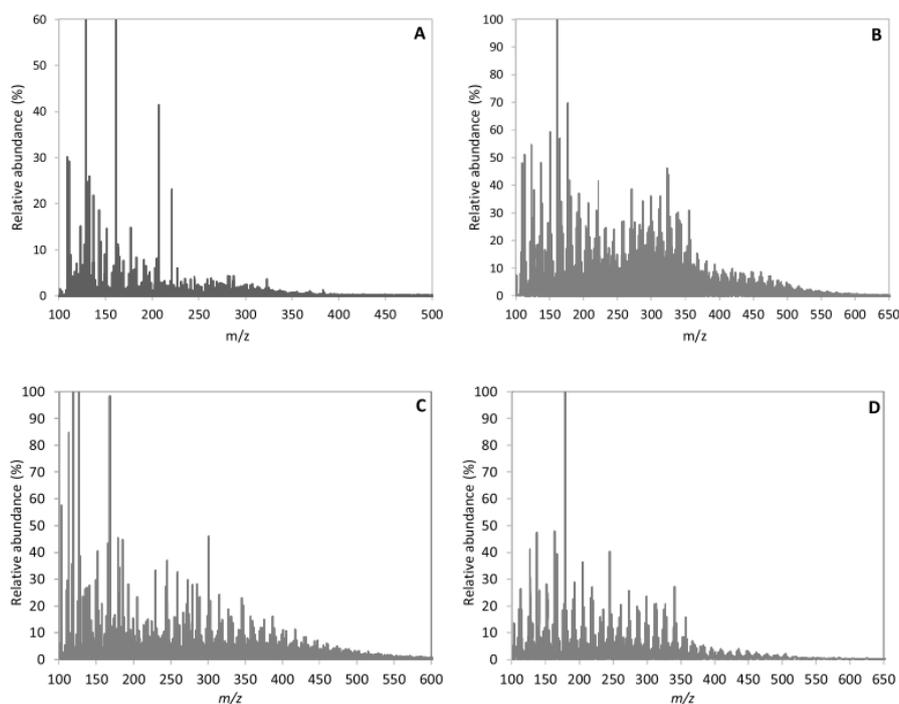
Les effluents générés par ces procédés sont particulièrement complexes de par la diversité des substrats de départ et des procédés employés pour valoriser la biomasse. La transformation des macromolécules natives conduira à la solubilisation et à la conversion en molécules plus ou moins oxygénées, présentes sur **une large gamme de poids moléculaire et de polarité**. Afin d'améliorer les performances des filières thermochimique et biochimique, la caractérisation moléculaire exhaustive des matrices liquides est requise.

### 2.3.1. Les composés oxygénés

Les matrices ex-biomasse comme les huiles de pyrolyse ont souvent été caractérisées par chromatographie en phase gazeuse (GC) et GC bidimensionnelle (GC×GC) avec une détection à ionisation de flamme ou en couplage avec la spectrométrie de masse (MS) [15–20]. Cette dernière a permis de détecter plusieurs centaines de composés et ainsi de mettre en avant la variété des fonctions chimiques oxygénées (alcools, acides carboxyliques, aldéhydes, cétones, furanes, sucres, composés phénoliques, etc.) présente dans des échantillons de bio-huiles [19]. Toutefois, face aux

espèces peu volatiles, très polaires, parfois thermosensibles ainsi qu'aux bases de données limitées pour ce type d'analytes, la GC et GC×GC ne peuvent atteindre une caractérisation exhaustive. Malgré des étapes de dérivation, des analytes avec une masse moléculaire supérieure à 300 g/mol n'ont que rarement été détectés en GC [21].

A l'inverse, la **spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)** en introduction directe a démontré la présence de composés avec **des rapports masse sur charge ( $m/z$ ) jusqu'à 600-1000** en fonction de l'échantillon et des sources d'ionisation utilisées (Figure 2) [22–28]. Les sources d'ionisation les plus populaires pour l'analyse d'échantillons ex-biomasse sont l'électrospray (ESI) et la source à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) dans les modes positif et négatif. La source d'ionisation à photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) étant davantage adaptée pour les composés apolaires, elle n'a que très rarement été choisie dans les différents travaux [25].



**Figure 2 : Spectres de masse d'une bio-huile obtenus en (A) ESI négatif, (B) APCI négatif, (C) ESI positif et (D) APCI positif [22]**

La **complémentarité de l'ESI et de l'APCI** ainsi que des modes positif et négatif a permis d'accéder à l'identification des différentes familles chimiques présentes dans les échantillons lignocellulosiques. La Figure 3 illustre à l'aide d'un diagramme de van Krevelen (représentant le rapport du nombre d'atomes d'hydrogène sur le nombre d'atomes de carbone ( $H/C$ ) en fonction du rapport du nombre d'atomes d'oxygène sur le nombre d'atomes de carbone ( $O/C$ )) les composés détectés en ESI négatif et positif lors de l'analyse d'une huile de pyrolyse de miscanthus [26]. De plus, l'impact de la composition du solvant en ESI a été étudié dans le but d'augmenter le rendement d'ionisation ainsi que la répétabilité des analyses. Ces travaux ont pu mener à la conclusion que lorsque de l'ammoniaque (modes positif et négatif), de l'acétate d'ammonium (mode positif) ou de l'acide formique (mode positif) étaient ajoutés, l'exacerbation des composés azotés ne permettait pas de considérer ces méthodes comme appropriées car non-représentatives de la composition de l'huile de pyrolyse. Un manque de répétabilité des mesures a également été constaté en mode positif en l'absence d'additif. Des analyses à la fois sensibles et répétables ont été obtenues sans ajout de modificateur en mode négatif et en présence d'acétate de sodium en mode positif.

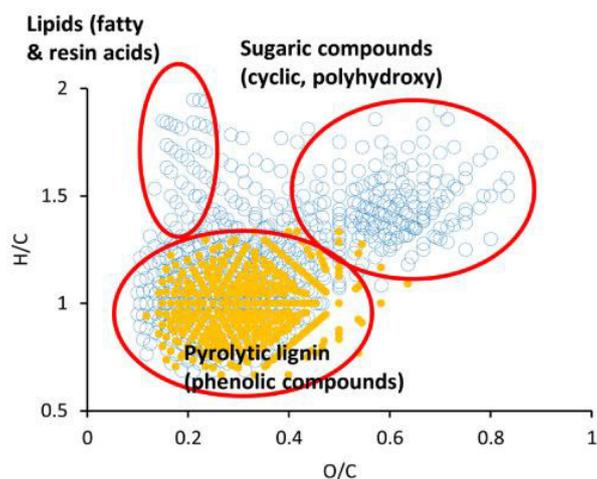
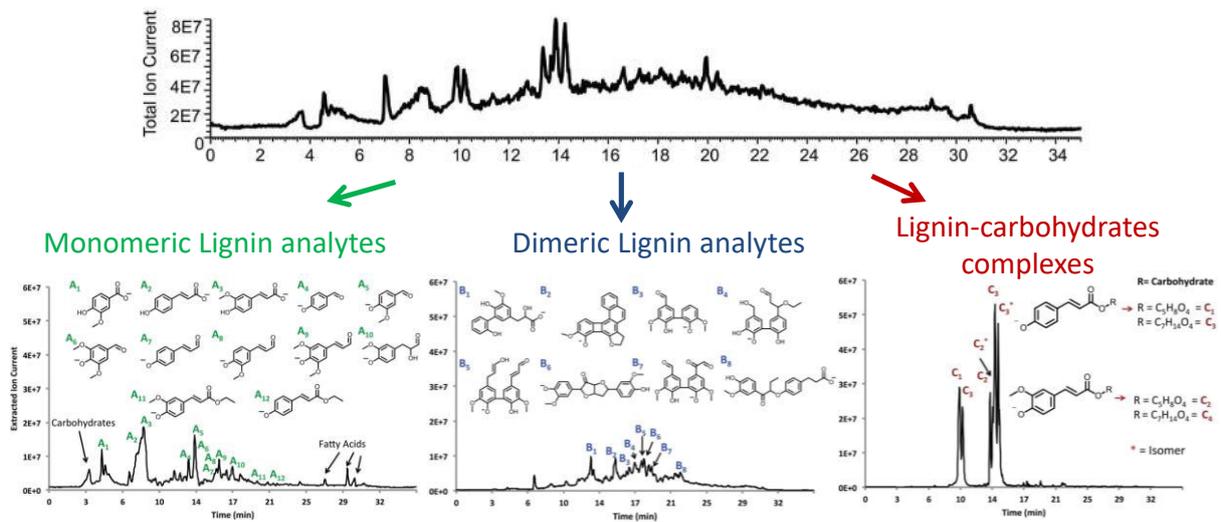


Figure 3 : Diagramme de van Krevelen représentant l'analyse ESI-FT-ICR/MS d'une huile de pyrolyse de miscanthus en mode négatif sans additif (cercles jaunes) et en mode positif avec de l'acétate de sodium (cercles bleus) [26]

A l'inverse de la GC, la **chromatographie en phase liquide (LC) permet d'éluer et de séparer des composés peu volatils et avec un poids moléculaire plus important**. Chen *et al.* présentent une méthode d'identification basée sur le temps de rétention en chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC), l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde ainsi que l'ajout de composés étalons dans l'échantillon [29]. L'application de cette méthode à un hydrolysate de maïs prétraité avec de l'acide sulfurique n'a permis d'identifier que 17 composés. Afin d'augmenter le pouvoir résolutif, la LC bidimensionnelle (LC×LC) a également été étudiée à IFPEN pour l'analyse d'une phase aqueuse d'huile de pyrolyse [30]. Le couplage d'une phase stationnaire à base de carbone graphite en première dimension et d'une colonne à base de silice en deuxième dimension s'est avéré un choix judicieux démontré par le degré d'orthogonalité entre les deux dimensions et une capacité de pics effective proche de 2000. La **chromatographie supercritique (SFC)** a également été étudiée au cours de la thèse de Julien Crépier menée à IFPEN pour l'analyse d'huiles de pyrolyse [31,32]. Le couplage avec la HRMS a décelé la présence de plusieurs isomères qui n'auraient pas pu être différenciés sans la séparation par SFC.

Malgré la possibilité de développer des méthodes chromatographiques multidimensionnelles, le **couplage de la LC ou de la SFC avec la HRMS** est primordial pour améliorer la connaissance des échantillons issus de la biomasse [14,33–37]. L'équipe de Jarrell a identifié près de 25 composés issus d'un échantillon d'herbe prétraité par la méthode organosolv [38]. L'identification a été faite avec des composés étalons ainsi qu'à l'aide de la fragmentation par dissociation induite par collision (CID). Par ailleurs, la fragmentation des molécules étalons avait été étudiée dans un premier temps afin de mettre en évidence **l'apport de la fragmentation pour l'identification**. Dans la plupart des cas, lorsqu'un groupe méthoxyle est présent, il se fragmente en premier, suivi par une perte de CO<sub>2</sub> pour les acides carboxyliques. Pour les aldéhydes, il semble que la perte de CO soit peu fréquente. Le chromatogramme TIC (*total ion chromatogram*) obtenu suite à la séparation est présenté Figure 4. Ce dernier a été « découpé » en fonction du type d'analytes, à savoir les composés monomériques (A, en vert) et dimériques (B, en bleu) issus de la lignine, et des composés phénoliques liés de façon covalente à un sucre aussi nommés complexes lignine-carbohydate ou hétérosides (C, en rouge). La distinction entre les groupes d'analytes a été réalisée en fonction du rapport C/O, du rapport *m/z* et du nombre d'insaturations (DBE : double bond equivalent). Pour chacune des familles, l'extraction des ions s'est faite selon les valeurs suivantes :

- lignine monomérique :  $C/O \geq 5/2$   $90 \leq m/z \leq 250$   $4 \leq DBE \leq 7$
- lignine dimérique :  $C/O \geq 5/2$   $250 \leq m/z \leq 400$   $DBE > 8$
- complexe lignine-carbohydrate :  $C/O \leq 2$   $250 \leq m/z \leq 400$   $DBE \leq 6$



**Figure 4 : TIC obtenu en ESI négatif après séparation RPLC d'un échantillon d'herbe prétraité par organosolv et chromatogrammes des ions extraits pour 3 familles de composés (lignine monomérique, dimérique et complexe lignine-sucré) et identifications associées [adaptée de [38]]**

La fragmentation CID a également permis de proposer des stratégies de séquençage des oligomères de lignine [39,40]. Toutefois, l'interprétation des spectres de fragmentation est souvent complexe. En effet, bien que certains mécanismes de fragmentation soient prévisibles, il est impossible de mettre en place des règles fonctionnant pour l'ensemble des molécules oxygénées [41]. Cette complexité amène certains groupes à utiliser des bases de données spectrales. Cependant, les spectres de fragmentation dépendent des paramètres expérimentaux utilisés et du spectromètre de masse lui-même ; en particulier les spectres peuvent varier selon que la fragmentation ait lieu dans une cellule de collision ou dans un piège à ions. Ainsi, il est très difficile de comparer ses propres données avec des bases de données commerciales ou disponibles en ligne, qui sont d'autant plus très peu renseignées. Certains chercheurs ont alors fait le choix laborieux de construire leur propre base de données [35].

Pour terminer, en complément des méthodes séparatives et de la HRMS, des méthodes de fractionnement par famille chimique de l'échantillon initial peuvent également être envisagées afin de limiter les co-élutions et ainsi faciliter l'interprétation des spectres de masse et de fragmentation. Cette thématique a été le cœur du sujet de la thèse d'Alexis Dubuis réalisée à IFPEN (2016 – 2019) [42–45]. Deux stratégies de fractionnement ont ainsi été étudiées : un fractionnement par la solubilité via des extractions liquide-liquide ou encore la chromatographie de partage centrifuge (CPC) et un fractionnement par la taille avec la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). L'avantage majeur des techniques de fractionnement mises en place était l'obtention d'une organisation chimique qui pouvait par la suite permettre de guider une identification non-ciblée par RPLC/HRMS par exemple.

### 2.3.2. Les sucres

Au vu de la très haute polarité des sucres, il paraît très difficile d'obtenir une bonne séparation chromatographique de ces composés ainsi que des autres analytes oxygénés tels que les composés

phénoliques au cours d'une même analyse. On retrouve dans la littérature plusieurs méthodes de séparation des polysaccharides : **la GC, l'électrophorèse capillaire ainsi que différents types de chromatographie en phase liquide.**

**La chromatographie en phase gazeuse** présente l'intérêt d'un fort pouvoir résolutif. Cependant les sucres étant très peu volatils et thermosensibles, des étapes souvent lourdes de dérivation sont nécessaires [46,47]. Par ailleurs, ces étapes de dérivation peuvent être problématiques lors de l'étude d'un échantillon complexe contenant un grand nombre de composés chimiques de nature variée. En revanche, la chromatographie en phase liquide, bien que moins résolutive, ne nécessite pas de dérivation préalable.

**La chromatographie d'échange d'anions** (HPAEC) est la méthode la plus communément employée pour l'analyse des sucres [47–56]. La plupart des sucres sont des acides faibles avec un pKa compris entre 12 et 14. À des valeurs élevées de pH, les groupements hydroxyles sont partiellement ou totalement ionisés en anions. Ces derniers peuvent alors être sélectivement élués en HPAEC [56,57]. Le plus souvent, un détecteur par ampérométrie pulsée est associé à l'HPAEC [48–51,56].

Une alternative pour la séparation des composés polaires tels que les sucres **est la chromatographie d'interaction hydrophile** (HILIC) associée à un réfractomètre ou à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière [58–64]. Un avantage de ce type de chromatographie en phase liquide est qu'il ne nécessite pas de grandes quantités d'additif comme des sels non volatils, ce qui le rend compatible avec davantage de détecteurs sans traitement supplémentaire. Toutefois, le mode HILIC présente un mécanisme de rétention très complexe et encore mal compris de nos jours. Il est souvent préférable d'utiliser des méthodes en isocratique afin d'obtenir des résultats répétables à cause du temps d'équilibration de la colonne qui est relativement long en comparaison à la RPLC, bien que de nouvelles colonnes récemment mises sur le marché permettent de limiter ce temps. En fonction des colonnes employées, il a été démontré que des temps d'équilibration jusqu'à 60 temps morts étaient parfois nécessaires [65].

Enfin, une dernière solution pour séparer des carbohydrates est la RPLC avec des colonnes comportant une **phase stationnaire en carbone graphite** (PGC). En effet, il a déjà été montré que ce type particulier de phase stationnaire permettait des interactions avec des groupements polaires [66,67].

De manière similaire à l'analyse des autres composés oxygénés, la **HRMS a un rôle déterminant dans la caractérisation des mono et polysaccharides**. Le type de chromatographie liquide employé lors du couplage LC/HRMS va avoir un impact direct sur les spectres de masse. En effet, la composition de la phase mobile a une forte influence sur la capacité de la source d'ionisation à ioniser les analytes. Par ailleurs, certaines techniques chromatographiques telles que la HPAEC utilisent des concentrations de sels incompatibles avec le couplage direct à la spectrométrie de masse. À ces verrous s'ajoute la difficulté d'ioniser les sucres tout en conservant des compositions de solvant acceptables pour le spectromètre de masse ainsi que des températures qui ne dégradent pas les analytes. De nombreux chercheurs utilisent donc des solvants additionnels dits « *make-up* » à la sortie du système LC afin de faciliter l'ionisation [52,54,55,59,68]. D'autres en revanche semblent détecter correctement les sucres sans *make-up* post-colonne [53,60,67,69–71]. À de rares exceptions, l'ensemble des recherches sur le couplage LC/HRMS a été réalisé avec une **source electrospray** [52–55,59,60,67–72]. Ce choix est judicieux car il permet de détecter des molécules avec un haut poids moléculaire, ce qui

permet notamment d'ioniser les polysaccharides. De plus, la forte polarité et la faible volatilité des carbohydrates font de l'ESI la source d'ionisation à privilégier.

La spectrométrie de masse en tandem est souvent employée pour élucider la structure des carbohydrates. Elle permet d'identifier par fragmentations successives l'enchaînement des monomères au sein d'un oligosaccharide ou polysaccharide. **Une nomenclature systématique** a été proposée par Domon et Costello afin de simplifier l'appellation des fragments [73]. Cette dernière est aujourd'hui une référence pour la fragmentation des sucres. Comme illustré en Figure 5, les ions fragments provenant des ruptures glycosidiques sont nommés  $B_i$  et  $C_i$  lorsqu'ils sont du côté non-réducteur, tandis qu'ils sont appelés  $Y_j$  et  $Z_j$  du côté réducteur. L'indice  $i$  indique le nombre de ruptures de liaisons glycosidiques en commençant par le côté non-réducteur. L'indice  $j$  fait référence au nombre de liaisons interglycosidiques compté depuis la fin du côté réducteur. Lors d'une rupture de cycle, les ions fragments du côté non-réducteur sont notés  ${}^{m,n}A_i$  et  ${}^{m,n}X_j$  du côté réducteur. Les indices  $m$  et  $n$  correspondent aux positions des liaisons mises en jeu lors de la fragmentation. Les liaisons au sein du cycle sont numérotées de 0 à 5 ou 0 à 4 en fonction du type de cycle ; la Figure 5B donne des exemples. Les fragments  $B$ ,  $C$ ,  $Y$  et  $Z$  sont souvent les plus observés car leur formation nécessite moins d'énergie que celle des fragments  $A$  et  $X$ . La fragmentation des sucres dépendra d'une part de la forme de l'ion précurseur et d'autre part du mode d'ionisation employé. Ainsi, l'ion précurseur pourra par exemple être sous la forme  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  ou  $[M+Li]^+$  en mode positif, ou encore  $[M-H]^-$ ,  $[M+Cl]^-$  ou  $[M+AcO]^-$  en mode négatif.

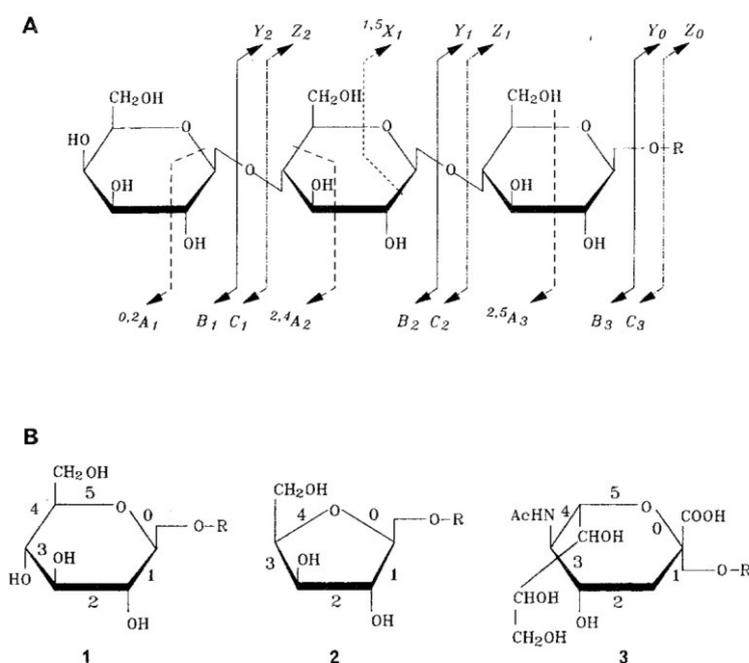


Figure 5 : Exemples de fragmentation d'un sucre et nomenclature associée [73]

La fragmentation des oligosaccharides conduit majoritairement à la rupture de la liaison glycosidique. En utilisant le mode négatif, les ions  $C$  et  $Z$  sont les plus abondants [64] tandis qu'en mode positif, ce sont les fragments  $B$  et  $Y$  [74]. Pour illustrer ces propos, la Figure 6 représente le spectre de fragmentation  $MS^2$  de l'oligomère GalA5 en ESI négatif suite à sa séparation en HILIC. On retrouve des fragments de type  $Z$  et  $C$ . Par ailleurs, les fragments  $A$  issus de l'ouverture d'un cycle restent très minoritaires. Ce spectre  $MS$  a permis de proposer une structure de cet oligomère.

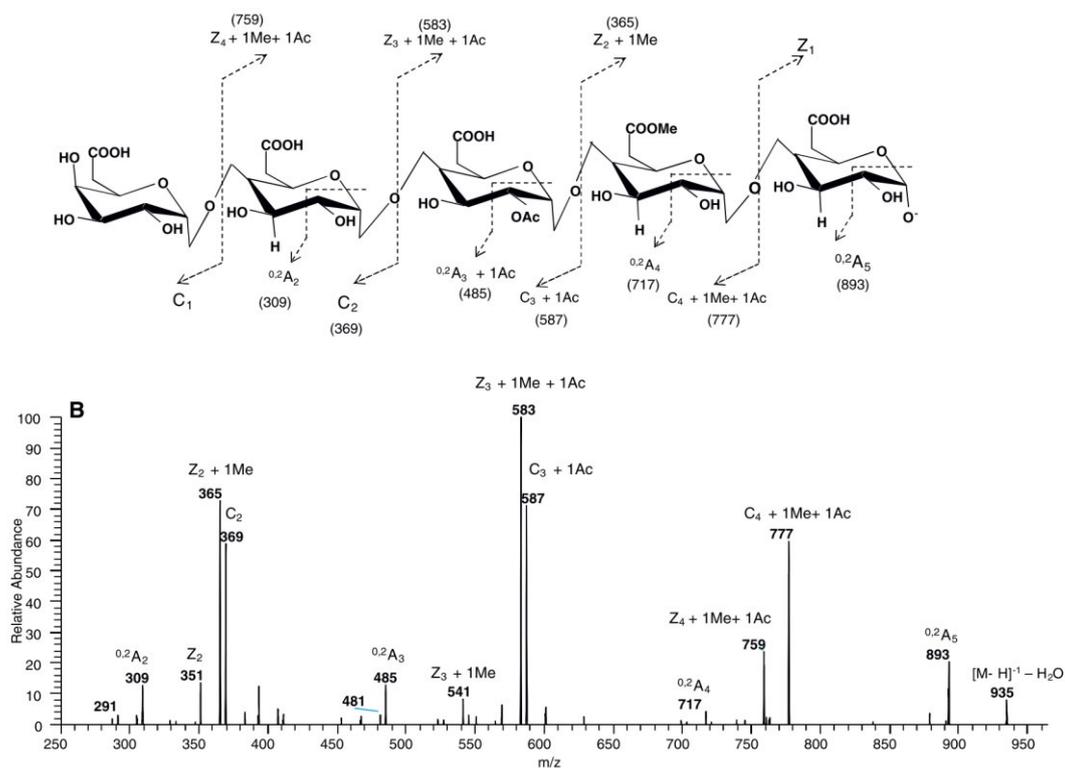


Figure 6 : Fragmentation MS<sup>2</sup> de l'oligomère GalA5 en ESI- [64]

Lorsque des adduits ont été formés, il est parfois nécessaire d'effectuer des acquisitions de fragmentation supplémentaires. Antonio *et al.* ont formé en ESI négatif des ions  $[M+HCOO]^-$ , ces ions ont été dans un premier temps fragmentés pour obtenir des ions  $[M-H]$ . Ce n'est que lors d'une seconde fragmentation qu'il y a eu rupture des liaisons glycosidiques et ouverture de cycles [67]. Coulier *et al.* ont quant à eux, fragmenté des sucres en mode ESI positif [53]. Les coupures glycosidiques n'ont pas été ici majoritaires. En revanche, des coupures au niveau des cycles conduisent à des pertes de neutres caractéristiques des sucres (-60 et -90). Une des hypothèses pourrait être que les ions sont ici sous la forme  $[M+Na]^+$ ; ainsi en fonction du site où se positionne la charge, des ruptures intra-cycles ou à l'inverse glycosidiques pourraient être favorisées. Zaia *et al.* rapportent que les ruptures des liaisons glycosidiques semblent être favorisées lorsque le cation est associé à l'atome d'oxygène engagé dans la liaison glycosidique. Tandis que les ruptures de cycles se produisent lorsque le cation est simultanément lié à plusieurs atomes d'oxygène, stabilisant les liaisons glycosidiques [74]. Par ailleurs, l'énergie d'ionisation pour fragmenter les ions moléculaires augmente avec les adduits dans l'ordre  $H < Li < Na < K$  [75,76].

Enfin, la fragmentation de deux isomères de sucre ayant le même rapport  $m/z$  peut être un élément de différenciation grâce à la différence d'intensité des ions sur les spectres de fragmentation [53]. D'une manière globale, la fragmentation des liaisons glycosidiques apporte une information sur la séquence de l'oligosaccharide tandis que les ions issus de l'ouverture d'un cycle peuvent indiquer la position des liaisons entre les monomères ainsi que la position d'un groupement particulier (type groupement acétyle). Les ratios d'intensité observés peuvent également être un facteur discriminant de l'enchaînement des monomères.[77,78].

## 2.4. Conclusion de l'état de l'art et problématique

La transformation de la biomasse lignocellulosique résulte en l'obtention de matrices complexes contenant des analytes distribués sur **une large gamme de poids moléculaire et de polarité, parfois polyfonctionnels avec des groupements chimiques variés** (sucres, phénols, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, furanes, etc.). La mise en œuvre de méthodes séparatives adaptées aux caractéristiques des échantillons de biomasse, en couplage avec la spectrométrie de masse haute résolution est aujourd'hui l'une des techniques les plus puissantes pour avancer dans la caractérisation de ce type d'échantillon. Dans la littérature, les huiles de pyrolyse sont principalement analysées en GC et HRMS. Bien que quelques publications relatent de couplages entre la chromatographie en phase liquide et la HRMS, notamment pour l'analyse d'hydrolysats issus de la conversion biochimique de la biomasse, le nombre de composés identifiés structurellement reste limité et ne permet pas d'expliquer la réactivité des échantillons. L'intérêt de l'utilisation de plusieurs sources d'ionisation afin de tendre vers une caractérisation la plus exhaustive possible a également été souligné. Enfin, la fragmentation en spectrométrie de masse permet parfois d'aller jusqu'à une analyse structurale des composés, bien que sans étalon, les structures demeurent des propositions.

## **3. Les coupes pétrolières lourdes**

### 3.1. Contexte

Comme déjà mentionné, l'augmentation de la part des coupes lourdes dans les pétroles bruts, associée à des spécifications de plus en plus strictes en matière de teneurs en soufre et en azote, pousse les industriels à développer des procédés toujours plus performants, capables de purifier et convertir les coupes lourdes à faibles valeurs marchandes en coupes plus légères très demandées.

Les pétroles bruts sont des mélanges complexes composés majoritairement de molécules hydrocarbonées (saturées et insaturées). On retrouve également des composés azotés, soufrés, oxygénés ainsi que des composés organométalliques. En fonction de la provenance du pétrole brut, ce dernier peut avoir une composition élémentaire variée : entre 84 et 87% (m/m) de carbone, 11-14% d'hydrogène, 0,1-5% de soufre, 0,1-1,8% d'oxygène, 0,1-1,6% d'azote ainsi que des traces de métaux (Ni, V) [79].

Classiquement, le pétrole brut est distillé dans un premier temps à pression atmosphérique et dans un second temps sous vide ce qui permet d'obtenir 12 à 15 coupes pétrolières [80]. La Figure 7 présente un schéma des principales coupes, associées aux températures d'ébullition et nombre d'atomes de carbone, obtenues lors des deux distillations successives. Un nombre d'isomères selon le nombre d'atomes de carbone est également indiqué et permet de mettre en évidence la complexité croissante des coupes pétrolières les plus lourdes [81].

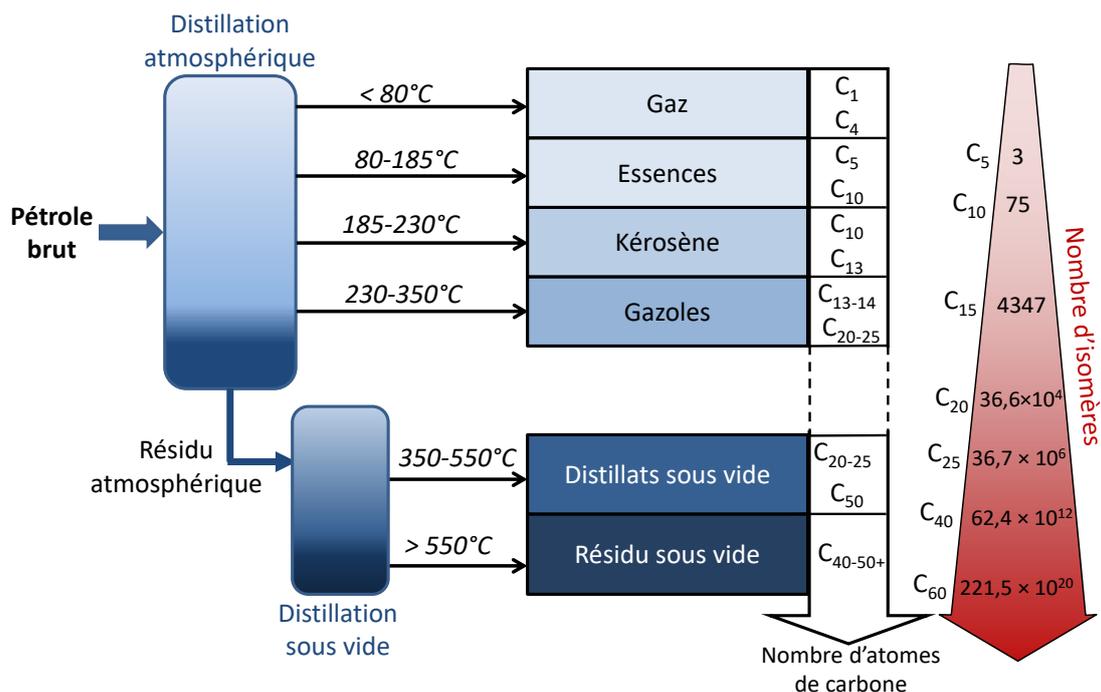


Figure 7 : Principales coupes pétrolières obtenues après distillations atmosphérique et sous vide associées aux températures d'ébullition, nombres d'atomes de carbone et d'isomères

En fonction des coupes, différents procédés de conversion et d'amélioration sont mis en place. Les gazoles (230-350°C) et le kérosène (185-230°C) pourront par exemple subir une hydrodésulfurisation dans le but de réduire la teneur en soufre. Les essences (80-185°C) quant à elles pourront être améliorées par isomérisation ou reformage catalytique. Concernant les coupes lourdes, les résidus (> 550°C) peuvent être convertis soit par viscoréduction (craquage thermique) ou cokéfaction, et les distillats sous vide (350-550°C) sont transformés soit par craquage catalytique ou hydrocraquage [10,82]. À noter que le procédé d'hydrocraquage permet d'obtenir des produits de haute qualité par comparaison à d'autres procédés comme le craquage thermique ou encore le craquage catalytique.

### 3.2. Conversion des distillats sous vide par hydrocraquage

Il existe des **unités d'hydrocraquage en une étape**, toutefois afin d'augmenter le taux de conversion, une partie de la charge non convertie peut être **recyclée** soit en la réinjectant dans la section réactionnelle initiale (une étape avec recycle) ou dans une section réactionnelle indépendante, on parle alors de **procédés deux étapes** (Figure 8).

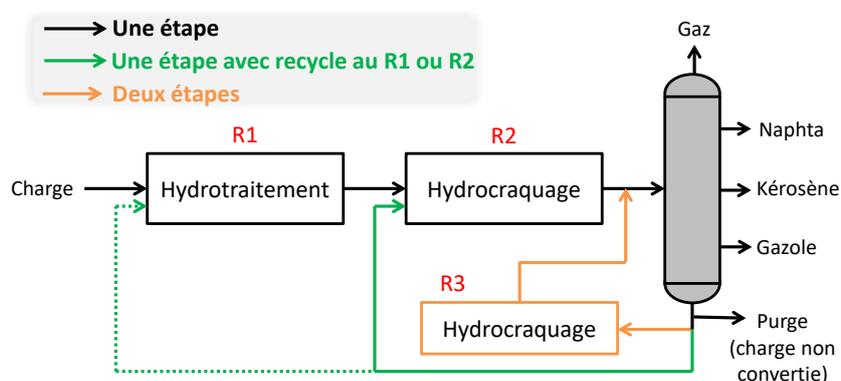


Figure 8 : Schéma des procédés d'hydrocraquage en une et deux étapes

De par la composition des coupes lourdes telles que les distillats sous vide, **une première étape d'hydrotraitement** est souvent nécessaire (R1 sur la Figure 8). En effet, ces derniers contiennent une teneur importante en hétéroéléments (soufre, azote et dans une moindre mesure oxygène) qui ont un effet néfaste sur les catalyseurs [83]. L'hydrodésulfuration et hydrodézotation par hydrotraitement de la charge consistent à appliquer une forte pression d'hydrogène en présence d'un catalyseur. Par ailleurs, durant cette étape, les doubles liaisons C=C des oléfines et des composés aromatiques sont également en partie saturées. **Une fois cette étape achevée, les distillats sont convertis en produits plus légers par hydrocraquage.** Ce procédé nécessite un catalyseur contenant à la fois un acide fort et une fonction métallique. La Figure 9 illustre les mécanismes d'hydrocraquage d'un composé aliphatique (appelé paraffine). Ces derniers impliquent des réactions de scission d'hydrocarbures aliphatiques, des ouvertures de cycle ou encore des déalkylations [84].

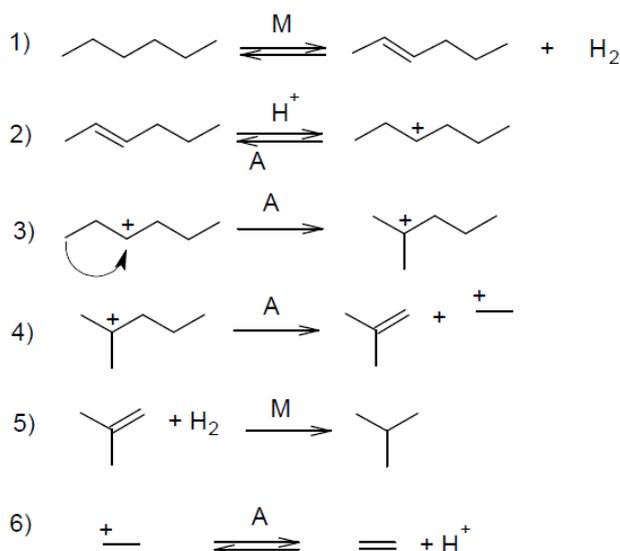


Figure 9 : Mécanismes d'hydrocraquage d'une paraffine [84]

Une problématique majeure des procédés d'hydrocraquage, et plus particulièrement des procédés avec recycle, est **la formation et l'accumulation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, parfois lourds contenant plus de sept cycles benzéniques**, qui réduisent l'activité catalytique et précipitent dans les échangeurs de l'unité. Les HAP se forment par condensation de plus petits hydrocarbures aromatiques polycycliques. Sullivan *et al.* ont proposé un mécanisme de réaction à partir du naphthalène qui suit deux voies réactionnelles possibles comme illustré Figure 10 : soit une addition de 4 carbones au niveau du site le plus dense en électrons (ortho-ring), soit une addition de 2 carbones (Perl-Ring) [85]. La formation de HAP dépendra à la fois de la composition initiale de la charge, plus cette dernière sera aromatique et plus elle contiendra des petits composés aromatiques (du type naphthalène) précurseurs des HAP, mais aussi des paramètres expérimentaux comme la température et la pression d'hydrogène au sein du réacteur.

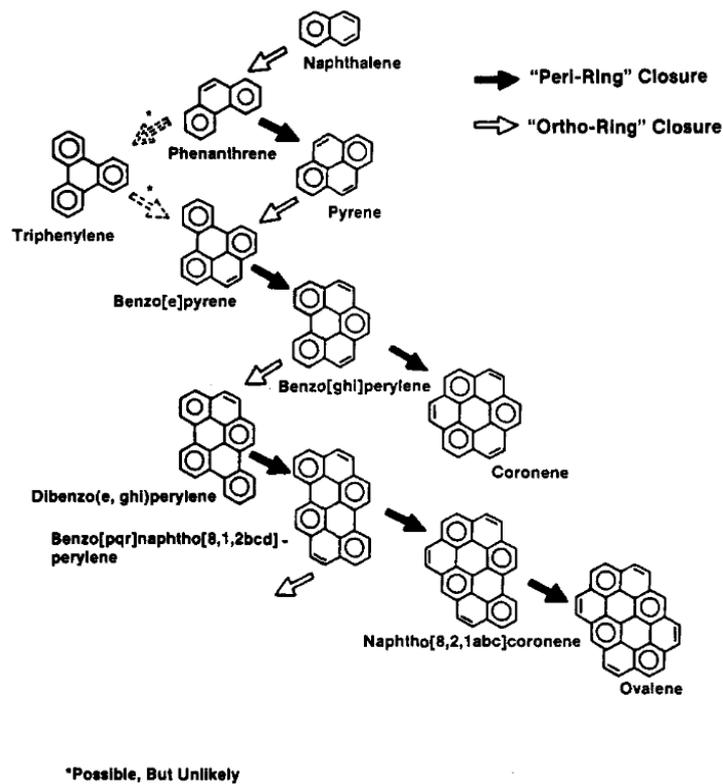


Figure 10 : Mécanisme de formation des HAP selon Sullivan *et al.* [85]

Afin de maîtriser en tout point le procédé, il est nécessaire de connaître la composition des coupes pétrolières lourdes introduites en entrée de l'unité ainsi que la composition des produits en sortie. Dans le but de **contrôler, comprendre et prédire la formation des HAP** des **données quantitatives sur les teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques** dans les charges en entrée et l'effluent non converti sont requises.

### 3.3. L'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans la littérature

Les matrices pétrolières sont particulièrement complexes et contiennent des milliers de composés hydrocarbonés aliphatiques et aromatiques, soufrés, azotés et/ou oxygénés. Leur caractérisation se limite le plus souvent à des propriétés macroscopiques telles que les teneurs élémentaires en hétéroéléments, la viscosité ou encore les courbes de distillation.

Un des outils analytiques historiquement utilisé pour l'analyse moléculaire des échantillons pétroliers est la GC ainsi que la GC×GC [86–90]. Cependant, ces techniques sont souvent limitées par la volatilité des analytes et ainsi à des HAP comportant moins de huit cycles aromatiques [91]. À titre d'exemple, la température d'ébullition du coronène comportant sept cycles aromatiques est d'environ 525°C.

A l'inverse, la chromatographie en phase liquide permet d'éluer des composés non volatils à haut poids moléculaire. Parmi les modes de LC employés dans la littérature, on recense peu de publications récentes **sur la séparation en chromatographie en phase normale (NPLC)** des HAP dans des matrices pétrolières [92,93]. Cette dernière permet de séparer les HAP en fonction du nombre de cycles et peut donc être utilisée en amont comme méthode de fractionnement [92]. Cependant, l'analyse d'un gazole lourd via cette seule technique se révèle très limitée par manque de résolution comme illustrée sur la Figure 11.

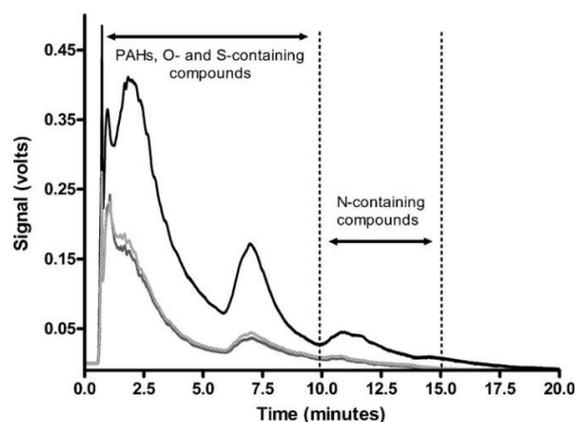


Figure 11 : Chromatogrammes d'un gazole lourd (noir) et de deux effluents hydrotraités (gris) obtenus en NPLC avec une détection UV à 254 nm [93]

La RPLC, souvent considérée comme plus robuste que la NPLC, a également été utilisée [94–97]. Toutefois, les solvants usuellement employés en RPLC (eau, méthanol, acétonitrile) ne permettent pas de solubiliser les matrices pétrolières. Ainsi, **des méthodes de prétraitement et/ou de fractionnement de l'échantillon sont nécessaires en amont de la RPLC**. Parmi elles, on retrouve des méthodes d'extraction sur phase solide (SPE) [94,95], des fractionnements par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) [95], chromatographie sur couche mince [98], des extractions liquide-liquide [96], ou encore une succession de prétraitements [94,95]. Une autre méthode de fractionnement très employée pour les échantillons pétroliers est le fractionnement SARA qui permet de séparer les quatre familles suivantes : saturés, aromatiques, résines et asphaltènes [99]. Récemment, Panda *et al.* ont proposé une méthode de chromatographie à polarité de phase inversée en milieu non-aqueux (NARP) pour analyser les HAP dans des échantillons en sortie d'hydrocraquage avec une détection UV [96]. Une première étape d'extraction des composés les plus polaires, dont les HAP, à l'aide du diméthylsulfoxyde (DMSO) permet de s'affranchir des composés saturés et ainsi d'injecter la fraction extraite avec un risque limité de précipitation. Cependant, la méthode présentée n'est applicable que pour des échantillons hydrotraités, c'est-à-dire des échantillons pour lesquels les composés azotés et soufrés ont été éliminés en présence d'hydrogène (Figure 12). Malgré une tentative d'extraction des composés soufrés d'un distillat sous vide par chromatographie d'échange de ligand, une forte dérive de la ligne de base causée par les nombreuses co-élutions subsiste.

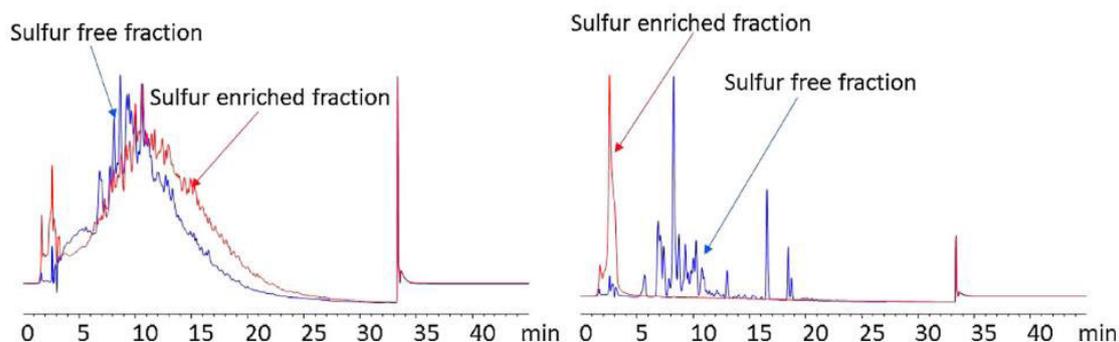


Figure 12 : Chromatogrammes UV d'une fraction enrichie et pauvre en soufre pour une charge d'hydrocraquage (gauche) et un échantillon partiellement hydrotraité (droite) [96]

La chromatographie seule ne présente pas une résolution suffisante pour analyser ce type de matrice. En effet, en plus des composés soufrés ainsi qu'azotés, des centaines de HAP plus ou moins

alkylés cohabitent dans ces charges d'hydrocraquage. Afin d'augmenter le pouvoir résolutif, il est possible d'utiliser une seconde dimension de séparation. L'équipe dirigée par Schoenmakers a récemment publié une méthode de **chromatographie en phase liquide bidimensionnelle en ligne avec une détection UV** [100]. Malgré un fort investissement dans l'optimisation de la méthode séparative ainsi que l'utilisation en amont d'un fractionnement SARA, les cartographies 2D ne permettaient pas de distinguer des pics, mais plutôt des massifs plus ou moins décalés pour les différentes fractions SARA [100]. Saravanabhavan *et al.* ont couplé hors-ligne la NPLC et la RPLC avec une détection UV [92]. Ce couplage pertinent a permis dans un premier temps de séparer les analytes par nombre de cycles puis dans un second temps en fonction, principalement, du nombre d'atomes de carbone. Cependant, seulement cinq fractions ont été collectées à partir de la première dimension, probablement à cause de la durée d'environ 2 h de la seconde dimension, ce qui a pour conséquence de limiter la capacité de pics du montage global.

Enfin, une dernière méthode séparative à la frontière de la LC et la GC est la **SFC**. Cette technique, employant du CO<sub>2</sub> comme solvant, a connu plusieurs évolutions. Aujourd'hui, les séparations en SFC sont principalement réalisées avec des colonnes remplies similaires à celles employées en LC, associées à un gradient de co-solvant. Dans le cas des produits pétroliers, la SFC présenterait l'avantage de pouvoir directement injecter les matrices simplement diluées au préalable. En effet, le CO<sub>2</sub> est souvent considéré comme proche de l'heptane en termes de polarité et de force éluante. Or, l'heptane est un solvant capable de solubiliser la majorité des produits pétroliers à l'inverse des phases mobiles employées en RPLC. Une limite pourrait toutefois survenir pour les coupes pétrolières contenant un grand pourcentage d'asphaltènes. Les asphaltènes sont des solides noirs constitués d'agrégats de différentes tailles. Lors d'un fractionnement SARA, ces derniers sont séparés des autres constituants par précipitation dans de l'heptane ou hexane. Malgré son fort potentiel, la SFC avec des colonnes remplies n'a pas encore été employée pour l'analyse des HAP dans les matrices pétrolières. Toutefois, plusieurs travaux ont déjà démontré la pertinence de la SFC pour la séparation de HAP dans d'autres matrices comme des huiles de pyrolyse rapide de biomasse [101], des caoutchoucs [102], des sols [103], des liquides alimentaires [104], de l'eau [105] ou simplement avec des étalons [106].

Au vu de la complexité des matrices pétrolières, les techniques chromatographiques ne présentent pas à ce jour une résolution suffisante pour parvenir à une séparation permettant l'identification des HAP. L'utilisation de la **spectrométrie de masse haute résolution** prend alors tout son sens. Un grand nombre d'études travaillant sur la caractérisation des constituants d'échantillons pétroliers, aussi appelée pétroléomique, utilise la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR/MS) qui est une des techniques les plus résolutes [107–116]. La première étape d'une analyse par spectrométrie de masse est l'ionisation et la désolvatation des analytes. Le plus souvent, plusieurs sources d'ionisation sont employées en modes positif et négatif afin d'atteindre une caractérisation la plus exhaustive possible. Dans le cas des HAP, la **source à photo-ionisation à pression atmosphérique en mode positif** s'est révélée être la plus adaptée parmi les trois sources couramment utilisées (ESI, APCI et APPI) [117,118]. L'ionisation en APPI est initiée par un rayonnement de photons à 10,0 et 10,6 eV générés par une lampe krypton. Les composés, comme les HAP, qui ont une énergie d'ionisation (IE) plus faible que l'énergie des photons, pourront donc être directement ionisés. Afin d'améliorer l'ionisation, l'utilisation de dopants est très largement décrite dans la littérature. Plusieurs études ont comparé l'impact d'un panel de dopants sur l'ionisation d'étalons de HAP [119–121]. Ces études ont toutes montré que **l'anisole était le dopant**

permettant d'obtenir le meilleur signal pour la majorité des étalons de HAP étudiés à l'exception des plus petits composés aromatiques (Figure 13). Malgré ce constat, le toluène reste l'un des dopants les plus employés aujourd'hui pour l'analyse de matrices pétrolières [11,112,113,116,117,122] ou de HAP dans toutes sortes d'échantillons [123,124].

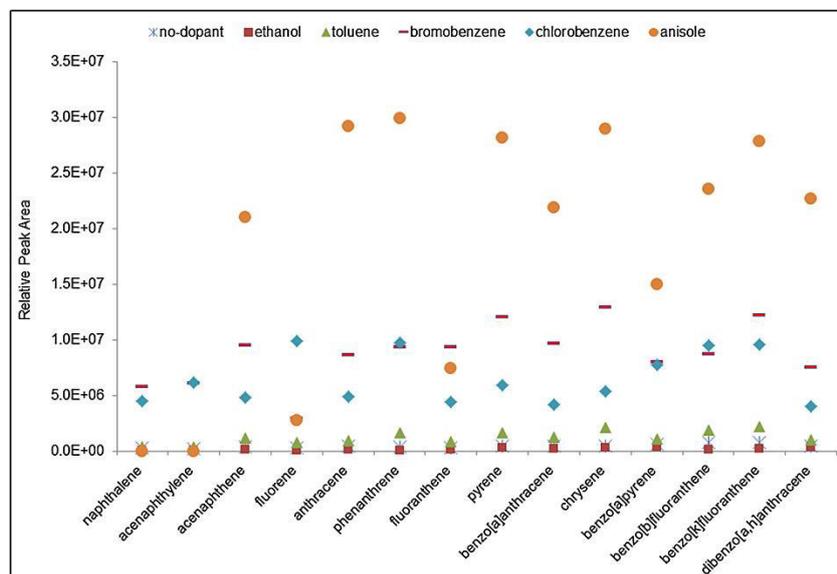


Figure 13 : Impact de la nature du dopant en APPI positif sur les aires des ions  $[M]^+$  de 14 HAP [120]

Les sources d'ionisation à pression atmosphérique associées à la spectrométrie de masse haute résolution ont permis d'avancer considérablement dans la connaissance et la compréhension des échantillons pétroliers et plus particulièrement des coupes lourdes non-analysables en GC/MS. Toutefois, **une limite de l'introduction directe en HRMS demeure l'aspect quantitatif et représentatif des résultats**. En effet, lorsqu'une grande quantité de composés entre dans la source d'ionisation, ces derniers sont alors en compétition les uns avec les autres pendant le processus d'ionisation. Certains composés peuvent subir ce que l'on appelle une suppression d'ionisation ou à l'inverse une exaltation d'ionisation. Par ailleurs, une seconde limitation réside dans l'impossibilité de séparer des isomères (même rapport  $m/z$ ) ou certains isobares (rapports  $m/z$  proches) si la résolution est insuffisante. Des méthodes de fractionnement sont ainsi très souvent mises en place en amont de la HRMS afin de pallier ces limitations [110,112,113,125–129]. À titre d'exemple, la chromatographie de perméation sur gel (GPC) a été employée par Panda *et al.* pour fractionner un pétrole brut considéré comme lourd [112]. Les six fractions collectées ont par la suite été analysées en HRMS par introduction directe. Les composés de type  $C_xH_y$  détectés, incluant les HAP, comprenaient un **nombre d'atomes de carbone entre 10 et 60 pour un DBE compris entre 3 et 27**. À noter toutefois qu'il s'agit uniquement de résultats qualitatifs et non quantitatifs. Par ailleurs, Cho *et al.* ont démontré l'importance de combiner des techniques séparatives à la HRMS [113]. À titre d'exemple, un fractionnement SARA avait permis de détecter près de deux fois plus de composés en comparaison à l'analyse directe d'un pétrole brut (Figure 14). L'effet de matrice lors de l'analyse sans fractionnement est également souligné par la comparaison du nombre de composés détectés au sein de chaque famille chimique ( $\times 13.1$  pour la famille  $N_2$  versus  $\times 1.2$  pour la famille  $S_2$ ).

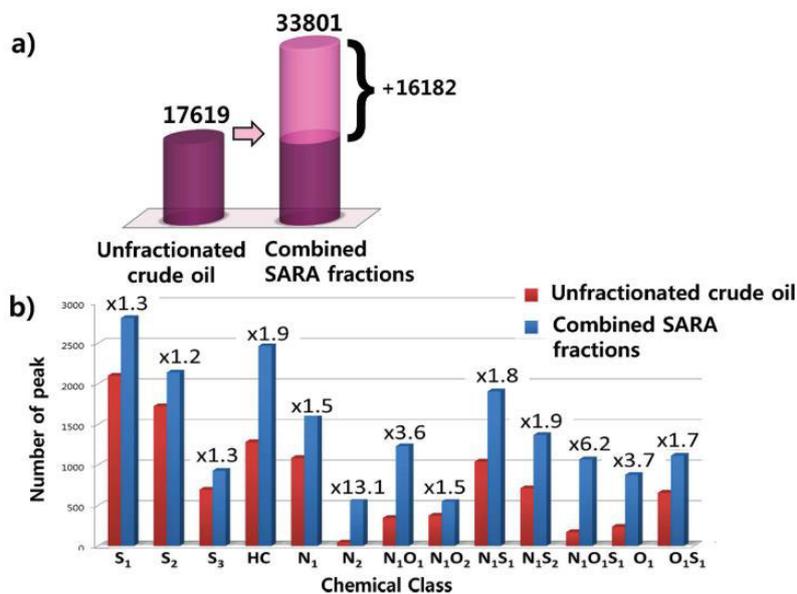


Figure 14 : Comparaison (a) du nombre total de composés détectés et (b) du nombre de composés détectés au sein de chaque famille chimique avec et sans préfractionnement d'un pétrole brut [113]

Pour autant, un fractionnement n'assure pas la suppression totale des effets de matrice ou encore la séparation des isomères. **Le couplage en ligne de la chromatographie en phase liquide ou supercritique à la spectrométrie de masse semble en revanche une solution pertinente pour l'analyse de telles matrices complexes.** En effet, une première dimension de séparation pourrait permettre de répartir les analytes tout au long du chromatogramme et ainsi les délivrer au fur et à mesure au sein de la source d'ionisation. De plus, le couplage avec la HRMS permet d'augmenter la résolution globale de la méthode analytique. De tels couplages ne sont cependant pas courants à l'heure actuelle et on ne recense aucune publication traitant de l'analyse et de la quantification des HAP dans les coupes lourdes pétrolières comme les distillats sous vide. Plusieurs raisons peuvent argumenter l'absence de travaux allant en ce sens : (1) l'incompatibilité de certains modes de LC avec la HRMS (phases mobiles, débit, sels), (2) la nécessité de travailler avec un compromis résolution/fréquence d'acquisition sur certains analyseurs, notamment sur les analyseurs à transformée de Fourier majoritairement utilisés en pétrochimie, afin de décrire convenablement les pics chromatographiques et (3) une optimisation du couplage LC/HRMS ou SFC/HRMS impliquant de nombreux paramètres expérimentaux qui nécessite à la fois des connaissances en chromatographie et en spectrométrie de masse.

### 3.4. Conclusion de l'état de l'art et problématique

**L'analyse quantitative des HAP dans les distillats sous vide est une tâche ardue et encore jamais réalisée à ce jour.** La complexité de telles coupes pétrolières limite l'emploi de techniques séparatives historiques dans l'analyse d'échantillons pétroliers comme la GC. Dans la littérature, plusieurs techniques séparatives comme la NPLC, RPLC associées parfois à des techniques de fractionnement ou encore la LC bidimensionnelle ont été développées pour l'analyse de pétroles bruts ou de coupes lourdes. Toutefois, ces techniques sont très rapidement limitées par leur pouvoir résolutif et leur capacité à identifier les analytes. Dans le domaine de la pétrochimie, la spectrométrie de masse haute résolution a permis d'avancer dans la connaissance de la composition de ces matrices complexes. Cependant, **les descriptions réalisées sont seulement qualitatives** en raison des effets de matrice lors de l'analyse par introduction directe. Bien que jamais réalisé dans ce

contexte, le couplage de la chromatographie en phase liquide ou supercritique avec la spectrométrie de masse pourrait permettre une analyse à la fois qualitative et quantitative des HAP dans les distillats sous vide.

#### 4. Le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse

Le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse (LC/MS) présente un réel intérêt pour les problématiques analytiques soulevées précédemment, à la fois pour les matrices issues de la biomasse lignocellulosique et les coupes pétrolières lourdes.

La LC/MS a commencé à être étudiée bien plus tard que la GC/MS en raison des difficultés techniques, mais aussi d'exploitation des données qu'impose un tel couplage. En effet, à l'inverse de la GC/MS, il n'existe pas de bases de données universelles du type NIST permettant une identification fiable et rapide des analytes. Ce n'est qu'il y a une trentaine d'années que la LC/MS a connu un réel essor grâce à la mise au point des sources d'ionisation à pression atmosphérique [130,131]. Aujourd'hui encore, la LC/MS progresse et permet d'approfondir la caractérisation de matrices toujours plus complexes. En effet, la chromatographie en phase liquide permet de séparer les composés à la fois polaires, thermosensibles et/ou lourds en amont de la détection tandis que la spectrométrie de masse apporte des informations à la fois sur la formule brute et potentiellement sur la formule développée des composés à l'aide de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Malgré le fort intérêt de la communauté scientifique, la LC/MS n'est pas systématiquement utilisée en tant que technique de routine [130]. Un lourd travail d'optimisation et de tests est nécessaire dès lors qu'une nouvelle analyse est mise en place et ce développement est souvent à réaliser de nouveau lors d'un changement d'appareillage. Les principales causes sont d'une part la difficulté à coupler certaines méthodes chromatographiques à la spectrométrie de masse (débit de solvant, additifs) et d'autre part le manque de consensus sur les phénomènes physico-chimiques qui se déroulent durant l'ionisation des composés.

##### 4.1. Généralités

La LC est une technique de choix dans de nombreux domaines (environnementaux, pharmaceutiques, etc.). Elle a pour but de séparer les constituants d'un mélange même très complexe en amont d'un système de détection. Son champ d'application couvre en partie celui de la chromatographie en phase gazeuse (en dehors des composés très volatils) auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles, polaires ainsi que les produits avec des masses moléculaires élevées (supérieures à 300 g/mol). Par ailleurs, **la grande diversité de phases stationnaires et de phases mobiles disponibles sur le marché permet d'envisager un grand nombre de combinaisons, chacune présentant une sélectivité donnée.** En fonction de la phase stationnaire et de la phase mobile choisies, les types d'interactions mis en jeu seront différents, allant de l'exclusion stérique des analytes à leur adsorption sur la phase stationnaire.

Les spectromètres de masse sont des analyseurs et détecteurs puissants capables de fournir des informations pour la compréhension des mélanges complexes. En effet, ils permettent à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'un composé ainsi que d'obtenir des données structurales à l'aide de la fragmentation. Ils se composent d'une source d'ionisation qui a pour rôle de désolvater (pour les sources à pression atmosphérique) et d'ioniser les molécules, d'un analyseur

qui sépare les ions en fonction de leur rapport  $m/z$  et d'un détecteur qui permet de dénombrer les ions et ainsi obtenir une information quantitative. Ils peuvent être utilisés soit avec un système d'introduction directe (infusion) soit en couplage avec un système chromatographique. En couplage avec la chromatographie en phase liquide, l'ionisation des solutés se fait à pression atmosphérique. **Plusieurs sources d'ionisation à pression atmosphérique (API) existent, les trois principales étant l'électrospray (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI).** Le choix entre ces trois sources d'ionisation se fait en fonction de la polarité et du poids moléculaire des composés d'intérêt (Figure 15). Par ailleurs, pour chacune d'elles, il existe deux modes d'ionisation : positif et négatif qui permettent de former des cations ou des anions respectivement. Le choix entre ces deux modes se fera selon le caractère basique ou acide des composés à détecter. Les molécules à caractère basique auront tendance à mieux s'ioniser en mode positif et les molécules à caractère acide ou neutre en mode négatif.

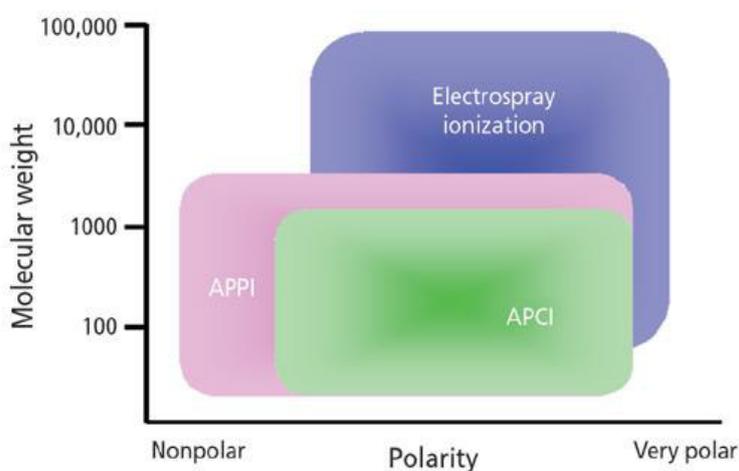


Figure 15 : Zones de masses moléculaires et de polarités adaptées à chacune des trois principales sources d'ionisation à pression atmosphérique [132]

**Une fois les analytes ionisés au sein de la source, ces derniers sont transmis à l'analyseur.** Il en existe plusieurs types présentant leurs propres avantages et inconvénients. Ils se distinguent par leurs grandeurs caractéristiques comme la sensibilité, la résolution, la vitesse d'acquisition ainsi que de la gamme de  $m/z$  bien que cette dernière dépende également de la source d'ionisation. Le Tableau 2 reprend les performances de certains analyseurs. Les valeurs indiquées sont des moyennes et dépendent de la façon dont est utilisée l'instrument. Il existe également des spectromètres de masse hybrides qui incluent plusieurs analyseurs. Dans le cadre de cette thèse, et plus globalement pour la caractérisation de mélanges complexes, il est nécessaire de travailler avec un appareil ayant **une résolution et une précision sur la mesure suffisantes** afin d'être dans la capacité de séparer des ions avec des rapports  $m/z$  proches ainsi que de pouvoir remonter aux formules brutes des analytes. Certains analyseurs, comme le temps de vol (TOF), opèrent à résolution relativement constante tandis que d'autres, comme le FT-ICR, ont un pouvoir de résolution qui diminue avec le rapport  $m/z$ . Aujourd'hui, le FT-ICR est l'un des analyseurs les plus performants en matière de résolution qui peut atteindre les 2 700 000 (à  $m/z$  400) avec un aimant de 21 T [111]. Des résolutions allant jusqu'à 20 M peuvent également être atteintes avec un nouveau type de FT-ICR, nommé MRMS (*Magnetic Resonance Mass Spectrometry*). Cependant, la résolution de ce type d'analyseur étant dépendante du temps d'acquisition, une telle résolution ne peut être obtenue qu'en introduction directe de l'échantillon. Une bonne sensibilité est également cruciale afin de détecter le maximum de composés

présents dans la matrice initiale même à de très faibles concentrations. Une fois l'attribution des formules brutes réalisée, il reste pour chaque composé détecté des centaines de possibilités en termes de structure moléculaire. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, la **spectrométrie de masse aura pour but d'apporter des renseignements sur la structure des analytes grâce à des expériences de fragmentation**. La fragmentation peut être réalisée soit de manière spatiale via plusieurs analyseurs comme les Q-q-Q (quadripôle – cellule de collision – quadripôle) où le premier quadripôle permet de sélectionner l'ion parent, puis ce dernier est fragmenté dans une cellule de collision et enfin le troisième quadripôle permet l'acquisition des spectres MS/MS. Avec ce type de configuration, une seule étape de fragmentation est possible. La fragmentation peut également avoir lieu au sein d'un même analyseur comme avec les pièges ioniques (IT) en effectuant les différentes étapes, isolation, fragmentation et analyse des ions fils, à des temps différents. Dans ce cas, les expériences de fragmentation peuvent être répétées de manière successive, on parle de MS<sup>n</sup>.

Tableau 2 : Principales performances des analyseurs

Analyseur	Résolution	Exactitude	Vitesse d'acquisition
IT	< 5 000	50-200 ppm	++++
Q	< 5 000	50-200 ppm	++++
TOF	30 à 100 k ( $m/z > 1000$ )	< 5 ppm	++++
FT-Orbitrap	1 M ( $m/z 200$ )	< 1 ppm	++
FT-ICR	1 à 3 M ( $m/z 400$ )	< 1 ppm	+
MRMS	20 M ( $m/z 400$ )	< 0,6 ppm	+

#### 4.2. Couplage LC/MS : spécificités et problématiques

Les performances d'un couplage LC/MS donné peuvent être améliorées à deux niveaux :

- amélioration des performances de la partie séparative en matière de résolution et/ou en temps d'analyse
- amélioration des performances de la partie MS au niveau de la sensibilité et de la résolution.

Toutefois, la mise en place d'un tel couplage nécessite de réaliser **un certain nombre de compromis** tant au niveau LC qu'au niveau MS. L'enjeu est de développer :

- (1)** une méthode séparative qui permette de séparer un maximum de composés présents dans un mélange complexe
- (2)** une interface entre LC et MS optimale en termes de débit en sortie de colonne LC et de composition de phase mobile compatible avec la source d'ionisation employée. D'une façon générale, l'ESI est considéré comme plus délicate à coupler avec la LC que l'APCI car plus sensible à la composition et au débit du solvant. Néanmoins, l'ESI est employé dans 90% des applications en LC/MS [133].
- (3)** des conditions d'ionisation MS optimales adaptées à la composition du flux liquide entrant dans le spectromètre, celles-ci évoluant au cours d'une analyse.

#### 4.2.1. Influence de la composition de la phase mobile

Le choix de la composition de la phase mobile requiert une attention particulière. En effet, la détection MS n'est pas compatible avec tous les solvants et additifs qui sont couramment utilisés en LC. De nombreuses études ont démontré l'impact de la composition de la phase mobile sur l'efficacité d'ionisation en ESI, APCI et APPI [134–137].

**En ESI**, le solvant employé doit d'une part avoir une constante diélectrique suffisante afin de former des gouttelettes chargées ; les solvants compatibles avec l'ESI sont polaires ou moyennement polaires. D'autre part, l'efficacité de ces gouttelettes à former des ions est dépendante de la tension de surface et de la volatilité de la phase mobile. Ainsi, la sensibilité des composés dissous dans de l'eau sera moindre par rapport à ceux dissous dans un solvant organique (méthanol, acétonitrile) [134,137,138]. D'une façon plus générale, la réponse en ESI aura tendance à augmenter avec la proportion de solvant organique. Une majorité des analyses LC/ESI-MS est réalisée avec un système de séparation en phase inverse (non-polaire). La phase mobile consiste le plus souvent en un gradient d'élution eau/solvant organique. Les composés peu polaires qui sont les plus retenus seront plus facilement ionisés que les composés plus polaires car ils seront élués avec un pourcentage plus important de solvant organique. Dans cette même optique, la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC) apparaît comme une alternative intéressante pour l'analyse des composés polaires. En effet, les phases stationnaires utilisées en mode HILIC sont polaires (diol, aminopropyl, cyanopropyl, etc.) et permettront donc d'éluer les composés polaires avec un plus haut pourcentage de phase mobile organique [61,139,140]. Par ailleurs, bien que très employés en LC, il n'est pas recommandé d'utiliser des tampons non-volatils avec l'électrospray. Toutefois, ces derniers peuvent être remplacés par différents **additifs volatils** comme l'acide formique, l'acide acétique, l'hydroxyde d'ammonium ou encore l'acétate d'ammonium. Leur concentration doit dans tous les cas rester assez faible pour ne pas entrer en compétition avec l'analyte (de préférence inférieure à 10 mM dans la phase mobile). L'acide trifluoroacétique (TFA), bien que volatil est également à éviter car il provoque souvent une forte suppression d'ions en mode positif et de nombreux adduits en mode négatif [134,141]. La réponse des composés en **ESI dépend donc du solvant et des additifs employés mais bien évidemment également de l'analyte lui-même** ( $pK_a$ , polarité, activité de surface). L'équipe de Huffman a étudié la réponse d'un panel de composés en ESI négatif en fonction du type de solvant [136]. Deux solvants protiques (eau et méthanol) et deux solvants aprotiques (acétonitrile et acétone) couramment utilisés en LC ont été sélectionnés pour cette étude. La Figure 16 représente le logarithme de la réponse des composés dans le méthanol divisé par la réponse dans les autres solvants. Une valeur positive signifie donc que le méthanol permet d'obtenir une meilleure réponse et inversement. Sur 48 composés, 32 ont une meilleure réponse avec le méthanol ce qui est en accord avec la théorie. Quelques acides tels que des acides carboxyliques ont de façon surprenante obtenu une meilleure réponse avec de l'eau comme solvant. De plus, cet histogramme permet de montrer que l'acidité et la polarité seules ne permettent pas de prédire la réponse des composés en ESI négatif. Globalement sur l'ensemble des composés étudiés, le méthanol permet d'obtenir les meilleures réponses, suivi par l'eau puis l'acétonitrile et enfin l'acétone. Cette même équipe a aussi montré l'effet des groupements fonctionnels sur la réponse en ESI négatif.

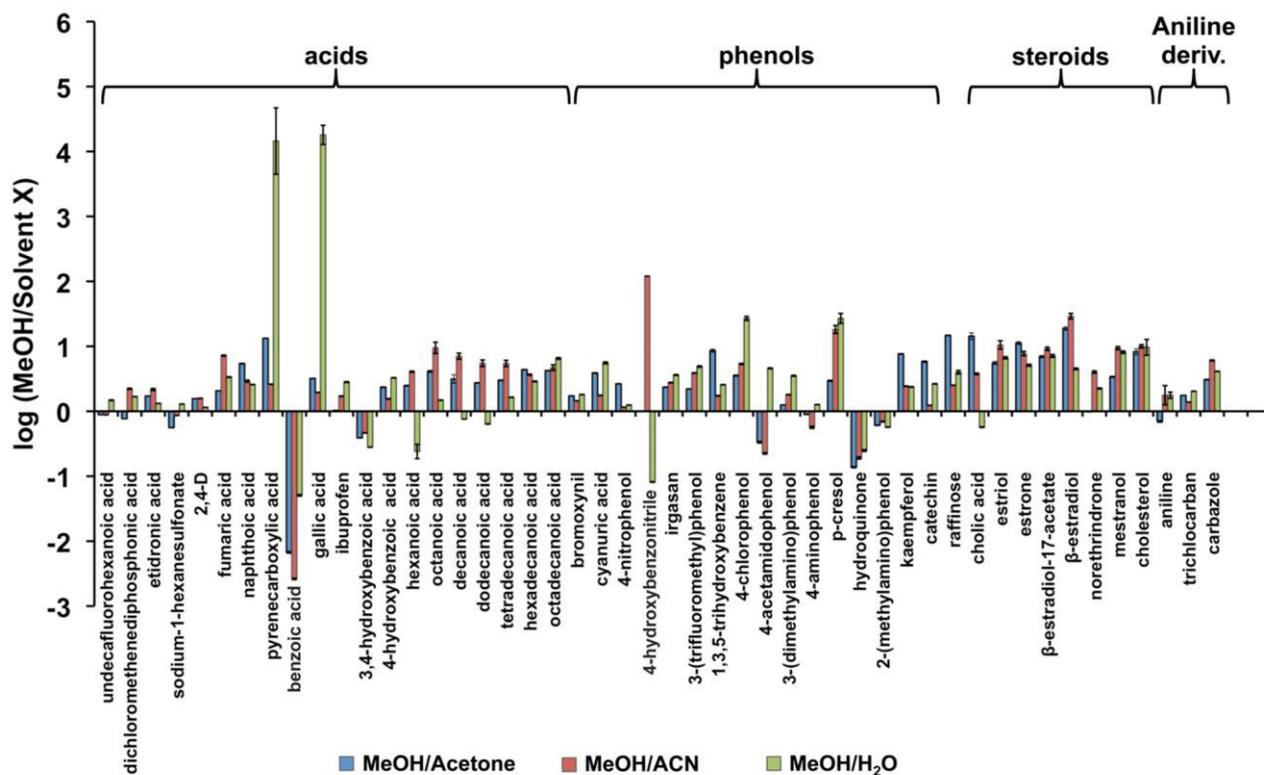


Figure 16 : Logarithme de la réponse relative des composés à 10 µM par rapport au méthanol (injection en flux continu (FIA) dans différents solvants) [136]

A l'inverse de l'ESI, il est possible d'utiliser des solvants polaires mais aussi non-polaires en **APCI**. Ainsi, plusieurs équipes ont choisi l'APCI pour coupler la chromatographie en phase normale à la spectrométrie de masse [142]. La condition principale en **APCI positif** est que l'**affinité protonique** de la phase mobile doit être la plus basse possible afin de ne pas entrer en compétition avec les analytes. Le Tableau 4 présente les énergies d'ionisation (IE) ainsi que les affinités protoniques (PA) de quelques solvants utilisés en LC et des principaux gaz atmosphériques. Ainsi, il est préférable d'utiliser le méthanol plutôt que l'acétonitrile car il a une affinité protonique inférieure [135]. En **APCI négatif**, l'ionisation va dépendre de l'**acidité de la phase gazeuse** [134]. Les analytes ayant une acidité en phase gazeuse plus importante que celle des additifs vont pouvoir être ionisés par transfert de proton. Pour les analytes ne pouvant pas être ionisés par déprotonation, il est parfois possible de les ioniser à l'aide d'adduits. À titre d'exemple, l'ajout de 0,5% de chloroforme directement dans la phase mobile a permis d'ioniser efficacement des carbohydrates [68]. Enfin, la source d'ionisation APCI permet d'utiliser des additifs en plus grande quantité que l'ESI (jusqu'à 100 mM).

De la même façon qu'en APCI, il est possible d'utiliser des solvants à la fois polaires et non-polaires en **APPI**. Ici, l'ionisation est initiée par le rayonnement d'une lampe UV. Le plus souvent, une lampe krypton est utilisée, ce qui permet d'émettre des photons à 10,0 et 10,6 eV. Les analytes avec une **énergie d'ionisation** inférieure à 10 eV pourront être directement ionisés, toutefois pour un meilleur rendement d'ionisation ou pour les composés n'ayant pas de chromophores, il est préférable d'ajouter un dopant. Ce dopant doit avoir une IE inférieure à 10 eV, les plus utilisés sont l'acétone, le toluène et l'anisole [134]. Le Tableau 3 présente les IE des gaz, solvants, dopants et les énergies émises par les lampes UV [130]. Un choix avisé du solvant pourra permettre de réduire le bruit de fond en diminuant l'ionisation des composés interférents. En ce qui concerne les additifs, bien que

l'APPI tolère des concentrations plus importantes que l'ESI, une meilleure sensibilité est obtenue lorsque ces derniers sont en faible quantité.

**Tableau 3 : Energies d'ionisation des gaz API, solvants LC, dopants et énergies émises par les lampes UV [130]**

Atmosphère API		Solvants LC			Dopants			Lampe UV	
Air	IE (eV)	S	IE (eV)	PA (kJ · mol <sup>-1</sup> )	D	IE (eV)	PA (kJ · mol <sup>-1</sup> )	Gaz	IE (eV)
N <sub>2</sub>	15,58								
CO <sub>2</sub>	13,78								
H <sub>2</sub> O	12,62	H <sub>2</sub> O	12,62	691					
		CH <sub>3</sub> CN	12,20	779					
O <sub>2</sub>	12,07							Ar	11,8
		CHCl <sub>3</sub>	11,37	-					11,6
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	11,33	-					
		HCO <sub>2</sub> H	11,33	742					
		CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	10,65	784					
		CH <sub>3</sub> OH	10,84	754				Kr	10,64
		C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	10,48	776					
		<i>i</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	10,17	793					
		<i>n</i> -C <sub>8</sub> H <sub>14</sub>	10,13	665					
		NH <sub>3</sub>	10,07	854					
		<i>n</i> -C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	9,93	-					
		<i>i</i> -C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	9,89	-				Kr	10,03
					Acétone	9,70	812		
					THF	9,40	822		
					Benzène	9,24	750		
					DMSO	9,10	884		
					Chlorobenzène	9,07	753		
					Bromobenzène	9,00	754		
					Toluène	8,83	784	Xe	8,4
					Anisole	8,20	840		

En résumé, il a été démontré que la composition de la phase mobile avait un impact important sur l'efficacité d'ionisation en ESI, APCI et APPI. De par la complexité des mécanismes d'ionisation, il est impossible d'obtenir des règles universelles quant à l'optimisation de la nature de la phase mobile en LC/MS. Cependant, en fonction du mode de chromatographie et de la source d'ionisation choisis, il est tout de même envisageable de s'orienter vers quelques solvants qui semblent être adéquats.

#### 4.2.2. Choix de la géométrie de la colonne chromatographique et débit de la phase mobile

Le débit de la phase mobile est également un paramètre important, notamment en ESI. Les sources electrospray actuelles peuvent fonctionner avec un débit allant jusqu'à 1 mL/min, cependant le débit optimal se situe entre 100 et 400 µL/min. En effet, avec un débit trop important, des gouttelettes plus volumineuses sont produites. Il faudra alors plus de temps pour évaporer le solvant et ioniser les analytes. Ainsi, afin d'améliorer le rendement d'ionisation et donc la sensibilité du spectromètre de masse tout en gardant un débit optimal pour le système séparatif, un diviseur de flux, appelé split, est souvent ajouté à la sortie du détecteur UV [143–145]. Il est également possible, si le système chromatographique le permet en matière de dispersion externe, d'utiliser des colonnes chromatographiques avec un diamètre interne égal ou inférieur à 2,1 mm autorisant l'utilisation de débits inférieurs à 300 µL/min directement adaptés à la spectrométrie de masse [146–148]. À l'inverse de l'ESI dont la réponse est concentration dépendante, l'APCI est dépendante de la quantité d'analyte qui entre dans la source et peut fonctionner à des débits plus importants (entre 0,5 et 2 mL/min). Concernant l'APPI, des études ont montré que le signal diminue significativement avec

des hauts débits [149]. Le débit optimal a été évalué à 200 µL/min (sur une source APPI Sciex et une source d'Agilent). Une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est la perte de photons disponibles via leur absorption par le solvant. Le débit du dopant est également un paramètre clé et doit être optimisé. Son débit optimal est d'environ 1/10 du débit du solvant LC [150]. À noter toutefois que les débits optimaux des sources sont également fortement dépendants de leur géométrie.

#### 4.2.3. Influence des solvants « *make-up* »

Un solvant appelé *make-up* peut être ajouté entre la sortie du détecteur UV et l'entrée de la source d'ionisation. Ce solvant peut avoir plusieurs objectifs. En fonction du type de chromatographie en phase liquide employé, le pourcentage de solvant organique en sortie du système LC peut être insuffisant pour ioniser les analytes. Il peut donc être intéressant d'ajouter un débit de méthanol par exemple en sortie du détecteur UV. L'intérêt est également de conserver une méthode LC optimale et d'adapter le débit de phase mobile sortant à la source d'ionisation sans modifier la séparation. Toutefois, lorsqu'un *make-up* est ajouté, il est parfois nécessaire de splitter dans un premier temps pour ne pas avoir des débits trop importants en entrée de la source d'ionisation, en particulier avec l'électrospray. Le second rôle que peut avoir un solvant *make-up* est d'orienter l'ionisation vers la formation de certains ions et ainsi parvenir à **l'obtention d'un seul type d'ion moléculaire**. On peut par exemple imaginer ajouter un *make-up* contenant du chlorure de sodium, ce qui conduirait à la formation d'ions  $[M+Na]^+$  en mode positif. L'ionisation serait alors contrôlée. Dans le cas où l'additif ajouté ne modifierait pas la rétention des analytes, ce dernier peut être ajouté directement dans la phase mobile. **Il se peut également qu'une famille de composés ne s'ionise pas ou peu, le solvant *make-up* peut alors se présenter comme une solution** [151]. Des études ont par exemple montré que les sucres peuvent être analysés en APCI négatif avec l'ajout de chloroforme [68]. Toutefois, l'effet des *make-up* n'est pas toujours bien connu. Une étude a par exemple démontré que l'ajout d'acide faible comme l'acide acétique ou l'acide formique en ESI négatif pouvait permettre un gain en sensibilité pouvant être potentiellement lié à la modification de la tension de surface des gouttelettes [152]. Cette même étude a reporté qu'en ESI négatif, un *make-up* devait (1) apporter des cations pouvant facilement subir une réduction (2) produire des anions avec une grande affinité protonique en phase gazeuse et (3) être de petite taille.

Pour résumer, le Tableau 4 reprend les principales conditions d'utilisation des sources d'ionisation à pression atmosphérique.

Tableau 4 : Résumé des conditions d'utilisation des 3 sources d'ionisation

Source	Gamme de débit opt.	Nature de la phase mobile	Concentration <i>make-up</i> /dopant	Propriétés majeures qui guident l'ionisation
ESI	< 500 µL/min	Polaire	< 10 mM	- Tension de surface et pH du solvant - pKa de l'analyte
APCI	500 – 2000 µL/min	Polaire et apolaire	< 100 mM	- Affinité protonique (mode pos.) - Acidité en phase gazeuse (mode neg.)
APPI	≈ 200 µL/min	Polaire et apolaire	1/10 du débit total	- Energie d'ionisation

### 4.3. Le couplage de la spectrométrie de masse avec la LC *versus* la SFC

On a pu noter au cours de l'état de l'art sur l'analyse des échantillons issus de la biomasse lignocellulosique ou des coupes pétrolières, que la SFC pouvait être pertinente pour leur caractérisation.

#### 4.3.1. Principe de la SFC

La SFC est une technique chromatographique basée sur l'utilisation d'un fluide supercritique en tant que phase mobile ayant une densité comprise entre celle d'un gaz et celle d'un liquide. Après plusieurs évolutions, la SFC utilise aujourd'hui des **colonnes de séparation remplies** de manière similaire à la LC, **du CO<sub>2</sub> et un gradient de co-solvant** (principalement méthanol, acétonitrile et éthanol avec ou sans additifs) pour éluer les analytes. Afin de maintenir la phase mobile dans état supercritique ou subcritique, la température est régulée et la pression est maintenue grâce à un régulateur de contre-pression, nommé ABPR (*Automatic back-pressure regulator*). Les conditions critiques sont dépendantes de la composition du fluide, pour le CO<sub>2</sub> pur, elles sont de 73 bar et 31°C. La modification de la composition de la phase mobile entraîne une modification de ces valeurs critiques comme présenté Figure 17 dans le cas de mélanges CO<sub>2</sub>/MeOH [153]. Par ailleurs, pour une température et une pression données, **l'augmentation de la proportion de co-solvant** au cours du gradient va induire **une modification de la densité de la phase mobile** et donc une augmentation du pouvoir éluant.

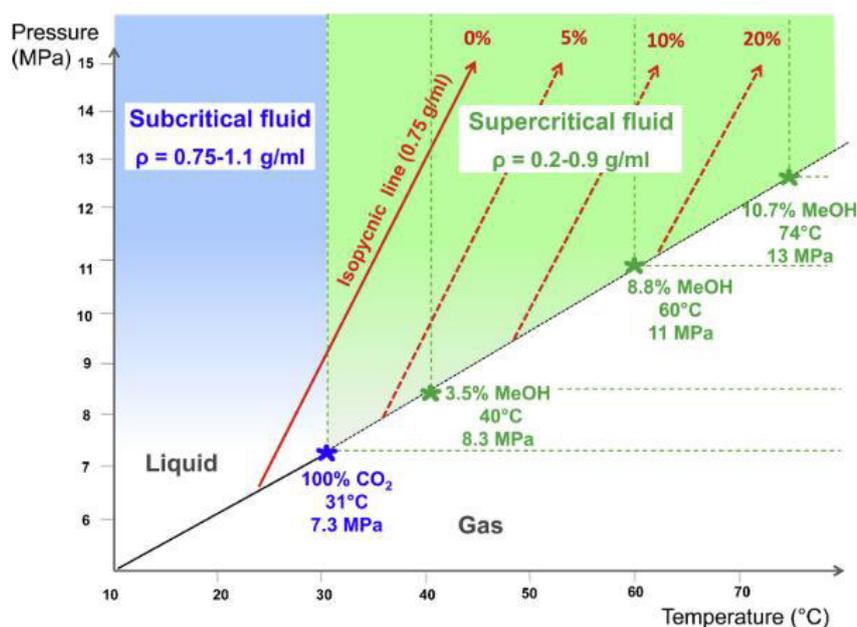


Figure 17 : Diagramme de phases du CO<sub>2</sub> en bleu et pour des mélanges CO<sub>2</sub>/MeOH en vert [153]

Par ailleurs, **le large choix de phases stationnaires** utilisables en SFC permet d'atteindre des sélectivités variées. West *et al.* ont proposé une méthode de classification des phases stationnaires, notamment via le modèle LSER (*Linear Solvation Energy Relationship*) basé sur les descripteurs d'Abraham [154,155]. La projection des coefficients du modèle à l'aide d'un « spider diagram » permet de regrouper les phases stationnaires ayant des mécanismes de séparation proches (Figure 18) [154]. Lors du développement d'une méthode, on peut alors sélectionner plusieurs colonnes appartenant à des régions différentes du diagramme afin de couvrir un large panel d'interactions.

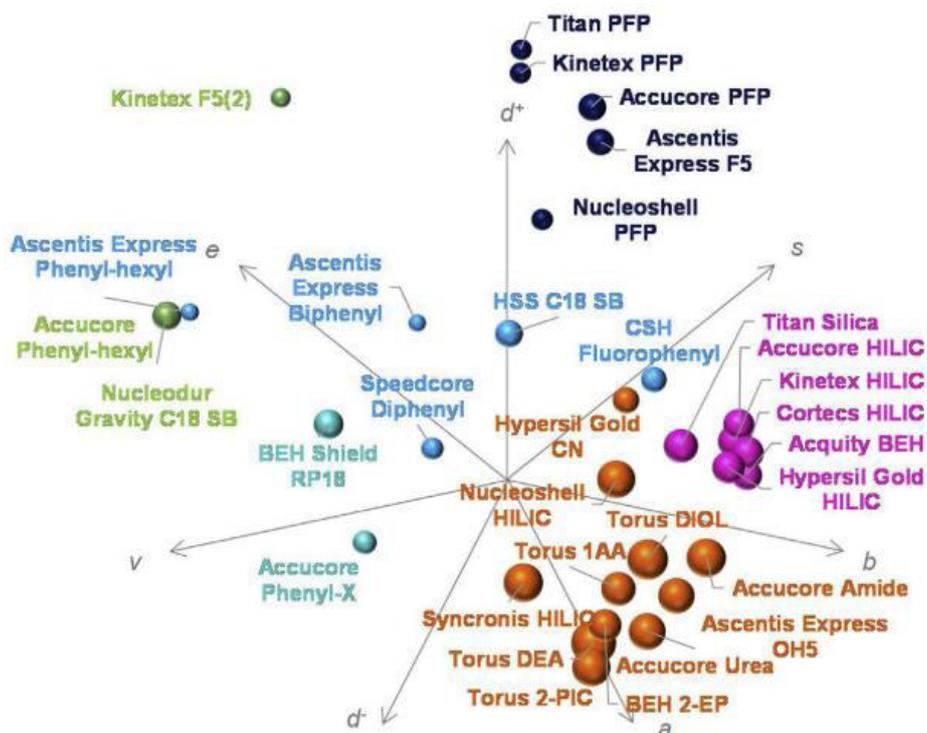


Figure 18 : Classification de phases stationnaires par la méthode LSER (interactions e :  $\pi$ - $\pi$  ; s : dipôle-dipôle ; a : hydrogènes avec acides ; b : hydrogènes avec bases ; v : dispersives (dipôle induit),  $d^+$  et  $d^-$  : ioniques) [154]

#### 4.3.2. Couplage SFC/MS

De la même façon que ce qui a été décrit précédemment pour la LC/MS, la composition et le débit de la phase mobile devront être compatibles avec la source d'ionisation utilisée lors du couplage SFC/MS.

Toutefois, certaines spécificités supplémentaires sont à prendre en compte.

L'une d'elles est liée à l'utilisation d'un fluide dans un état supercritique en tant que phase mobile qui va subir une **décompression** à l'entrée de la source d'ionisation. Cette décompression va engendrer un **risque de précipitation des analytes**, en particulier en début d'analyse lorsque le pourcentage de co-solvant est faible. Pour pallier cette éventualité, un solvant *make-up* peut être ajouté en amont de l'introduction dans la source d'ionisation. De plus, cette décompression est un **phénomène endothermique** qui va créer un spray à une température de l'ordre de  $-70^\circ\text{C}$  dans le cas du  $\text{CO}_2$  pur, ce qui peut obstruer les capillaires. En couplage avec l'APCI ou l'APPI, la température de la source peut être augmentée pour limiter ce risque. En revanche, il sera plus difficile de réaliser le couplage SFC/MS avec l'ESI lorsque l'on ne dispose pas d'une source chauffée. L'arrivée de la phase mobile pourra se faire par à-coups lorsque de la glace se forme puis se brise grâce à la pression. Ce phénomène se traduira par l'obtention d'un signal craté. Un troisième risque lié à la décompression de la phase mobile est la **séparation des phases entre le  $\text{CO}_2$  et le co-solvant ou le *make-up*** qui pourrait entraîner des élargissements de pics jusqu'à la perte de la séparation chromatographique [156].

Dans la littérature, on retrouve principalement deux configurations pour le couplage SFC/MS qui sont présentées en Figure 19. Dans les deux cas, l'ajout d'un solvant *make-up* limitant le risque de précipitation des analytes est possible en sortie du détecteur UV.



Figure 19 : Configurations des interfaces SFC/MS commerciales

Ces deux interfaces se différencient de par la position de l'ABPR. En effet, ce dernier est soit positionné dans la continuité entre l'UV et la MS (configuration B commercialisée par Agilent et Shimadzu) ou via un split après l'ajout du solvant *make-up* (configuration A commercialisée par Waters et Agilent). La configuration A présente l'avantage de délivrer un débit et une composition de phase mobile très adaptés à la source ESI, tandis que la configuration B, sans split, est plus adaptée pour des couplages avec l'APCI qui est une source dépendante de la quantité d'analyte [157].

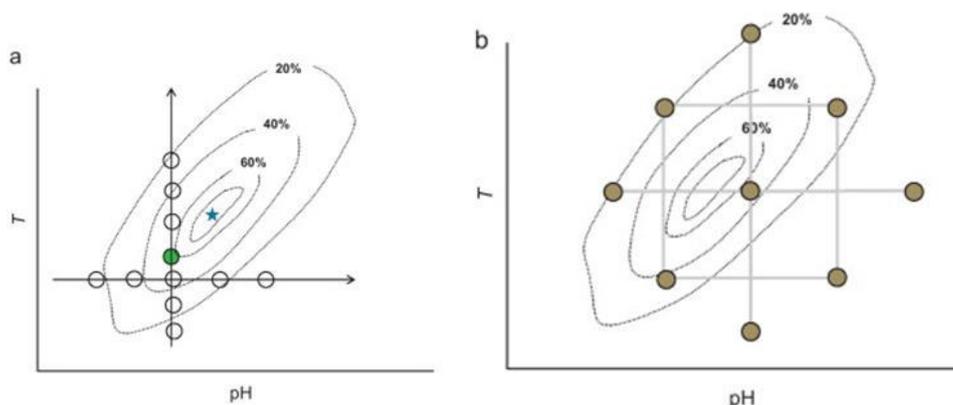
Une seconde spécificité du couplage SFC/MS, et plus particulièrement de la configuration A employant un split, est le contrôle du débit de solvant délivré dans la source d'ionisation. Selon l'équation de Poiseuille-Hagen, il est possible de prédire le débit de solvant entrant en MS [32]. Pour une méthode SFC donnée (une contre-pression et un débit de fluide fixés), la proportion de phase mobile entrant dans la source d'ionisation dépend de la viscosité du fluide. Cette viscosité a été estimée via des corrélations expérimentales par Ouyang [158] qui ont par la suite été appliquées dans le cadre du couplage SFC/MS par Grand-Guillaume Perrenoud *et al.* [159]. L'augmentation de la contre-pression ou la diminution de la température permettront d'augmenter le débit de phase mobile dirigée vers la MS et inversement. L'augmentation du pourcentage de co-solvant dans la phase mobile entraîne l'augmentation de la viscosité du fluide et donc la diminution du débit total (co-solvant + CO<sub>2</sub>) vers la source d'ionisation. En effet, pour compenser l'augmentation de la viscosité du système, l'ABPR va s'adapter en s'ouvrant de plus en plus pour maintenir une contre-pression constante. Ainsi, au cours d'un gradient allant de 0 à 40% d'acétonitrile, la viscosité augmentant, le débit total (incluant le CO<sub>2</sub>) entrant dans la source d'ionisation va diminuer. En revanche, le débit d'acétonitrile va quant à lui augmenter étant donné que sa fraction massique dans la phase mobile augmente [32].

Bien que le couplage SFC/MS semble moins évident à mettre en place que le couplage LC/MS, ce dernier a permis de gagner en sensibilité dans certains cas [159–162]. De plus, la **SFC peut être une méthode alternative à certains modes de LC peu compatibles avec l'ESI** comme la chromatographie en phase normale ou encore la NARP [153].

#### 4.4. Les plans d'expériences pour l'optimisation de méthode

**Un nombre important de paramètres est à optimiser lors de la mise en place d'une méthode LC/MS ou SFC/MS.** L'optimisation de chacun de ces paramètres peut se révéler fastidieuse. La procédure consistant à faire varier une variable à la fois ne garantit pas l'atteinte des conditions optimales [163]. Inversement, bien que très peu utilisée dans la littérature, **l'approche chimiométrique** repose sur un modèle expérimental **rationnel**, qui permet la variation simultanée de tous les paramètres expérimentaux. L'utilisation d'un plan d'expériences permet également de **déterminer le nombre d'expériences nécessaires et évite les redondances d'information**. Il peut également prendre en compte les possibles **interactions entre les différents paramètres**. La Figure 20 illustre l'interaction entre deux paramètres se traduisant par une réponse de surface avec une forme d'ellipse et non d'un cercle. L'optimisation « variable après variable » ne permet pas de

prendre en compte ces interactions et donc d'atteindre le réel optimum, tandis que le plan d'expériences présenté en Figure 20B permet de couvrir l'espace contenant cet optimum.



**Figure 20 : (a) Optimisation consistant à faire varier une variable à la fois (points ronds). Le point rempli correspond à l'optimum déterminé tandis que l'étoile correspond au réel optimum (b) Conception d'un plan composite centré [163]**

La première étape lors de la mise en place d'un plan d'expériences est de sélectionner les paramètres, appelés facteurs, que l'on souhaite étudier et préciser les valeurs que l'on souhaite leur donner. Ces valeurs sont appelées des niveaux, elles sont normalisées entre «-1» et «+1». Au vu du nombre de paramètres ajustables lors d'une acquisition MS<sup>1</sup>, c'est-à-dire en l'absence de fragmentation des ions produits, il est préférable de cibler à l'aide de notre expérience ceux influençant le plus le signal de sortie et de fixer les autres à une valeur moyenne. La seconde étape est de choisir la grandeur mesurée lors de l'essai, appelée réponse. Il peut par exemple s'agir du rapport signal/bruit (S/B). Ensuite, afin de choisir au mieux le plan d'expériences, il faut déterminer le modèle du comportement que l'on veut étudier. Il peut s'agir d'un modèle affine qui ne nécessite que 2 niveaux pour les facteurs. Dans le cas d'une étude des paramètres de spectrométrie de masse tels que la température de la source ou le débit de gaz nébulisant, le modèle pressenti est plutôt du type quadratique [164,165]. Deux niveaux d'étude ne sont alors pas suffisants, il faut attribuer un minimum de trois niveaux. Une fois le modèle choisi, l'étape suivante est de définir l'ensemble des essais, autrement dit le plan d'expériences. Il existe différents types de plans d'expériences possibles pour étudier l'impact des facteurs sélectionnés. Le plus simple, mais aussi le plus coûteux est le plan factoriel complet. Pour des facteurs avec 3 niveaux, il nécessite 3<sup>k</sup> expériences, avec k le nombre de facteurs. Pour l'étude de 5 facteurs, 243 expériences seraient nécessaires. C'est pourquoi, des plans particuliers ont été développés dans le but de réduire le nombre d'expériences. Concernant le domaine de l'analyse, on retrouve généralement dans la littérature le plan composite centré [166–169], le plan Box-Behnken [170] et le plan de Doehlert [171].

#### 4.5. Traitement, exploitation et visualisation des données multidimensionnelles

Le couplage d'une méthode séparative avec la spectrométrie de masse haute résolution génère un grand volume de données brutes qui doit être traité afin d'en extraire des informations pertinentes. Pour un couplage LC/MS avec une source et un mode d'ionisation, les données brutes sont à deux dimensions avec un spectre de masse pour chaque temps de rétention. Si une détection UV a également été utilisée, ces données contiennent alors trois dimensions. Comme mentionné dans ce chapitre, il n'est pas rare d'employer plusieurs sources d'ionisation à la fois en modes positif et négatif. Dans ce cas, le nombre de données brutes bi ou tridimensionnelles est multiplié par le nombre de sources et modes d'ionisation utilisés.

L'ensemble des étapes décrites ci-dessous sont réalisables avec plusieurs outils disponibles en ligne tels que MZmine, XCMS ou encore la toolbox Matlab.

#### 4.5.1. Traitement des données brutes LC/MS ou SFC/MS

Le premier objectif est d'obtenir **une liste de temps de rétention associés à un rapport  $m/z$  ainsi qu'à une intensité ou une aire**. En l'état, les spectres de masse sont sous forme de profils, c'est-à-dire que les pics sont sous la forme d'un signal continu. Il est donc nécessaire de déterminer le sommet de chaque pic de masse, souvent assimilé comme gaussien, et donc de transformer les données sous forme centroïde (en valeurs discrètes). Cette étape est connue sous le nom de « **peak-picking** ». La manière dont est réalisée ce *peak-picking* via différents algorithmes a un impact direct sur l'erreur de mesure faite en masse et donc sur la qualité de la liste des formules brutes qui sera produite par la suite.

Une fois le rapport  $m/z$  de chaque pic sur les spectres de masse déterminé, il est également nécessaire de déterminer un ou plusieurs temps de rétention pour chaque  $m/z$ . Pour cela, chaque ion est extrait (EIC : extracted ion chromatogram) afin de tracer des chromatogrammes pour chacun d'entre eux. Une fois encore, l'apex de chaque pic chromatographique doit être déterminé. Dans le cas où un même rapport  $m/z$  présente plusieurs pics chromatographiques par exemple lors de la séparation d'isomères, une étape de déconvolution des EIC doit être effectuée.

Enfin, lorsque plusieurs sources d'ionisation ont été utilisées ou simplement pour comparer plusieurs échantillons, les listes incluant les temps de rétention associés à un rapport  $m/z$  et une intensité peuvent être alignées en déterminant une tolérance à la fois pour le temps de rétention et le rapport  $m/z$ .

A partir de cette étape, des cartographies appelées « *mass map* » représentant un nuage de points avec en abscisse le temps de rétention, en ordonnée le rapport  $m/z$  et une échelle de couleur pour l'intensité, peuvent être tracées.

#### 4.5.2. Identification des formules brutes

Pour chaque rapport  $m/z$ , **des formules brutes peuvent être assignées par combinaison linéaire d'éléments**. En fonction de l'incertitude de mesure qui dépend à la fois de l'analyseur, du mode de calibration et du *peak-picking*, plusieurs formules brutes peuvent être possibles pour un rapport  $m/z$ . Afin de limiter le nombre de combinaisons possibles, plusieurs critères peuvent être appliqués. Kind et Fiehn ont mis en place 7 règles permettant d'exclure les formules brutes les moins probables : restrictions du nombre d'éléments, respect des règles de Lewis et Senior concernant le nombre de valence, distinction du massif isotopique, ratio H/C, ratios (azote, oxygène, phosphore, soufre)/C, restriction si plusieurs ratios élevés et enfin vérification de la présence de groupes tétraméthylsilane (TMS) pour les couplages GC/MS ou d'adduits pour les couplages LC/MS [172]. Pour déterminer les gammes des différents ratios, une étude à partir de 45000 formules entre 30 et 1500 Da issues de la base de données Wiley a été réalisée (Tableau 5). En fonction des matrices analysées et des connaissances acquises, il est également possible de restreindre d'autant plus les gammes.

Tableau 5 : Gammes des ratios entre éléments pour 45000 formules issues de la base de données Wiley allant de 30 à 1500 Da [172]

Element ratios	Common range (covering 99.7%)	Extended range (covering 99.99%)	Extreme range (beyond 99.99%)
H/C	0.2–3.1	0.1–6	< 0.1 and 6–9
F/C	0–1.5	0–6	> 1.5
Cl/C	0–0.8	0–2	> 0.8
Br/C	0–0.8	0–2	> 0.8
N/C	0–1.3	0–4	> 1.3
O/C	0–1.2	0–3	> 1.2
P/C	0–0.3	0–2	> 0.3
S/C	0–0.8	0–3	> 0.8
Si/C	0–0.5	0–1	> 0.5

La Figure 21 montre que le nombre de formules brutes possibles est dépendant de la masse mesurée. En effet, plus la masse est élevée et plus le nombre de combinaisons linéaires d'éléments est grand. Par ailleurs, cette même figure démontre l'intérêt d'utiliser des critères restrictifs lors de la détermination de la formule brute.

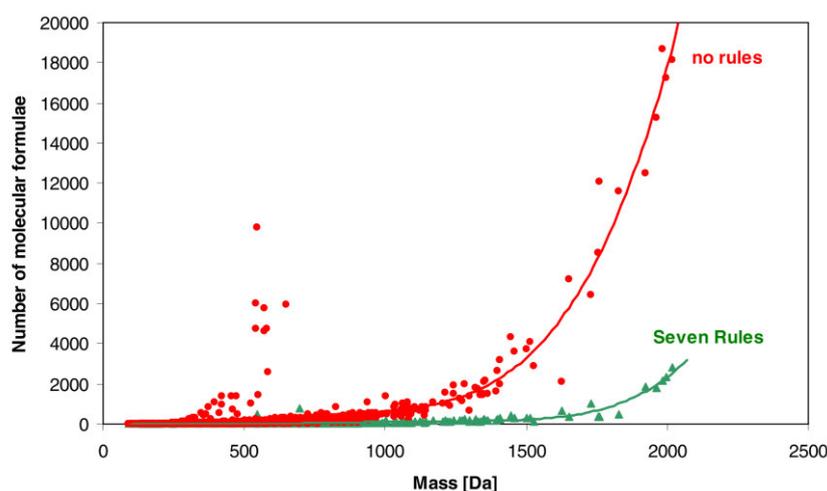


Figure 21 : Nombre de formules brutes possibles avec et sans les 7 règles mises en place en fonction de la masse mesurée pour 1200 molécules choisies aléatoirement (tolérance de 3 ppm en masse et  $\pm 5\%$  d'erreur sur l'intensité de l'isotope) [172]

La détermination des formules brutes permet de nouvelles représentations des données comme les diagrammes de van Krevelen qui permettent de regrouper les analytes par familles chimiques en fonction de leur rapport O/C et H/C. Pour les matrices pétrolières, des graphiques représentant le nombre d'insaturations en fonction du nombre d'atomes de carbone sont également souvent utilisés.

#### 4.5.3. Exploitation des données MS<sup>n</sup>

La formule brute seule ne permet pas d'identifier un composé. En effet, il reste **pour chaque analyte détecté une dizaine à plusieurs centaines de possibilités de structures moléculaires possibles**. Des acquisitions MS<sup>2</sup> ou plus sont donc nécessaires afin d'apporter des informations structurales et donc de diminuer le nombre de candidats possibles (Figure 22). Par ailleurs, nous avons vu précédemment des critères restrictifs lors du calcul de la formule brute pour chaque masse mesurée ; la MS<sup>2</sup> est également parfois employée comme critère restrictif complémentaire.

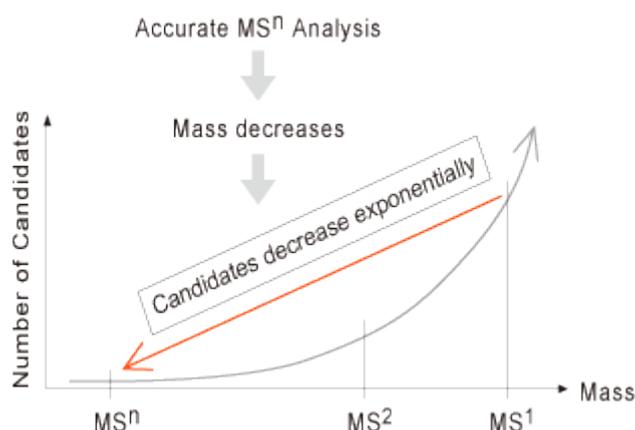


Figure 22 : Nombre de candidats en fonction du type d'acquisition MS réalisé [173]

A l'inverse de la GC/MS où l'utilisation d'une source à ionisation électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV garantit des spectres de fragmentation répétables indépendamment des conditions opératoires et comparables d'un instrument à l'autre, les analyses MS/MS réalisées en couplage avec la LC sont fortement **dépendantes des conditions opératoires et du spectromètre de masse employé**. Une difficulté supplémentaire avec la fragmentation CID est que les spectres de fragmentation obtenus sont également très dépendants de la géométrie de la zone de collision et de l'énergie de collision choisie. Comme déjà mentionné, en fonction du ou des types d'analyseurs, la fragmentation aura lieu soit de manière spatiale ou temporelle. On peut distinguer ainsi deux types de fragmentation CID : (1) celle qui se produit dans un piège à ions (cas du LTQ) où la fragmentation s'effectue à la fréquence de résonance de la molécule générant uniquement des ions fragments directement issus de l'ion précurseur, et soumise aux contraintes des domaines de stabilité de trajectoire des ions dans un piège ionique avec un low-mass cut off (le plus petit ion pouvant être piégé) égal à 1/3 de la masse isolée ; (2) la CID qui se produit dans une cellule de collision (cas du timsTOF de Bruker) où la fragmentation s'effectue par collision avec un gaz inerte (généralement azote ou argon), qui peut générer des ions fils et petit-fils mais n'est soumise à aucun cut-off, d'où des spectres plus riches. En raison de toutes ces variabilités instrumentales, les spectres de fragmentation sont souvent réalisés avec plusieurs énergies de collision différentes ou alors avec une rampe d'énergie afin de couvrir au mieux le champ des possibilités en termes de fragmentation. Par ailleurs, avec les sources à pression atmosphérique, plusieurs types d'ions pour une même molécule peuvent se former (ion moléculaire protoné, sodiaté, etc.). Chacun de ces ions aura un spectre de fragmentation différent, ce qui ajoute une difficulté supplémentaire. Cette variabilité des spectres de fragmentation rend la comparaison avec des spectres de masse de référence difficile, s'ils n'ont pas été acquis dans les mêmes conditions expérimentales.

La comparaison des spectres de fragmentation pourra se faire selon deux approches en fonction de la construction de la base de données. La première approche consiste à comparer les spectres de masse expérimentaux avec d'autres spectres de masse acquis expérimentalement à l'aide de composés étalons. Il existe de nombreuses bases de données en ligne, gratuites pour certaines, payantes pour d'autres. Les nombres de spectres de masse et de molécules sont très variables d'une base de données à l'autre, allant d'une centaine de molécules à plusieurs milliers. Cette différence provient du fait que certaines bases se sont focalisées sur une famille de composés très spécifiques. Une majeure partie des bases a été développée pour l'identification de biomolécules. L'utilisation de bases de données construites à l'aide de spectres expérimentaux reste limitée, d'autant plus pour

des applications spécifiques comme pour l'identification de composés présents dans les matrices ex-biomasse. Une seconde approche consiste à simuler les spectres de fragmentation des molécules grâce par exemple aux énergies de liaison. Les bases de données *in silico* sont construites selon ce principe. Ces spectres de fragmentation sont ensuite comparés aux spectres de masse expérimentaux.

Malgré l'intérêt que peuvent avoir les bases de données expérimentales ou *in silico*, la première étape lors de la fragmentation d'analytes issus d'échantillons encore mal connus reste le **dépouillement manuel des spectres de fragmentation**.

#### 4.6. Conclusion

Bien que très prometteur pour l'analyse de mélanges complexes, le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse demande un certain travail de développement où certains compromis doivent parfois être faits. En effet, selon la source d'ionisation à pression atmosphérique employée, des restrictions en termes de débit, polarité de la phase mobile, concentration en sels doivent être prises en compte. Ceci est également vrai pour d'autres couplages comme le couplage de la SFC à la MS. Par ailleurs, le grand nombre de paramètres expérimentaux peut rendre l'optimisation laborieuse lorsque ces derniers sont optimisés l'un après l'autre. En revanche, une optimisation à l'aide de plans d'expériences paraît pertinente, d'autant plus que cette approche chimiométrique permet de prendre en compte les interactions entre les facteurs.

Enfin, le traitement des données à plusieurs dimensions peut également apparaître comme un verrou. Bien que des outils permettent de traiter des données LC/MS pour obtenir une liste de formules brutes associées à un temps de rétention et une intensité, l'exploitation des données de fragmentation afin d'obtenir une formule développée est en revanche beaucoup moins décrite.

Dans cette partie le traitement des données de type LC×LC/MS n'a pas été mentionné. Bien que le logiciel « GC image LC×LC edition » (GC image, LLC) permette de visualiser les données de ce type, à l'heure actuelle, les seules façons de traiter de façon maîtrisée ces données sont soit de traiter individuellement chaque modulation ou de développer soi-même des outils permettant de visualiser et traiter des fichiers à trois dimensions.

### 5. Conclusion du chapitre

Ce chapitre propose un bilan des travaux de la littérature portant sur l'analyse moléculaire des molécules oxygénées et des sucres présents dans les mélanges issus de la biomasse lignocellulosique, ainsi que pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les coupes pétrolières lourdes du type distillats sous vide. Un challenge analytique demeure pour caractériser ces différents échantillons particulièrement complexes. En effet, les échantillons ex-biomasse contiennent des **composés oxygénés ayant une grande variété de fonctions chimiques sur une large gamme de polarité et de masse moléculaire**. Les distillats sous vide quant à eux renferment des **milliers d'analytes hydrocarbonés, soufrés et azotés avec des hauts poids moléculaires**. Ces propriétés limitent grandement l'utilisation des techniques usuellement employées comme la GC/MS. Ces dernières années, la spectrométrie de masse haute résolution a permis de considérablement avancer dans la connaissance de ces deux types d'échantillon en attribuant des formules brutes pour les composés détectés. Cependant, la HRMS ne peut résoudre à elle seule les complexités des matrices. Deux limitations majeures ont été surlignées : (1) l'impossibilité de séparer

les isomères qui ont le même rapport  $m/z$  et (2) l'effet de matrice qui a lieu lorsqu'un grand nombre de composés est ionisé simultanément et qui se traduit par une suppression ou une exaltation d'ionisation.

Dans ce contexte, le couplage de la chromatographie en phase liquide, ou encore de la chromatographie en phase supercritique, à la spectrométrie de masse haute résolution est une technique de choix. Toutefois, **un nombre limité de travaux relate de l'application de ces techniques analytiques aux échantillons issus de la conversion de la biomasse et aucune ne traite, à notre connaissance, des hydrocarbures polycycliques lourds présents dans des coupes pétrolières.**

Le premier verrou que présente un tel couplage est technique. **En effet, la mise en place d'une méthode nécessite d'optimiser un nombre important de paramètres.** La littérature nous permet de nous orienter sur certains de ces paramètres expérimentaux cependant, il est impossible de reproduire à l'identique une méthode développée sur un autre spectromètre de masse. Par ailleurs, alors que **la communauté procède le plus souvent à une optimisation pas à pas** (un paramètre à la fois), il pourrait s'avérer judicieux de procéder de façon raisonnée notamment en utilisant une approche chimiométrique avec la construction de plans d'expériences.

Un second verrou se situe au niveau du traitement et de l'exploitation des données. **Un nombre colossal de données est généré lors d'une analyse en couplage avec la HRMS.** Pour chaque molécule détectée, on dispose d'un temps rétention, d'une « signature » UV si un détecteur UV est présent, d'un ratio  $m/z$  et si réalisés, de spectres de fragmentation. **La concaténation de l'ensemble de ces données expérimentales afin d'apporter des informations clés dans l'élucidation des structures de molécules inconnues n'est pas ou peu utilisée dans la littérature.**

Par ailleurs, bien que le potentiel de la spectrométrie de masse pour l'identification de composés oxygénés ou hydrocarbonés ne soit plus à démontrer d'après la littérature, **aucune base de données universelle et exhaustive** n'existe pour caractériser facilement et sans ambiguïté les molécules présentes dans une solution.

Pour terminer, **la quantification individuelle des composés dans un mélange complexe est un verrou à lever, relativement peu abordé dans la littérature d'autant plus avec des méthodes multidimensionnelles comme la LC×LC.** Une détection UV permet de quantifier des analytes sous plusieurs conditions : i) il doit posséder des chromophores pour répondre en UV, ii) il doit être bien séparé du reste de la matrice, iii) le standard doit être disponible ou alors le coefficient de réponse doit pouvoir être estimé. Les analytes ne répondant pas à ces critères devront potentiellement être quantifiés par spectrométrie de masse. Or la présence de plusieurs analytes éluant au même temps de rétention peut induire un effet de matrice favorisant l'ionisation d'un composé par exemple. La question est donc posée de disposer d'une méthodologie de quantification qui soit la plus juste et la plus robuste possible.



## **Objectif et méthodologie de la thèse**

---

Les verrous liés à la description moléculaire détaillée des échantillons oxygénés et hydrocarbonés issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique et des coupes lourdes du pétrole respectivement, ont été mis en avant dans le chapitre précédent. La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse haute résolution demeurent les techniques les plus répandues dans la littérature pour ce type de mélange mais ne permettent pas une description exhaustive à la fois d'un point de vue qualitatif et quantitatif. En revanche, bien que moins employé, le couplage de la chromatographie en phase liquide ou supercritique à la spectrométrie de masse haute résolution est une approche pertinente pour avancer dans la caractérisation des mélanges complexes étudiés.

L'objectif de cette thèse est donc de mettre au point une **méthodologie** et des **outils de caractérisation multidimensionnels incluant une ou plusieurs dimensions chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse haute résolution**. Au vu des propriétés très différentes des échantillons considérés dans cette thèse, **un large panel de techniques chromatographiques** mais aussi de **sources d'ionisation à pression atmosphérique** sera employé. Une démarche dédiée à l'optimisation des couplages et plus particulièrement à l'ionisation des analytes sera développée.

Par ailleurs, **le besoin analytique pour les deux types d'échantillons n'est pas le même**. En effet, une **analyse structurale** est demandée pour les composés présents dans les mélanges issus de la biomasse. Ainsi, des **expériences de fragmentation** viendront compléter le couplage mis en place. En revanche, **une analyse quantitative** des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les coupes lourdes du pétrole est requise. Aussi, une attention particulière sera portée **sur les effets de matrice** qui peuvent survenir au sein de la source d'ionisation.

Enfin, compte tenu de la complexité des mélanges, des méthodes multidimensionnelles impliquant plusieurs dimensions chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse haute résolution seront nécessaires. Ainsi, l'application de méthodes multidimensionnelles va générer **des quantités massives de données** comportant autant de dimensions que la méthode analytique. Le traitement de ces données afin d'en **extraire des informations pertinentes** et ainsi **valoriser les couplages** mis en place représentera une part non négligeable du travail de thèse. Les outils et connaissances qui seront développés au cours de cette thèse permettront l'identification et la quantification de nouvelles espèces encore non caractérisées dans des mélanges divers (organiques ou aqueux), donnant un avantage déterminant pour la découverte de nouveaux produits et l'optimisation de procédés de conversion performants.

En d'autres termes, le but est de développer non pas seulement des techniques analytiques, mais surtout des méthodes de caractérisation complète aboutissant à l'identification et/ou à la quantification des analytes. Cette thèse démontrera ainsi la puissance des couplages de la chromatographie LC ou SFC à la HRMS au travers d'exemples de mélanges complexes très différents, représentatifs de problématiques rencontrées dans le domaine des carburants et des produits chimiques intermédiaires.

La méthodologie globale peut se décomposer en trois axes, comme illustré sur la Figure 23.

## 1. Etude et optimisation des méthodes séparatives à une ou plusieurs dimensions compatibles avec la HRMS

→ Matrice oxygénée : RPLC, LC×LC

→ Matrice hydrocarbonée : NARP, SFC, CPC, CPC×NARP, CPC×SFC

## 2. Optimisation par plans d'expériences des conditions de couplage avec la HRMS

→ Matrice oxygénée : ESI, APCI et expériences de fragmentation

→ Matrice hydrocarbonée : APPI et évaluation des effets de matrice en spectrométrie de masse en vue d'une quantification

## 3. Retraitement et exploitation des données multidimensionnelles

→ Obtention d'une liste de formules brutes associées à un ou plusieurs temps de rétention

→ Visualisation pertinente des données

→ Exploitation des spectres de fragmentation

→ Méthodologie de quantification

Figure 23 : Les trois axes de la méthodologie de cette thèse

Chacun de ces axes est inclus dans les différents chapitres de ce manuscrit.

Le contexte et l'état de l'art font l'objet du Chapitre 1 et ont permis de mettre en évidence l'intérêt de la LC/HRMS et de la SFC/HRMS afin de caractériser nos mélanges complexes.

Le Chapitre 2 reprend l'ensemble des équipements, méthodes et échantillons utilisés lors de ces travaux. La méthodologie concernant l'optimisation du couplage avec la HRMS est plus particulièrement développée dans le Chapitre 3.

Le Chapitre 4, traitant de l'analyse d'un échantillon issu de la biomasse lignocellulosique, inclut le traitement et l'exploitation des spectres de fragmentation.

Une partie conséquente du Chapitre 5 vise à développer une méthode de chromatographie en phase liquide bidimensionnelle compréhensive en ligne pour l'analyse des sucres libérés pendant la conversion biochimique de la biomasse. La mobilité ionique en tant que dimension séparative sera également discutée dans ce chapitre.

L'analyse quantitative des HAP dans les coupes pétrolières lourdes est quant à elle développée dans le Chapitre 6 avec des cas d'application impliquant plusieurs produits représentatifs issus d'hydrocraquage.

Pour terminer, le Chapitre 7 a pour but de prendre de la hauteur sur l'ensemble des développements analytiques conduits pendant cette thèse et de comparer leurs performances et limites.

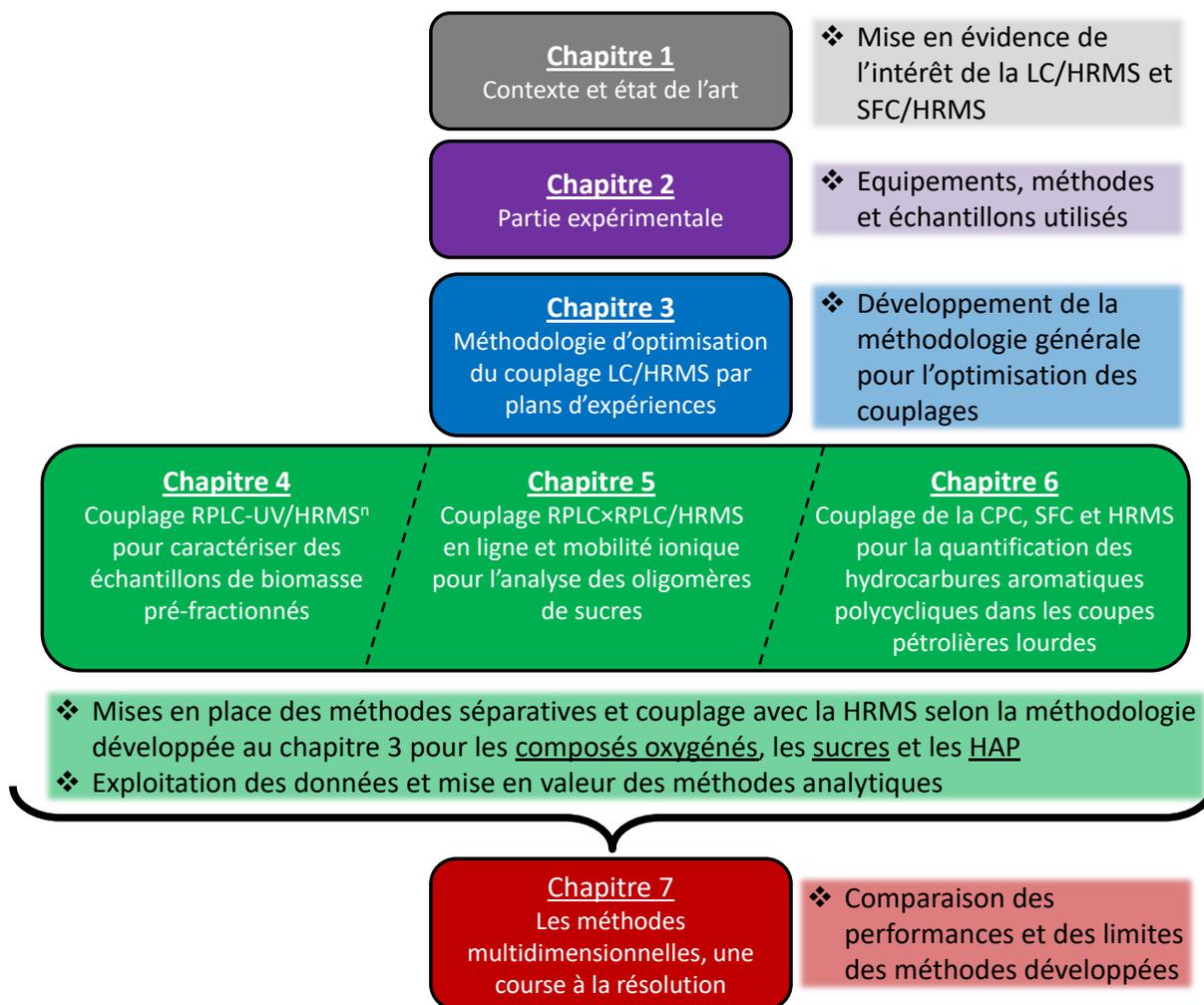


Figure 24 : Agencement des chapitres de cette thèse





## **Chapitre 2 – Partie expérimentale**

---

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>2. MATERIAUX .....</b>	<b>- 59 -</b>
2.1. ÉCHANTILLONS .....	- 59 -
2.1.1. Échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique.....	- 59 -
2.1.2. Échantillons pétroliers.....	- 60 -
2.2. MOLECULES MODELES.....	- 61 -
2.2.1. Molécules modèles oxygénées.....	- 61 -
2.2.2. Molécules modèles hydrocarbonées .....	- 63 -
2.3. SOLVANTS.....	- 64 -
<b>3. INSTRUMENTATION ET METHODES .....</b>	<b>- 65 -</b>
3.1. ANALYSE DE MELANGES ISSUS DE LA BIOMASSE .....	- 65 -
3.1.1. Protocole d'extraction liquide-liquide (LLE) .....	- 65 -
3.1.2. La chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC).....	- 65 -
3.1.3. La chromatographie bidimensionnelle compréhensive en ligne (RPLC×RPLC).....	- 65 -
3.1.4. Couplage avec un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique .....	- 66 -
3.1.5. Introduction directe sur le LTQ/FT-ICR/MS.....	- 69 -
3.1.6. Couplage avec le timsTOF .....	- 69 -
3.2. ANALYSE DE MELANGES HYDROCARBONES .....	- 71 -
3.2.1. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) .....	- 71 -
3.2.2. Chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (SFC/HRMS).....	- 72 -
3.2.3. Chromatographie en phase liquide non-aqueuse à polarité de phase inversée couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (NARP/HRMS).....	- 73 -
<b>4. TRAITEMENT DES DONNEES.....</b>	<b>- 74 -</b>
4.1. CREATION ET EXPLOITATION DES PLANS D'EXPERIENCES.....	- 74 -
4.2. VISUALISATION DES DONNEES MS.....	- 74 -
4.3. OBTENTION D'UNE LISTE DE FORMULES BRUTES ASSOCIEES A UN TEMPS DE RETENTION .....	- 74 -
4.4. EXPLOITATION DES SPECTRES DE FRAGMENTATION.....	- 75 -

## 1. Introduction

Ce chapitre décrit les échantillons, les molécules modèles et les solvants employés au cours de cette thèse. Les instruments et méthodes analytiques sont également reportés ainsi que les méthodes de retraitement et d'exploitation des données.

## 2. Matériaux

### 2.1. Échantillons

L'ensemble des échantillons étudiés dans cette thèse ont été fournis par IFP Énergies nouvelles.

#### 2.1.1. Échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique

Les échantillons de type  $A_i$  et  $B_i$  proviennent de la transformation biochimique de substrats lignocellulosiques. Plus précisément, les échantillons  $A_i$  sont des jus de cuisson acide de paille de blé obtenus selon plusieurs sévérités de prétraitement. L'échantillon  $A_1$  a été utilisé dans le Chapitre 5 pour le développement d'une méthode de chromatographie en phase liquide bidimensionnelle en ligne. Il a été obtenu après une cuisson à l'acide sulfurique d'une paille de blé. Les échantillons  $B_i$  correspondent à la fraction des extractibles à l'eau de trois substrats différents de biomasse lignocellulosique. Les fractions issues de l'extraction liquide-liquide réalisée dans le Chapitre 4 ont été obtenues à partir de l'échantillon  $B_1$  issu d'un prétraitement avec de l'acide sulfurique d'une paille de blé.

Enfin, une huile de pyrolyse rapide provenant de la conversion thermochimique de bois a également été étudiée dans les Chapitres 3 et 7.

La Figure 25 schématise le positionnement des échantillons dans les voies de conversion thermochimique et biochimique.

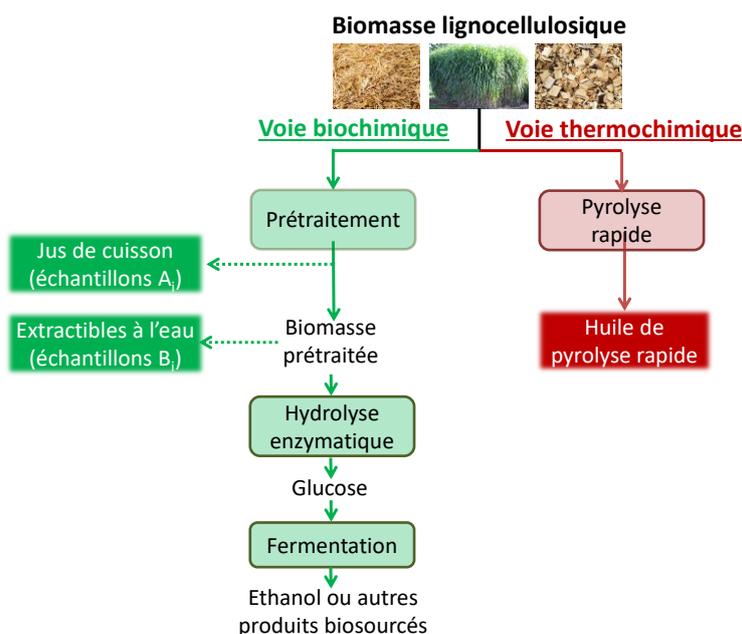


Figure 25 : Provenance des échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique analysés au cours de cette thèse

Tous les échantillons sont filtrés avant analyse avec un filtre PTFE de porosité de 0,20 µm (Interchim, France). L'huile de pyrolyse est également diluée par 10 dans du méthanol qualité HPLC.

### 2.1.2. Échantillons pétroliers

Six distillats sous vide (DSV) ont été étudiés dans le Chapitre 6. Il s'agit de coupes pétrolières lourdes, de températures d'ébullition comprises entre 350 et 650°C, dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 6 et seront également rappelées dans le Chapitre 6. Quatre des DSV, nommés SRVGO (*Straight-Run Vacuum Gas Oil*), sont obtenus directement à partir de la distillation sous vide de pétroles bruts. Le DSV 5 a été obtenu suite à un procédé de conversion (DC-VGO pour *Deep Conversion Vacuum Gas Oil*). Enfin le DSV 6 est un mélange 50/50 (v/v) d'un SRVGO et d'un DC-VGO.

**Tableau 6 : Propriétés des DSV étudiés**

Echantillons	Type	Masse volumique à 15°C (g/cm <sup>3</sup> )	Température d'ébullition à 5 et 95% du poids distillé (°C)	Soufre (mg/kg)	Azote (mg/kg)
		ASTM D4052	ASTM D2887	ASTM D2622	ASTM D4629
DSV 1	SRVGO	0,9208	265 – 509	2974	1160
DSV 2	SRVGO	0,9211	342 – 561	15351	1404
DSV 3	SRVGO	0,9244	352 – 544	25792	982
DSV 4	SRVGO	0,9284	394 – 581	18921	1395
DSV 5	DC-VGO	0,9306	390 – 567	6702	3510
DSV 6	SRVGO + DC-VGO	0,9314	346 – 551	10777	2610

Des échantillons hydrotraités et hydrocraqués ont également été étudiés dans le Chapitre 6. Une première charge non convertie (UCO ; *unconverted oil*), nommée UCO<sub>1</sub>, a été employée au cours du développement de la méthode analytique.

Six autres UCO, nommées UCO-t<sub>0</sub>, UCO-t<sub>1</sub>, UCO-t<sub>2</sub>, UCO-t<sub>3</sub>, UCO-t<sub>4</sub> et UCO-t<sub>5</sub>, sont issues d'un procédé d'hydrocraquage en une étape avec recycle au niveau du réacteur d'hydrotraitement (Figure 26). Ils proviennent de la partie non convertie (de température d'ébullition supérieure à 370°C) du DSV 2 obtenu après distillation des produits en sortie du réacteur d'hydrocraquage. Un échantillon nommé HDT-t<sub>0</sub> a également été prélevé en sortie du réacteur d'hydrotraitement. Les échantillons HDT-t<sub>0</sub> et UCO-t<sub>0</sub> ont été échantillonnés avant le démarrage du débit de recycle. Tandis que les UCO<sub>t<sub>1</sub></sub> à UCO<sub>t<sub>5</sub></sub> ont été collectés après le démarrage du débit de recycle. Le Tableau 7 résume les conditions expérimentales avec lesquelles ces échantillons ont été obtenus.

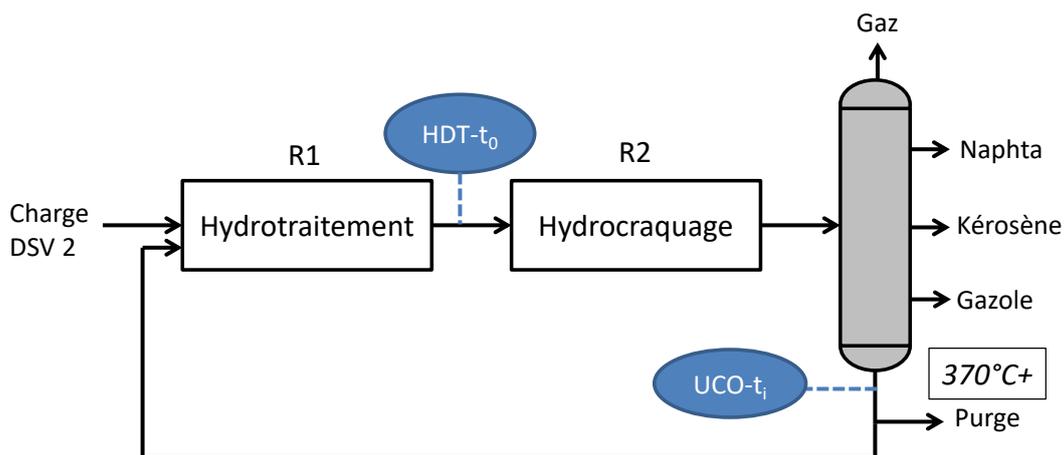


Figure 26 : Schéma de l'unité d'hydrocraquage

Tableau 7 : Conditions expérimentales lors de l'échantillonnage des produits hydrotraités et hydrocraqués

Echantillons	Temps sous charge (h)	Température R1 (°C)	Température R2 (°C)	Rendement en coupe 370°C+ (% p/p)
HDT- $t_0$	0	$T_0$	$T_0$	49,7
UCO- $t_0$				
UCO- $t_1$	583	$T_0+3^\circ\text{C}$	$T_0+10^\circ\text{C}$	49,6
UCO- $t_2$	847	$T_0+3^\circ\text{C}$	$T_0+22^\circ\text{C}$	45,4
UCO- $t_3$	1015	$T_0+7^\circ\text{C}$	$T_0+25^\circ\text{C}$	48,7
UCO- $t_4$	1135	$T_0+7^\circ\text{C}$	$T_0+29^\circ\text{C}$	45,8
UCO- $t_5$	1207	$T_0+7^\circ\text{C}$	$T_0+31^\circ\text{C}$	47,2

Pour l'analyse SFC/HRMS, les échantillons sont dilués dans du toluène (1 g pour 5 mL) puis filtrés avec des filtres en PTFE de porosité de 0,20  $\mu\text{m}$  (Interchim, France). Pour l'analyse en CPC, 1 g d'échantillon est dilué dans 5 mL de phase stationnaire puis directement injecté sans filtration préalable. Les échantillons étant figés à température ambiante, leur préparation nécessite de les chauffer à 60°C dans une étuve pendant quelques minutes afin de prélever la quantité nécessaire. Une fois le prélèvement de l'échantillon et l'ajout du solvant de dilution effectués, le mélange est à nouveau chauffé dans l'étuve pendant quelques secondes à 60°C.

## 2.2. Molécules modèles

Plusieurs mélanges de molécules modèles ont été utilisés au cours de ces travaux pour l'optimisation des méthodes analytiques.

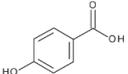
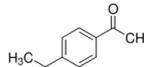
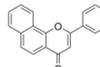
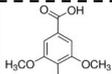
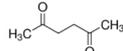
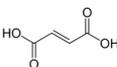
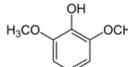
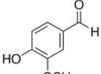
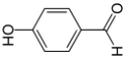
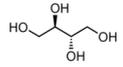
### 2.2.1. Molécules modèles oxygénées

L'ensemble des molécules oxygénées ont été commandées chez Sigma-Aldrich (France).

Dans le Chapitre 3, deux mélanges contenant chacun 12 molécules modèles à une concentration de 1 mM dans du méthanol ont été préparés pour l'optimisation des conditions d'ionisation en ESI et APCI négatif et positif. Ces mélanges sont nommés MM1 et MM2. MM1 a été utilisé pour l'optimisation du mode négatif et MM2 pour l'optimisation du mode positif. Leur composition est

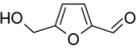
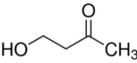
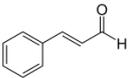
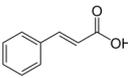
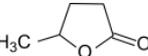
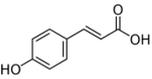
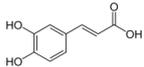
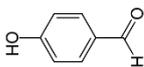
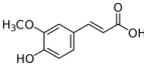
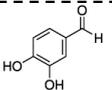
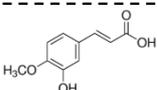
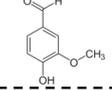
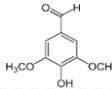
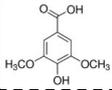
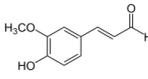
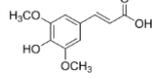
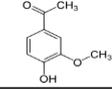
détaillée dans le Tableau 8. Les pKa indiqués ont été calculés à partir du site <https://chemicalize.com/app/calculation>.

Tableau 8 : Composition des mélanges de molécules modèles MM1 et MM2 employés dans le Chapitre 3

<b>MM1</b>			<b>MM2</b>		
Composés modèles	Structures	pKa	Composés modèles	Structures	pKa
Acide benzoïque		4,1	Acétovanillone		8,3
Acide 3-hydroxybenzoïque		3,84 / 9,6	Acétophenone		>12
Acide 4-hydroxybenzoïque		4,4 / 9,7	4-éthylacetophenone		>12
Acide p-toluique		4,3	1,3-cyclopentadione		8,3
Acide o-toluique		4,0	α-naphthoflavone		>12
Acide syringique		3,9 / 9,6	2,5-hexanedione		>12
Acide vanillique		4,2 / 10,1	Catéchol		9,3 / 12,8
Acide fumarique		3,4 / 4,2	Guaiacol		10,0
Acide stéarique		5,0	Syringol		9,4
Vanilline		7,8	Alcool vanillique		9,9 / 15,1
4-hydroxybenzaldéhyde		7,3	(3-phenoxyphényl)méthanol		14,9
Benzaldéhyde		>12	Erythritol		13,0 / 14,3 / 15,4

Dans le Chapitre 4, trois mélanges modèles (MM3, MM4 et MM5) ont été préparés à une concentration d'environ 300 mg/L dans du méthanol. Ces mélanges ont été utilisés afin d'étudier les mécanismes de fragmentation et ainsi de mettre en évidence des pertes typiques pour les différentes familles chimiques. MM3, MM4 et MM5 sont des mélanges représentatifs des fractions AQ3, ORG2 et ORG3 respectivement, issues du protocole LLE décrit dans le suite de ce chapitre. Le Tableau 9 présente la composition de ces trois mélanges.

Tableau 9 : Composition des mélanges de molécules modèles MM3, MM4 et MM5 employés dans le Chapitre 4

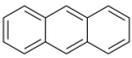
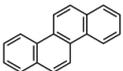
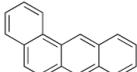
<b>MM3</b>			<b>MM4</b>		
Composés modèles	Structures	pKa	Composés modèles	Structures	pKa
Acide benzoïque		4,1	5-hydroxyméthylfurfural		>12
Acide salicylique		2,8 / 13,2	4-hydroxy-2-butanone		>12
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque		4,2 / 9,4 / 12,8	3-Methyl-2-cyclohexen-1-one		>12
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque		2,5 / 10,0 / 15,5	Cinnamaldéhyde		>12
Acide cinnamique		4,3	Valérolactone		>12
Acide paracoumarique		3,8 / 9,5	<b>MM5</b>		
Acide caféique		3,0 / 9,3 / 12,7	4-hydroxybenzaldéhyde		7,3
Acide férulique		3,6 / 10,0	3,4-dihydroxybenzaldéhyde		7,5
Acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique		3,6 / 9,9	Vanilline		7,8
Acide vanillique		4,2 / 10,1	Syringaldéhyde		7,2
Acide syringique		3,9 / 9,6	Coniféraldéhyde		9,5
Acide sinapique		3,4 / 9,4	Acétovanillone		8,3

### 2.2.2. Molécules modèles hydrocarbonées

L'optimisation de la séparation des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) par chromatographie en phase supercritique ainsi que l'optimisation des conditions de désolvatation lors du coulage SFC/HRMS ont été réalisées à l'aide d'un mélange modèle (MM6) préparé à 75 mg/L dans du diméthylsulfoxyde (Tableau 10). Un second mélange de HAP (MM7) composé d'anthracène, pyrène, pérylène, benzo[ghi]pérylène et coronène à 50 mg/L dans la phase stationnaire de la chromatographie de partage centrifuge a été utilisé pour estimer le taux de récupération de la méthode CPC×SFC/HRMS dans le Chapitre 6. L'ensemble de ces étalons ainsi que le pyrène deutéré ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (France).

Tableau 10 : Composition du mélange de molécules modèles MM6 employé dans le Chapitre 6

### MM6

Composés modèles	Structures	Nombre d'insaturations (DBE)
Anthracène		10
Pyrène		12
Chrysène		13
Benz[a]anthracène		13
Pérylène		15
Benzo[ghi]pérylène		17
Coronène		19

Les 1-méthylpyrène, 4-méthylpyrène, 4,5-diméthylpyrène, 2,7-diméthylpyrène, 1-éthylpyrène, 1-propylpyrène, 1-butylpyrène et 1-méthylcoronène ont été achetés auprès de BCP Instruments (France). Ces molécules modèles ont été préparées individuellement à 200 mg/L dans du toluène.

Enfin, la quantification des HAP dans les DSV et autres produits pétroliers étudiés a été réalisée via une gamme d'étalonnage préparée dans du toluène. Une solution mère (SM) contenant pyrène, benz[a]anthracène, pérylène, benzo[ghi]pérylène et coronène, a été préparée à une concentration de 500 mg/L. Ensuite les solutions filles (SF) ont été obtenues par dilution de SM dans du toluène. L'étendue de la gamme d'étalonnage est de 5 à 500 mg/L.

### 2.3. Solvants

Tous les solvants et additifs utilisés en chromatographie en phase liquide ou supercritique lors des couplages avec la spectrométrie de masse sont de qualité LC/MS à l'exception du dichlorométhane (DCM) (qualité HPLC, VWR, France) : acétonitrile (ACN), isopropanol (IPA), acide formique (FA) (Optima, Fisher Chemical, France), méthanol (MeOH) (Chromanorm, VWR, France). L'eau dé-ionisée a été produite par un système de purification Milli-Q (Millipore SAS, France). Le dioxyde de carbone utilisé en SFC (Bouteille B50 sous pression, pureté 99,97%) a été acheté auprès d'Air Liquide (France). L'anisole utilisé comme dopant dans le Chapitre 6 provient de VWR (France) et était pur à 99%.

Les analyses en chromatographie de partage centrifuge ainsi que toutes les dilutions et préparations d'échantillon ont été réalisées avec des solvants de qualité HPLC achetés chez VWR (France).

### 3. Instrumentation et méthodes

#### 3.1. Analyse de mélanges issus de la biomasse

##### 3.1.1. Protocole d'extraction liquide-liquide (LLE)

Le protocole LLE a été développé dans la thèse d'Alexis DUBUIS au sein d'IFP Énergies nouvelles. Il consiste en une succession d'extractions liquide-liquide permettant de produire 4 fractions regroupant les analytes selon les familles chimiques : la fraction aqueuse 1 (AQ1) comprend majoritairement les composés hydrophiles de type sucres, la fraction aqueuse 3 (AQ3) est composée essentiellement d'acides carboxyliques, la fraction organique 2 (ORG2) contient principalement les composés neutres à pH 12 (furanes, aldéhydes, cétones, alcools, etc.) et enfin la fraction organique 3 (ORG3) comprend essentiellement les composés phénoliques.

4,5 mL d'échantillon sont introduits dans une ampoule à décanter de 30 mL. Ensuite, 1,5 mL de méthyl tert-butyl éther (MTBE) sont ajoutés. Après 30 s d'agitation, les deux phases sont décantées pendant 5 min puis la fraction aqueuse (AQ1) et organique (ORG1) sont séparées. AQ1 est réintroduite dans l'ampoule et l'extraction est répétée deux fois avec 1,5 mL de MTBE (4,5 mL au total). La fraction AQ1 est filtrée et mise en flacon pour analyse. Les phases organiques résultantes (ORG1) sont combinées et réintroduites dans l'ampoule avec 4 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/L (ce volume peut être adapté en fonction de l'acidité de l'échantillon pour atteindre un pH de 12). On obtient alors deux nouvelles phases nommées ORG2 pour la phase organique et AQ2a pour la phase aqueuse qui sont séparées après décantation. ORG2 est concentrée par évaporation sous un flux d'azote. L'extrait sec est dissous dans 250 µL de méthanol et transféré dans un flacon pour analyse. AQ2a est ensuite acidifiée avec 0,5 mol/L d'acide chlorhydrique pour atteindre un pH de 7 (AQ2b). AQ2b est introduite dans l'ampoule à décanter et extraite à trois reprises avec du MTBE (3 x 3 mL). On obtient alors la fraction AQ3 qui est recueillie pour analyse. La fraction organique obtenue (ORG3) est évaporée sous azote et l'extrait sec est dissous dans 250 µL de méthanol. ORG3 est transférée dans un flacon pour analyse. Afin de réaliser un bilan massique, la quantité d'échantillon introduite de départ et les fractions obtenues sont pesées.

##### 3.1.2. La chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC)

Toutes les analyses RPLC ont été effectuées à l'aide d'un système UHPLC Agilent 1290 (USA) composé d'une pompe binaire, d'un passeur d'échantillons automatique, d'un compartiment de colonne à température contrôlée et d'un détecteur UV à barrette de photodiodes (DAD). La variance extra-colonne a été mesurée à 9 µL<sup>2</sup>. Le volume d'injection était de 1 µL. La séparation a été réalisée sur une colonne Kinetex C18 (100 x 3 mm, granulométrie 2,6 µm, Phenomenex, France) à 30°C. Les phases mobiles étaient constituées (A) d'eau avec 0,01% (v/v) de FA et (B) de MeOH avec 0,01% (v/v) de FA. Le débit était fixé à 600 µL/min. Un gradient linéaire a été utilisé comme suit : 0,0–4,0 min, 1% B ; 4,0–30,0 min, de 1 à 99% B ; 30,0–35,0 min, 99% B ; 35,0–36,0 min, de 99 à 1% B ; 36,0–40,0 min, 1% B. Le signal UV a été enregistré de 210 à 400 nm.

##### 3.1.3. La chromatographie bidimensionnelle compréhensive en ligne (RPLC×RPLC)

La RPLC×RPLC a été réalisée avec deux systèmes UHPLC Agilent 1290. L'interface reliant les deux dimensions comprenait une vanne duo à 2 positions / 4 ports avec deux boucles d'échantillonnage de 20 µL.

Le développement de la méthode bidimensionnelle est présenté dans le Chapitre 5. Le développement de la première dimension (D1) a été réalisé sur une colonne Hypercarb (100 × 2,1 mm, 5 µm, ThermoFisher Scientific, USA) et une colonne PLRP-S (150 × 2,1 mm, 5 µm, Agilent, USA). Le débit de solvant était de 0,3 mL/min à 60°C avec un palier isocratique de 5 temps morts ( $t_0$ ), puis un gradient allant de 1 à 99% de MeOH + 0,01% de FA en 32,5  $t_0$ . Pour la deuxième dimension (D2), six colonnes de dimensions 50 × 2,1 mm ont été comparées : Zorbax Bonus RP (1,8 µm, Agilent), Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, Agilent), Kinetex PFP (2,6 µm, Phenomenex), Kinetex Phenyl-Hexyl (2,6 µm, Phenomenex), Acquity BEH Shield RP18 (1,7 µm, Waters) et Acquity CSH Phenyl-Hexyl (1,7 µm, Waters). Les premières expériences sur ces colonnes ont été réalisées en utilisant un gradient avec (A) 0,01% (v/v) de FA dans l'eau et (B) 0,01% de FA dans du MeOH à 300 µL/min à 30°C. Un gradient linéaire a été utilisé comme suit : 0–2 min, 0% B ; 2–16 min, de 0 à 99% B ; 16–18 min, 99% B ; 18 à 21 min, 0% B.

Les conditions chromatographiques finales de la RPLC x RPLC sont résumées dans le Tableau 11.

**Tableau 11 : Conditions RPLC×RPLC**

	D1	D2
Phase stationnaire	Hypercarb	Eclipse Plus C18
Géométrie des colonnes	100 × 1 mm, 5 µm	50 × 2,1 mm, 1,8 µm
Température	60°C	50°C
Phases mobiles	(A) Eau + 0,5% FA (B) IPA + 0,5% FA	(A) Eau + 0,01% FA (B) ACN + 0,01% FA
Gradients	100% de (A), 0-30 min* 0 à 10% de (B), 30-180 min* 10 à 99% de (B), 180-220 min* 99% (B), 220-270 min**	0 à 70% de (B) en 0,5 min
Débits	*10 µL/min **25 µL/min	2 mL/min
Temps de modulation		0,8 min
Volume d'injection	2 µL	8 µL
Boucles d'échantillonnage		20 µL

#### 3.1.4. Couplage avec un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique

Dans les Chapitres 3 et 4, la méthode RPLC a été couplée à un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique équipé d'un aimant de 7 T et associé à un piège ionique linéaire (LTQ/FT-ICR/MS Thermo Scientific, Allemagne). Les différents modules qui constituent cet instrument sont présentés sur la Figure 27. Après l'ionisation des composés au sein de la source d'ionisation à pression atmosphérique, les ions sont transférés vers le piège ionique linéaire (LTQ). Ensuite, le LTQ peut être utilisé soit comme un stockage d'ions en accumulant une certaine quantité d'ions définie par l'utilisateur via l'Automatic Gain Control (AGC target) qui sera ensuite éjectée vers la cellule ICR pour une analyse MS, soit comme une cellule de collision temporelle en vue d'expériences de fragmentation. En vue de fragmenter un ion avec un  $m/z$  donné, il est nécessaire de l'isoler en éjectant tous les autres ions du piège ; cette opération est réalisée par irradiation de l'ensemble de la gamme de radiofréquences en excluant celle de l'ion d'intérêt. Ensuite, l'ion

précurseur isolé est fragmenté en appliquant une énergie supplémentaire correspondant à la fréquence de résonance de ce dernier (il s'agit de la fréquence qui n'a pas été irradiée). Ces étapes peuvent être répétées  $n$  fois, on parle alors de fragmentations successives,  $MS^n$ . Enfin, les ions sont transférés vers la cellule ICR. Cette dernière est localisée dans un champ magnétique, ce qui va permettre aux ions de se mettre en mouvement après avoir été excités. La cellule ICR va permettre de séparer les ions en fonction de leur fréquence de résonance, qui est inversement proportionnelle au rapport  $m/z$ . Plus précisément, la cellule ICR est composée de six électrodes symétriques deux à deux. Deux électrodes perpendiculaires au champ magnétique ont pour rôle de piéger les ions au sein de la cellule ICR en créant un puits de potentiel. Deux autres électrodes permettent d'exciter les ions et ainsi d'augmenter leur rayon de rotation en émettant une impulsion électrique sur une large gamme de fréquences. Les ions ayant le même rapport  $m/z$  (paquet d'ions) auront un mouvement d'ensemble cohérent, en phase. Enfin, les deux dernières électrodes servent à la mesure du courant induit par le mouvement des ions. Ce mouvement étant périodique, chaque ion va produire un signal sinusoïdal. La somme de ces signaux forme le transient qui par transformée de Fourier permet d'obtenir un spectre de masse. Le pouvoir résolutif atteint par l'ICR sera détaillé dans le Chapitre 7.

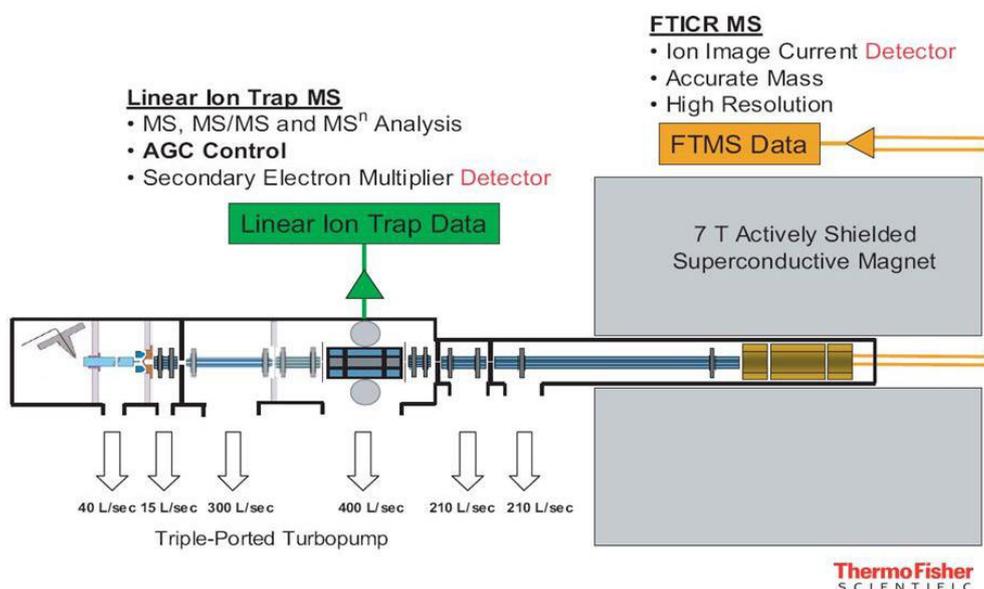


Figure 27 : Schéma du LQ/FT-ICR/MS (source : ThermoFisher Scientific)

L'ionisation a été réalisée avec les sources ESI et APCI (Ion Max, ThermoFisher Scientific, Allemagne), fonctionnant toutes les deux en mode positif ou négatif. Les conditions de désolvatation et d'ionisation ont été optimisées avec des plans d'expériences. Cette approche est détaillée dans le Chapitre 3. Avec la source ESI, un diviseur de flux (split) avec un ratio de 1:2,2 a été installé à la sortie de la colonne chromatographique pour réduire le débit de solvant entrant dans la source d'ionisation. Les paramètres optimisés pour chaque source et mode d'ionisation sont résumés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Conditions de désolvatation et d'ionisation optimisées pour le couplage RPLC/HRMS avec le LTQ/FT-ICR/MS

Facteurs	ESI neg	ESI pos	APCI neg	APCI pos
Débit du gaz nébulisant (AU)	32	36	39	50
Débit du gaz séchant (AU)	14	24	10	22
Débit du gaz rideau (AU)	6	0	/ (0)	/ (0)
Température du capillaire de transfert (°C)	298	275	376	250
Tension du capillaire de transfert (V)	-86	50	-29	20
Température du four tubulaire (°C)	/	/	450	404

La gamme de masse balayée était de  $m/z$  92 à 1000. Afin d'avoir au moins 10 points pour chaque pic chromatographique, un pouvoir de résolution de 12 500 à  $m/z$  400 et 2  $\mu$ scans ont été utilisés. La quantité d'ions injectés dans la cellule ICR a été contrôlée via l'AGC target fixé à 30 000 au sein du LTQ et 500 000 pour la cellule ICR avec un temps d'injection maximal dans le LTQ de 500 ms. Une calibration externe du spectromètre de masse a été réalisée avec les solutions CalMix positif et CalMix négatif (ThermoFisher Scientific, Allemagne).

Des expériences de fragmentations successives ( $MS^n$ ) ont également été réalisées sur cet instrument. L'ion le plus intense de chaque spectre a été sélectionné, isolé puis fragmenté dans le LTQ. Une fenêtre d'isolation de  $\pm 2 m/z$  a été utilisée et la fragmentation a été effectuée avec une énergie de collision de 35%. La séparation et la détection des ions fragments ont été réalisées avec l'analyseur FT-ICR/MS afin d'obtenir une résolution et une précision suffisantes pour calculer les formules brutes.

Enfin, l'intérêt de l'utilisation d'un boîtier électronique externe, nommé FTMS Booster (SpectroSwiss, Suisse), permettant l'augmentation de la résolution en masse sans modifier le nombre de spectres par unité de temps, a été évalué. Son fonctionnement est présenté dans le Chapitre 7. En quelques mots, il permet d'augmenter le temps d'acquisition des transients sans modifier le temps total sur lequel se déroule un scan, qui dépend entre-autre de la résolution du FT-ICR/MS indiquée dans la méthode d'acquisition. Pour cela, les transients sont enregistrés à la fois pendant le temps de détection normalement alloué ainsi que pendant l'accumulation des ions dans le piège ionique linéaire. La Figure 28 schématise le principe général du fonctionnement du Booster.

Extended transient acquisition using The FT-Booster

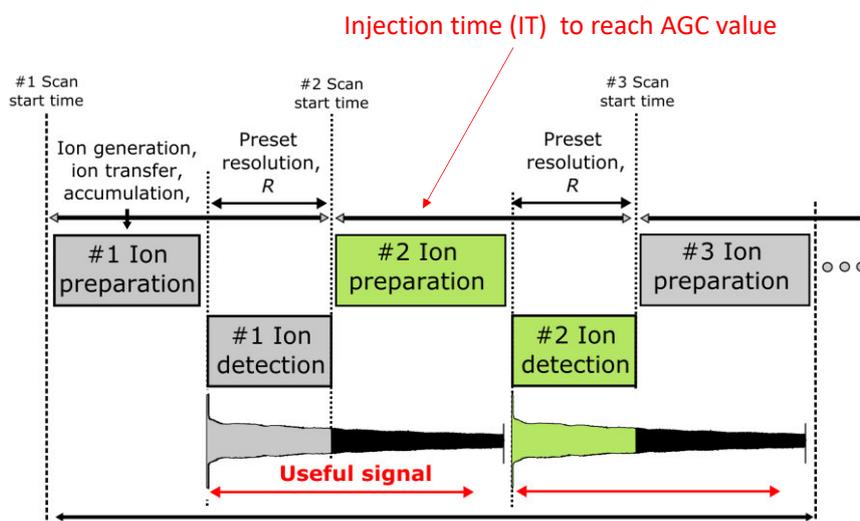


Figure 28 : Fonctionnement du Booster (schéma réalisé par la société SpectroSwiss)

### 3.1.5. Introduction directe sur le LTQ/FT-ICR/MS

Dans le Chapitre 3, les spectres de masse obtenus lors du couplage RPLC/LTQ/FT-ICR/MS ont été comparés à ceux obtenus en introduction directe sur le même spectromètre de masse en ESI négatif.

L'échantillon a été dilué dans du méthanol (1:50 ; v/v) avant introduction par infusion via un pousse seringue (5 µL/min). Le nombre de µscans a été fixé à 8 et 50 scans ont été accumulés avec une résolution de 100 000. Le débit du gaz nébulisant a été fixé à 5 U.A. Aucun gaz séchant et rideau n'ont été utilisés. La tension du capillaire était de -2,8 kV. La température du capillaire de transfert, la tension du capillaire de transfert et la tension de la première lentille étaient respectivement réglées à 275°C, -35 V et -110 V.

### 3.1.6. Couplage avec le timsTOF

Quelques mois avant la fin de ces travaux de thèse un nouvel appareillage a été installé sur lequel nous avons pu acquérir quelques données. Ainsi, le Chapitre 5 présente le couplage de la RPLC et de la RPLC×RPLC avec le timsTOF (Bruker Daltonics, Allemagne) via la source ESI en mode négatif. Le timsTOF comprend une double cellule de mobilité ionique de type TIMS (*Trapped Ion Mobility Spectrometry*) (transfert ou séparation des ions), un hexapôle (transfert des ions), un quadripôle (transfert ou filtre d'ions), une cellule de collision (transfert ou fragmentation) et un analyseur de type temps de vol (TOF). La Figure 29 présente un schéma global de l'instrument tandis que la Figure 30 présente plus en détails les deux TIMS en série.

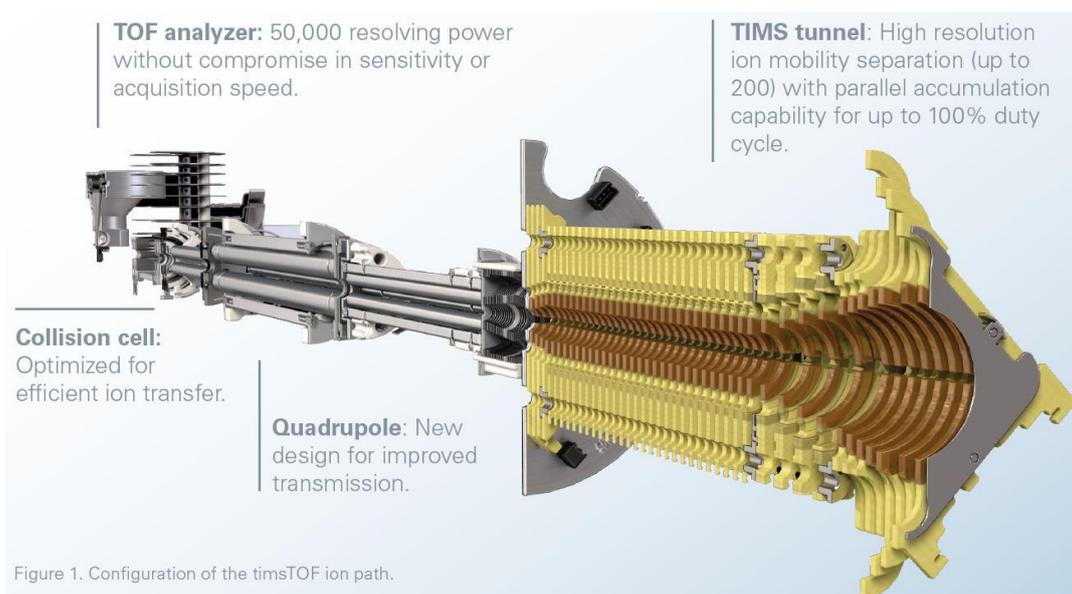


Figure 29 : Schéma du timsTOF (source : Bruker)

Dans la majorité des technologies par mobilité ionique (IMS), les ions dérivent au sein d'une cellule de mobilité sous l'effet d'un champ électrique et sont ralentis par un débit de gaz appliqué à contre-courant. Les ions sont ainsi séparés selon leur taille, forme et charge. Les ions avec la plus petite surface ont moins d'interactions avec les molécules de gaz et sont ainsi détectés en premier. Un temps de dérive (ou mobilité,  $K$  et mobilité réduite,  $K_0$ ) est mesuré pour chaque ion, celui-ci peut être converti en valeur de section efficace de collision (CCS),  $\Omega$ , selon l'équation suivante pour des champs électriques faibles [174]:

$$\Omega = \frac{3q}{16N_0K_0} \times \sqrt{\frac{2\pi}{k_bT}} \times \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{M}} \text{ avec } K_0 = K \frac{P \times T_0}{P_0 \times T} \quad (\text{Éq. 1})$$

Avec  $q$  la charge de l'ion ( $q=ze$ ),  $N_0$  la densité du gaz à la température et pression standards,  $k_b$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température du gaz,  $m$  la masse du gaz,  $M$  la masse de l'ion,  $P_0$  et  $T_0$  la pression et température standards.

La **mobilité ionique de type TIMS** diffère de ces technologies sous champ constant. En effet, elle utilise un flux de gaz élevé ( $N_2$ ),  $v_G$ , pour transporter les ions dans la cellule de mobilité, tandis qu'un champ électrique faible,  $E$ , est appliqué dans la direction opposée pour les piéger. Un ion avec une mobilité  $K$  est piégé dans la région où l'intensité de  $E$  est telle que la vitesse de dérive de l'ion ( $v_{ion}$ ) est égale à la vitesse du gaz arrivant en sens inverse [175]:

$$v_{ion} = KE + v_G = 0 \quad (\text{Éq. 2})$$

Ensuite, le champ électrique est progressivement réduit,  $\Delta V$ , afin de libérer et séparer les ions en fonction de leur taille, charge et forme. Les ions avec la plus grande surface (« plus grande prise au vent ») sont élués en premier, tandis que le potentiel devra être davantage abaissé pour éluer les ions avec une plus petite surface. **Le potentiel nécessaire pour éluer les composés, et plus précisément  $\Delta V$ , est proportionnel à  $1/K_0$** , ce dernier permettant ensuite de calculer les CCS.

Sur l'instrument timsTOF, deux analyseurs TIMS sont placés en série afin d'atteindre une sensibilité maximale (100% duty cycle). La première cellule TIMS a pour objectif de piéger et accumuler les ions avec une première rampe de potentiel et la seconde permet d'éluer les ions via une seconde rampe de potentiel qui est abaissée graduellement afin de libérer les ions. La résolution du TIMS est ainsi modulable en fonction de la vitesse d'abaissement de la rampe ou encore en fonction de la gamme de mobilité balayée (bornes de la rampe). Dans cette thèse, nous avons sélectionné le **mode Survey** (vitesse rapide et large gamme de mobilité), qui permet une analyse non-ciblée avec une large gamme de mobilité balayée mais avec une résolution limitée (environ 50).

Les paramètres suivants ont été utilisés : plage de  $1/K_0$  de 0,45 à 1,80 V.s/cm<sup>2</sup> et temps d'éjection de 100 ms.

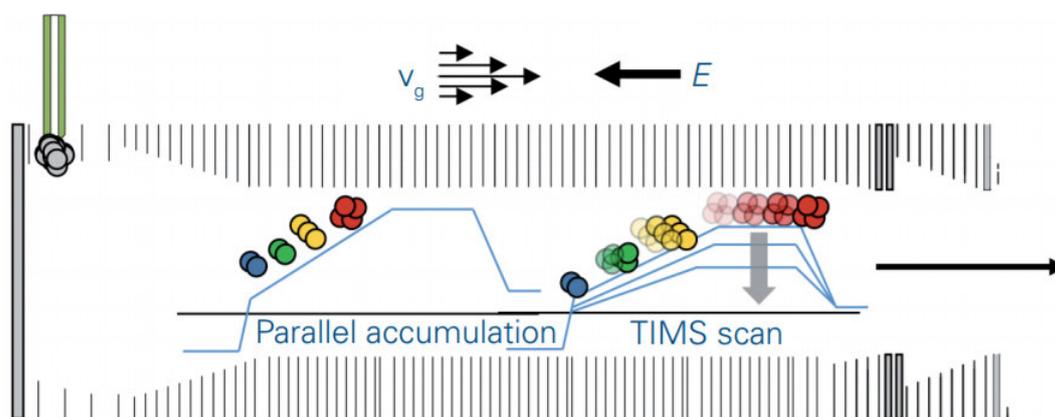


Figure 30 : Illustration du TIMS (source : Bruker)

La gamme de masse a été fixée entre  $m/z$  50 et 1000. La calibration du TOF a été réalisée avec une solution de formiate de sodium. Un segment de calibration placé en amont du temps mort de la colonne a permis une calibration externe proche avec une précision de mesure inférieure à 5 ppm. La calibration externe des valeurs de mobilité a été réalisée avec la solution ES-TOF Tuning Mix (Agilent, USA).

En couplage avec la RPLC, aucun split n'a été ajouté. La fréquence d'acquisition a été réglée à 3 Hz. En couplage avec la RPLC×RPLC, un split de 1:2 a été installé. De plus, la fréquence d'acquisition a été augmentée à 20 Hz. Les conditions de source pour les deux couplages sont résumées dans le Tableau 13.

**Tableau 13 : Paramètres de la source ESI lors du couplage du timsTOF avec la RPLC et la RPLC×RPLC**

	RPLC	RPLC×RPLC
Débit LC	0,6 mL/min	2 mL/min
Diviseur de flux	Non	1:2
Capillaire (V)	3000	3000
Pression du gaz nébulisant (Bar)	3	4
Débit du gaz séchant (L/min)	8,5	11
Température du gaz séchant (°C)	250	250

Enfin, des expériences de fragmentation ont également été réalisées lors du couplage RPLC/IMS/HRMS. Un stepping a été paramétré afin de moyenniser les spectres MS/MS réalisés à deux énergies de collision (25 et 40 eV).

### 3.2. Analyse de mélanges hydrocarbonés

#### 3.2.1. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Les expériences de CPC ont été réalisées sur un SCPC100 associé à un Spot Prep II (Gilson Purification, USA). Le système comprenait une pompe quaternaire, une vanne d'injection automatique avec une boucle de 5 mL, un détecteur UV de type DAD balayant de 200 à 400 nm et un collecteur de fractions. Une colonne de 131 mL a été utilisée pour le développement des méthodes. Les données chromatographiques ont été gérées à l'aide du logiciel Armen Glider CPC. Les expériences ont été menées à température ambiante.

Le système de solvants était constitué d'heptane-dichlorométhane-acétonitrile 45/10/45 (v/v/v). Un système de solvant biphasique a été préparé dans une ampoule à décanter de 2 L : l'ensemble des solvants est introduit dans l'ampoule puis le système de solvant est équilibré pendant 30 min avant séparation des phases. Le mode d'élution descendant a permis d'utiliser la phase enrichie en heptane comme phase stationnaire et la phase enrichie en acétonitrile comme phase mobile. Le pourcentage de phase stationnaire dans la colonne CPC a été mesuré à 60%. Les échantillons ont été préparés comme suit : après chauffage de l'échantillon pendant quelques minutes dans une étuve à 60°C, 1 g d'échantillon est prélevé, puis dilué dans 5 mL de phase stationnaire et enfin le mélange préparé est à nouveau chauffé à 60°C pendant quelques secondes. Les conditions CPC sont détaillées dans le Tableau 14.

**Tableau 14 : Conditions CPC**

Etape	Début (min)	Fin (min)	Vitesse de rotation (rpm)	Débit (mL/min)	% Phase stationnaire	% Phase mobile
Remplissage colonne CPC	0	10	500	30	100	0
Equilibration	10	30	2000	10	0	100
Elution	0	30	2000	10	0	100
Extrusion	30	40	2000	30	100	0

Une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques dans lesquels sont gravés des cellules interconnectées par des canaux (Figure 31).



Figure 31 : Colonne CPC [176]

La phase enrichie en heptane est pompée afin de remplir la colonne de phase stationnaire, qui est maintenue grâce à la force centrifuge. Ensuite, la phase mobile (enrichie en acétonitrile) est pompée dans le mode descendant afin que celle-ci traverse la phase stationnaire (Figure 32). La colonne est équilibrée pendant 20 min, puis après injection de l'échantillon, l'étape consistant à éluer les analytes a lieu. En fonction de leur coefficient de partage entre la phase stationnaire et la phase mobile, les composés sont plus ou moins retenus dans la colonne CPC. Ceux ayant le plus d'affinité pour la phase mobile sont élués les premiers. La dernière étape correspond à l'extrusion, en pompant à nouveau de la phase stationnaire. L'objectif étant de récupérer les analytes ayant une forte affinité pour la phase stationnaire qui ne se sont pas partagés entre les deux phases.

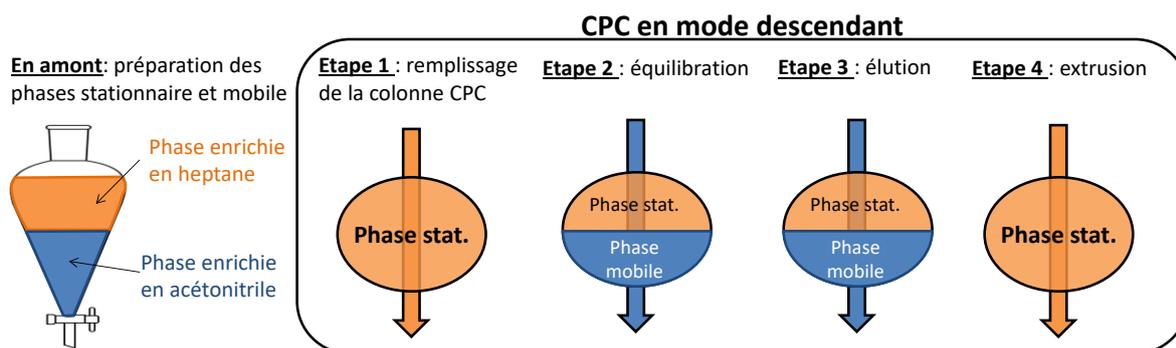


Figure 32 : Etapes d'une analyse CPC en mode descendant

Une fraction a été collectée chaque minute (40 fractions au total par échantillon). Ces fractions ont ensuite été évaporées sous vide à sec à l'aide d'un évaporateur Rocket Synergy (Biopharma Technologies, France) à 40°C. Les extraits secs ont été dissous dans 300 µL de toluène pour être ensuite analysés en SFC/HRMS.

### 3.2.2. Chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (SFC/HRMS)

Les expériences de SFC ont été réalisées sur un instrument Acquity UPC<sup>2</sup> (Waters, USA) contrôlé par le logiciel Empower 3 (Waters). Le débit de la phase mobile était de 1,1 mL/min avec du MeOH variant de 0 à 30% en 15 min comme co-solvant organique. Avant le début du gradient, la méthode a commencé par une étape isocratique de 5 min à 100% de CO<sub>2</sub>. Le volume d'injection était de 1 µL. Trois paramètres clés (type de phase stationnaire, contre-pression et température) ont été optimisés. Les colonnes étudiées étaient les colonnes Waters Acquity UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP, Acquity UPC<sup>2</sup> BEH, Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phényl, Acquity UPC<sup>2</sup> HSS C18 SB et Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC (3 × 100 mm pour toutes). La contre-pression variait de 10,5 à 16,4 MPa et la température de 25 à

55°C. Les conditions finales étaient une contre-pression de 10,5 MPa à 55°C avec la colonne Torus 2-PIC (3 × 100 mm ; 1,7 µm). Les longueurs d'onde de détection UV variaient de 210 à 400 nm.

Le système chromatographique a été couplé au LTQ/FT-ICR/MS décrit précédemment dans ce chapitre. Le couplage a été réalisé selon l'interface proposée par Waters : un diviseur de flux est positionné en sortie du détecteur UV, permettant de délivrer une partie du débit vers la source d'ionisation et l'autre partie vers le régulateur de contre-pression (ABPR). La Figure 33 représente la configuration de l'interface SFC/HRMS. L'ionisation a été réalisée en utilisant une source APPI en mode positif avec une lampe au krypton (Syagen Technology, USA). L'anisole a été utilisé comme dopant avec un débit de 100 µL/min à la sortie du détecteur UV (avant le split).

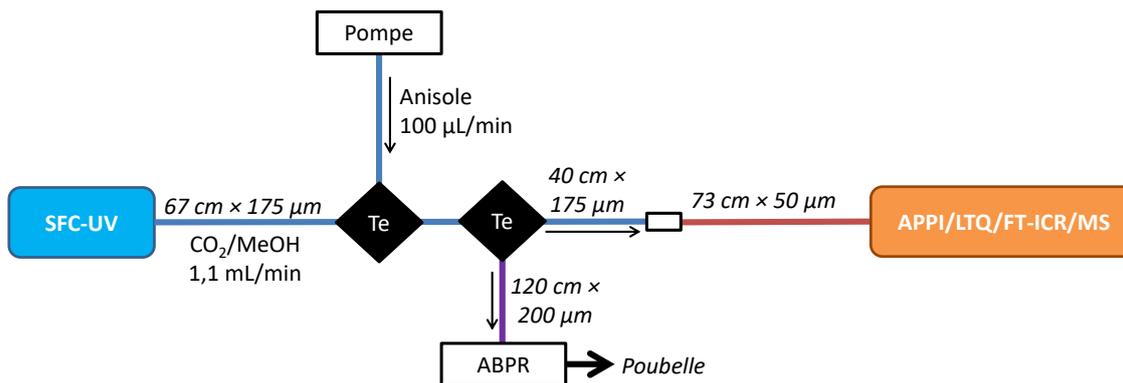


Figure 33 : Configuration de l'interface SFC/HRMS

Les conditions d'ionisation ont été optimisées avec un plan d'expériences présenté dans le Chapitre 6. Les paramètres optimisés sont les suivants : débits de gaz nébulisant, séchant et rideau à 10, 34 et 0 U.A. respectivement. Les températures du four tubulaire et du capillaire de transfert étaient de 348 et 200°C. Les tensions du capillaire de transfert et de la première lentille ont été réglées respectivement à 48 et 100 V. La gamme de masse balayée était de  $m/z$  98 à 1000. De la même façon que lors du couplage RPLC/HRMS, afin d'avoir au moins 10 points pour décrire chaque pic chromatographique, un pouvoir de résolution de 12 500 à  $m/z$  400 et 2 µscans ont été utilisés. La quantité d'ions injectés dans la cellule ICR a également été contrôlée via l'AGC target fixé à 500 000 et avec un temps d'injection maximum de 500 ms. Une calibration externe du spectromètre de masse a été réalisée avec le CalMix positif (ThermoFisher Scientific, Allemagne).

### 3.2.3. Chromatographie en phase liquide non-aqueuse à polarité de phase inversée couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (NARP/HRMS)

Les analyses NARP ont été effectuées à l'aide du système UHPLC 1290 (Agilent, USA). La séparation a été réalisée sur une colonne Nucleodur C18 PAH (3 x 150 mm ; 3 µm, Macherey-Nagel, Allemagne) à 30°C. 5 µL d'échantillon ont été injectés. Le solvant en phase mobile était du MeOH (A) et du DCM (B) avec un débit de 600 µL/min. Un gradient linéaire a été utilisé comme suit : 0-5 min, 0% B ; 5-38 min, de 0 à 100% B ; 38-39 min, de 100 à 0% B ; 39-45 min, 0% B. Le signal UV a été enregistré de 210 à 400 nm.

Le LTQ/FT-ICR/MS a été couplé à la méthode NARP avec un diviseur de flux installé en sortie de la colonne chromatographique avec un rapport de split de 1:2,4 (250 µL/min vers la HRMS). L'ionisation des analytes a été réalisée avec la source APPI en mode positif. Un débit de 75 µL/min d'anisole a été ajouté en amont de la source d'ionisation comme dopant. Un schéma de l'interface NARP-UV/HRMS est présenté sur la Figure 34.

Les conditions d'ionisation ont été optimisées avec un plan d'expériences. Les paramètres optimisés sont les suivants : débits de gaz nébulisant, séchant et rideau à 60, 29 et 5 U.A. respectivement. Les températures du four tubulaire et du capillaire de transfert étaient de 363 et 200°C. Les tensions du capillaire de transfert et de la première lentille ont été réglées respectivement à 28 et 100 V. Les autres réglages du spectromètre de masse sont similaires à ceux décrits pour le couplage SFC/HRMS au paragraphe précédent.

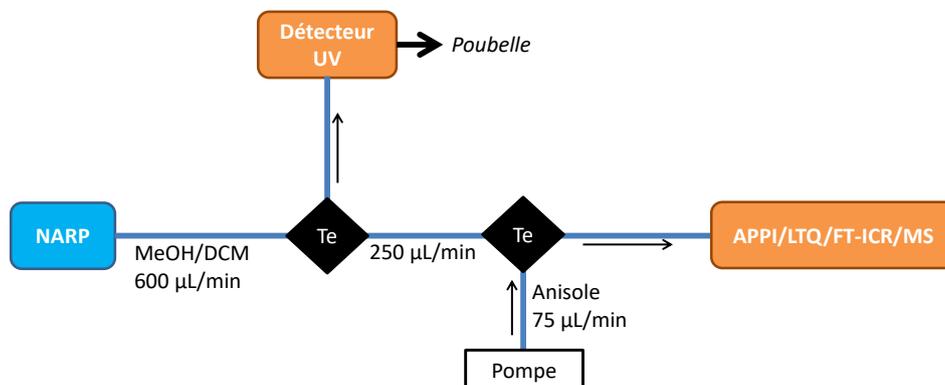


Figure 34 : Interface NARP/HRMS

## 4. Traitement des données

### 4.1. Création et exploitation des plans d'expériences

La construction des plans d'expériences composites centrés et l'optimisation des paramètres expérimentaux via une fonction de désirabilité ont été réalisées avec le logiciel Design Expert 10 (Stat-Ease, USA).

Les aires des pics chromatographiques (issus des EIC) ont été mesurées à l'aide du logiciel Xcalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific, Allemagne). Tout d'abord, une méthode de traitement a été mise en place avec l'application "Processing Setup" de Xcalibur. L'identification de chaque composé modèle a été réalisée en utilisant une référence de temps de rétention et un rapport  $m/z$ . Une fois la méthode de traitement mise en place, elle a été appliquée à l'ensemble des fichiers de données (.raw) via l'application "Sequence Setup". Les résultats d'intégration ont ensuite été ouverts dans l'application "Quan Browser" et ont pu être exportés vers Design Expert 10 afin de construire des modèles quadratiques pour chaque molécule.

### 4.2. Visualisation des données MS

Les données MS peuvent être visualisées directement avec DataAnalysis 5.2 lors des couplages avec le timsTOF et avec Xcalibur pour les couplages avec le LTQ/FT-ICR/MS. La représentation des chromatogrammes 2D obtenus suite aux méthodes CPC×SFC et RPLC×RPLC a été tracée via un logiciel interne à IFP Énergies nouvelles.

### 4.3. Obtention d'une liste de formules brutes associées à un temps de rétention

Les données obtenues lors des couplages avec le LTQ/FT-ICR/MS sont directement importées dans MZmine. Ces fichiers (.raw) sont composés de données à trois dimensions : le temps de rétention de chaque scan, le rapport  $m/z$  et l'intensité de chaque ion. L'objectif est d'obtenir une liste de rapports  $m/z$  avec leur temps de rétention, intensité ou aire ainsi que la formule brute du composé détecté.

Pour cela, la première étape est la détection des rapports  $m/z$  selon un seuil fixé qui dépend de l'échantillon, de l'objectif et des conditions expérimentales. Ensuite, l'intensité de chaque  $m/z$  retenu est tracée en fonction du temps de rétention (EIC) via la fonctionnalité nommée ADAP. On obtient alors une liste de rapports  $m/z$  avec un temps de rétention et une intensité associés. Cette liste est ensuite traitée comme suit : les massifs isotopiques sont regroupés avec l'ion pseudo-moléculaire, puis afin de faciliter la déconvolution du chromatogramme, un lissage est effectué. Dans le cas de la CPC×SFC/HRMS, étant donné que l'on a 40 fractions, nous obtenons 40 listes de pics. Ces dernières sont alignées de sorte que tous les ions ayant le même rapport  $m/z$  et temps de rétention soient indiqués sur une même ligne de la matrice ; chaque colonne représentant une fraction. Enfin, les formules moléculaires peuvent être calculées. Pour les DSV, la détermination des formules brutes est réalisée selon les conditions suivantes :  $C_{1-100}H_{1-100}O_{0-1}S_{0-1}N_{0-1}$  et une précision en masse de 2 ppm. Pour les composés issus de la biomasse lignocellulosique, les formules brutes devaient comporter entre 1 et 100 atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène pour les composés détectés en ESI et APCI négatif. En mode positif, la présence potentielle d'un atome d'azote a également été considérée.

Les données traitées peuvent ensuite être exportées dans Excel afin de réaliser la quantification des HAP dans le cas des échantillons pétroliers ou alors pour tracer des visualisations représentatives des échantillons comme les graphiques de van Krevelen pour les échantillons lignocellulosiques. En effet, sur la base de la liste des formules obtenues, plusieurs propriétés peuvent être calculées comme le nombre d'insaturations (DBE). Les valeurs de DBE sont calculées selon l'équation suivante pour les composés de type  $C_cH_hO_oS_sN_n$  :

$$DBE = \frac{2+2 \times c - h + n}{2} \quad (\text{Éq. 3})$$

#### 4.4. Exploitation des spectres de fragmentation

L'exploitation des spectres de fragmentation a été réalisée manuellement afin de proposer des structures développées de nouvelles molécules. Toutefois, dans le Chapitre 4, nous avons également évalué deux plateformes en ligne permettant la comparaison des spectres acquis avec des spectres *in silico* et/ou expérimentaux. Le fonctionnement de ces deux plateformes (MetFragWeb version beta et CFM-ID 3.0) est détaillé dans le Chapitre 4. La représentation des données MS/MS acquises sur le timsTOF via des réseaux moléculaires a également été proposée en perspective dans le Chapitre 7. Pour cela, les spectres MS/MS ont été extraits à partir du logiciel DataAnalysis 5.2 au format MGF (Mascot Generic Format). La fonction « Compounds-AutoMS(n) » a été employée pour regrouper les fragments avec leur précurseur. Une intensité seuil de 10 000 U.A. sur le TIC MS/MS ainsi qu'une tolérance en temps de 0,4 min pour regrouper les spectres MS/MS similaires et une tolérance en masse de 0,1 ont été renseignées. Le fichier MGF a ensuite été importé sur le site GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>). Plusieurs paramètres qui ont un impact sur le calcul de la ressemblance entre deux spectres MS/MS ont été testés et sont présentés dans le Chapitre 7. Enfin, les réseaux moléculaires ont été visualisés via le logiciel Cytoscape.



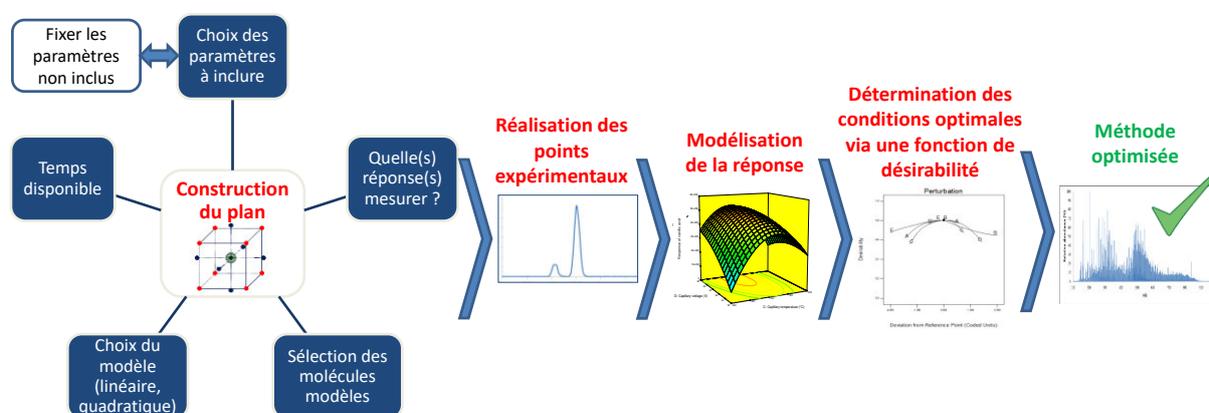
# Chapitre 3 – Méthodologie d'optimisation du couplage LC/HRMS par plans d'expériences

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

« A rational strategy based on experimental designs to optimize parameters of a liquid chromatography-mass spectrometry analysis of complex matrices »

Carole Reymond, Agnès Le Masle, Cyril Colas, Nadège Charon

*Talanta* 205 (2019) 120063, DOI 10.1016/j.talanta.2019.06.063



<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 79 -</b>
<b>2. METHODOLOGIE POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'IONISATION ET DE DESOLVATATION ..</b>	<b>- 80 -</b>
<b>3. ADAPTATION DES CONDITIONS LC POUR LE COUPLAGE .....</b>	<b>- 82 -</b>
3.1. DISPERSION LIEE AU SPLIT ENTRE LA LC ET LA HRMS .....	- 83 -
3.2. POSITION DE LA SOURCE D'IONISATION .....	- 86 -
3.3. IMPACT DES ADDITIFS.....	- 87 -
<b>4. PLANS D'EXPERIENCES COMPOSITES CENTRES POUR L'OPTIMISATION DES CONDITIONS DES SOURCES ESI ET APCI .....</b>	<b>- 90 -</b>
<b>5. APPLICATION DES METHODES OPTIMISEES A UNE HUILE DE PYROLYSE.....</b>	<b>- 97 -</b>
<b>6. CONCLUSION .....</b>	<b>- 101 -</b>

## 1. Introduction

Ce n'est que depuis une trentaine d'années que le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse a connu un véritable essor grâce au développement des sources d'ionisation fonctionnant à pression atmosphérique. Malgré le fort intérêt de la communauté scientifique, la LC/HRMS n'est pas systématiquement utilisée comme technique de routine [177]. Des tests préliminaires et une étape importante d'optimisation doivent être effectués lors de la mise en place d'une méthode. Les causes principales d'un travail aussi long sont liées, d'une part, à l'incompatibilité de certaines méthodes chromatographiques avec la spectrométrie de masse (débit et nature de la phase mobile, additif, etc.) et, d'autre part, au grand nombre de paramètres à prendre en compte afin de contrôler l'efficacité de l'ionisation à l'intérieur de la source d'ionisation à pression atmosphérique (API). En effet, le signal obtenu dépend de plusieurs facteurs tels que les débits des gaz nébulisant et séchant, la position du sprayer, les températures de la source et du capillaire de transfert des ions, la tension du capillaire, etc. L'optimisation de chacun de ces paramètres peut être fastidieuse et la plupart du temps, elle est basée sur l'expérience que peut avoir un utilisateur sur un système LC/HRMS. Par ailleurs, **la procédure consistant à faire varier une variable à la fois ne garantit pas l'obtention des conditions optimales**. À l'inverse, bien que peu utilisée dans la littérature, **l'approche chimiométrique** est basée sur un modèle expérimental rationnel, qui permet **la variation simultanée de tous les paramètres expérimentaux**. L'utilisation d'un plan d'expériences permet également de déterminer le nombre d'expériences nécessaires et d'éviter les redondances d'information. Il peut également **prendre en compte les interactions possibles entre les différents facteurs**. À notre connaissance, seules quelques publications ont utilisé une approche avec des plans d'expériences pour optimiser les paramètres influençant la désolvatation et l'ionisation des composés qui sont des étapes déterminantes lors du couplage LC/HRMS. La plupart d'entre elles se sont concentrées sur l'amélioration du signal d'analytes cibles dans le milieu pharmaceutique [160,165,178]. Par exemple, Perrenoud *et al.* ont comparé la sensibilité d'une méthode SFC-ESI/MS/MS par rapport à une méthode LC-ESI/MS/MS pour l'analyse de composés pharmaceutiques en utilisant un plan composite centré afin d'optimiser la tension du capillaire, la température de désolvatation et le débit de gaz séchant [160].

D'autre part, la LC/HRMS devient pertinente pour analyser des mélanges complexes contenant des analytes à hauts poids moléculaires ou thermosensibles qui ne peuvent pas être analysés par CG/MS. Ceci est particulièrement vrai pour les composés oxygénés provenant de la conversion de la biomasse lignocellulosique [35,36,38]. Les matrices liquides qui résultent des procédés de conversion sont très complexes et comportent une grande diversité de composés oxygénés (acides carboxyliques, cétones, aldéhydes, phénols, furanes, glucides, etc.) sur une large gamme de polarités et de poids moléculaires. Ces dernières années, de par son pouvoir résolutif, la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR/MS) a suscité un intérêt croissant [18,25,26,179–181]. La HRMS est une technique puissante pour l'analyse de nombreux types de mélanges, menant à une liste importante de formules brutes permettant une meilleure compréhension de la composition des mélanges complexes. De plus, l'utilisation de plusieurs sources d'ionisation à pression atmosphérique est essentielle pour détecter un large éventail de molécules [22]. Cependant, la suppression du signal due à la compétition entre les analytes pendant le processus d'ionisation (en particulier avec l'ESI) est un problème majeur lors de l'analyse en introduction directe par HRMS. Le couplage de la HRMS avec la LC devrait théoriquement réduire ce phénomène

et également permettre de différencier les isomères grâce à leur séparation chromatographique. Bien qu'un certain nombre d'articles utilisant la HRMS en introduction directe aient été publiés sur des échantillons de biomasse [22,26,72,179,181], beaucoup moins d'études ont été consacrées à la LC/HRMS [36,38,182].

**Ce chapitre a pour objectif de développer une méthodologie d'optimisation du couplage LC/HRMS pour la caractérisation de mélanges issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique. Afin d'atteindre une ionisation maximale des analytes et ainsi un signal optimal et contrôlé en spectrométrie de masse, des plans d'expériences de types composites centrés (CCD) ont été construits. De plus, l'optimisation du couplage a été réalisée avec plusieurs sources d'ionisation (ESI et APCI en positif et négatif) pour tendre vers une caractérisation la plus exhaustive possible. En amont des plans d'expériences, des tests préliminaires ont été effectués pour étudier et fixer certains paramètres comme la concentration des additifs dans la phase mobile, le ratio de split et la position de la source d'ionisation. Pour terminer, les quatre méthodes optimisées ont été appliquées à une huile de pyrolyse. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par introduction directe en HRMS du même échantillon.**

## **2. Méthodologie pour l'optimisation des conditions d'ionisation et de désolvatation**

La désolvatation et l'ionisation des molécules sont des étapes critiques lors du couplage LC/HRMS. Lorsque la LC est utilisée sans spectrométrie de masse, il n'y a aucune restriction sur les concentrations d'additifs/sels, ni sur le débit de la phase mobile directement lié aux dimensions de la colonne chromatographique. À l'inverse, pour rendre possible le couplage LC/HRMS, de nombreux paramètres doivent être ajustés :

- le débit de la LC,
- la composition de la phase mobile,
- le ratio de split entre les deux dimensions,
- les débits de gaz au sein de la source API (gaz nébulisant, séchant, rideau),
- la température et la tension du capillaire de transfert des ions,
- la tension de la première lentille,
- la température du four tubulaire pour l'APCI,
- la tension du spray en ESI (aussi nommé tension de capillaire) / le courant de décharge en APCI,
- la position du sprayer.

Pour augmenter l'efficacité de l'ionisation, on pourrait également ajouter un solvant make-up tel qu'une solution d'hydroxyde d'ammonium en mode négatif à la sortie du système LC.

Compte tenu du grand nombre de facteurs et fort probablement des interactions entre ces derniers, des plans composites centrés ont été sélectionnés afin de construire par la suite des modèles quadratiques tenant compte des interactions du second ordre. Ce développement a été réalisé sur des composés modèles oxygénés comportant des fonctions chimiques variées. Deux mélanges modèles ; nommés MM1 et MM2 décrits dans le Chapitre 2, ont été utilisés :

→ un mélange de 12 acides carboxyliques et aldéhydes pour les modes ESI et APCI négatifs (MM1)

→ un mélange de 12 cétones et alcools pour les modes ESI et APCI positifs (MM2)

Le principal avantage de l'utilisation de composés modèles est d'optimiser intelligemment chaque mode d'ionisation en fonction de la capacité des composés à accepter ou à perdre un proton. Par exemple, il ne serait pas pertinent d'améliorer l'ionisation des acides carboxyliques en mode positif alors qu'ils sont mieux ionisés en mode négatif grâce au proton labile porté par le groupement COOH.

Pour construire les quatre plans d'expériences, cinq paramètres significatifs (soit l'ensemble des paramètres entrant dans la construction d'une méthode hormis la tension du capillaire en ESI et le courant de décharge en APCI) ont été choisis pour chaque mode d'ionisation afin de limiter le nombre d'expériences : débits des gaz nébulisant, séchant et rideau, température et tension du capillaire de transfert d'ions pour l'ESI ; température du four tubulaire, débits des gaz nébulisant et séchant, température et tension du capillaire de transfert d'ions pour l'APCI. La tension de la première lentille tubulaire a été associée à la tension du capillaire de transfert en conservant une différence de 25 V entre elles afin d'éviter des fragmentations en source. D'autres paramètres nécessitant des ajustements manuels n'ont pas été inclus dans les plans d'expériences et ont donc été optimisés et fixés au préalable (composition et ratio de split de la phase mobile LC à l'entrée du spectromètre de masse ainsi que la position de la source API). L'impact des additifs a également été étudié. Les conditions chromatographiques ont été choisies pour être compatibles avec la spectrométrie de masse ; par exemple, la concentration d'acide formique était aussi faible que possible mais suffisante pour maintenir les analytes sous leur forme protonée. La Figure 35 illustre les paramètres qui ont été soit optimisés à l'avance (en violet), soit avec un plan d'expériences (en rouge) pour l'ESI.

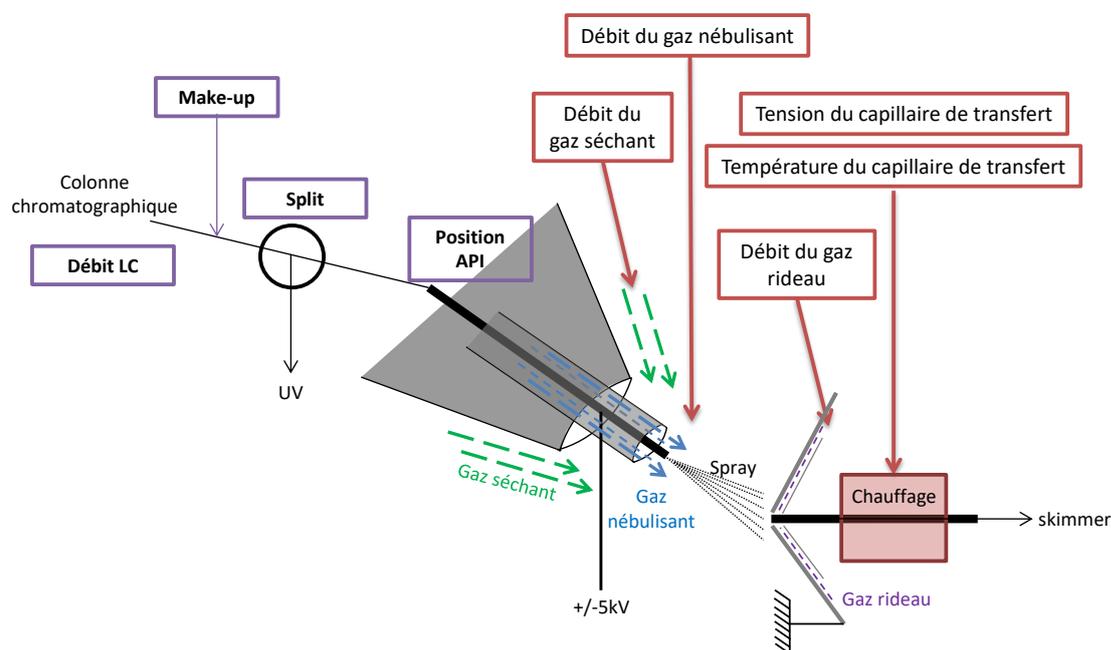


Figure 35 : Paramètres inclus dans le plan d'expériences (en rouge) et ceux optimisés en amont (en violet) pour la source ESI

Afin d'éviter la formation d'arcs électriques et/ou dommages, la tension du capillaire a été maintenue à -3,5 kV et 4,0 kV pour les modes ESI négatif et positif respectivement. Le courant appliqué en APCI a également été fixé à 20  $\mu$ A.

La méthodologie globale développée est schématisée Figure 36. La première étape consiste à construire le plan d'expériences. Son choix dépendra à la fois du nombre et du type de facteurs (variables discrètes ou continues) à inclure, du temps disponible ainsi que du modèle mathématique souhaité (linéaire, quadratique, cubique, etc.). Il faut également sélectionner les molécules modèles selon le mode d'ionisation et la réponse à mesurer. Les paramètres expérimentaux qui ne seront pas inclus dans le modèle devront être fixés au préalable. Une fois le plan d'expériences défini, on peut alors réaliser l'ensemble des points expérimentaux. Pour chaque molécule, les réponses mesurées au cours des différentes expériences permettront de calculer les coefficients du modèle mathématique adopté. Chaque molécule modèle possédera alors son propre polynôme. À noter que le nombre d'expériences doit être au minimum égal au nombre de coefficient. Enfin, une fonction de désirabilité permettra d'optimiser simultanément l'ensemble des réponses des molécules modèles. On obtiendra alors un set de conditions nommées conditions optimisées.

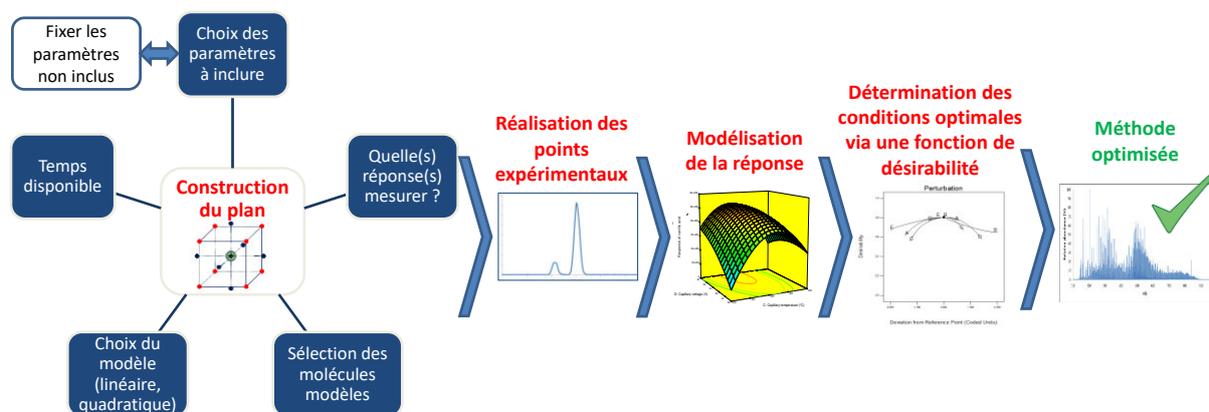


Figure 36 : Méthodologie d'optimisation du couplage LC/HRMS par plans d'expériences

### 3. Adaptation des conditions LC pour le couplage

Pour optimiser une interface LC/HRMS, il est primordial de bien comprendre le processus d'ionisation afin de se concentrer sur les paramètres clés et d'ajuster le débit et/ou la composition des phases mobiles pour les rendre compatibles avec les spécificités des sources d'ionisation.

Dans le cas de l'ESI, les composés dilués dans la phase mobile sont introduits par un capillaire dans une zone à pression atmosphérique où un champ électrique de quelques kV est appliqué. Ce champ électrique provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, entraînant la formation d'un cône à l'extrémité du capillaire (cône de Taylor). Lorsque les forces de répulsion coulombiennes dépassent la tension superficielle du liquide, des gouttelettes chargées sont alors émises à la pointe du cône. À ce stade, plusieurs théories concernant le processus d'ionisation sont en concurrence. La plus connue est la théorie de la charge résiduelle introduite en 1968 par Dole *et al.* [183]. Selon cette théorie, une succession de fissions des gouttelettes alternant avec l'évaporation du solvant provoque la libération d'ions en phase gazeuse. Inversement, selon d'autres théories, comme le modèle d'évaporation des ions (Iribarne et Thomson), les ions seraient éjectés des gouttelettes ou même directement du cône de Taylor [184]. Il se pourrait en réalité que ces modèles soient complémentaires, ainsi l'évaporation ionique interviendrait dans les dernières étapes de la théorie de la charge résiduelle [185,186]. Il convient de noter que la formation d'ions dans la phase gazeuse se termine souvent non pas dans la zone de pression atmosphérique, mais à l'interface de cette dernière et de la zone suivante à pression réduite.

Contrairement à l'ESI pour laquelle les ions sont préformés en solution, l'APCI exige que les molécules passent en phase gazeuse avant l'ionisation. Pour cette raison, la source d'ionisation est chauffée entre 300 et 500°C selon le débit et la composition de la phase mobile. La vapeur formée passe ensuite à travers un flux d'électrons émis par une décharge corona qui crée un plasma autour de l'aiguille.

Au vu des spécificités de chaque source d'ionisation, il paraît crucial de limiter le débit de solvant entrant en ESI via un diviseur de flux (split) ainsi que d'étudier l'impact des additifs dans la phase mobile afin d'ajuster sa composition de manière à être compatible avec l'ESI et l'APCI. Enfin, la position du sprayer sera également optimisée.

### 3.1. Dispersion liée au split entre la LC et la HRMS

De par les dimensions de la colonne chromatographique (100 × 3 mm, taille des particules 2,6 μm), le débit de la LC a été fixé à 600 μL/min, ce qui est trop élevé pour la ESI employée (Ion Max, ThermoFisher Scientific). Selon le constructeur, le débit maximal en ESI est de 1 mL/min, mais le fonctionnement optimal est obtenu entre 100 et 400 μL/min. Afin de réduire le débit entrant dans le spectromètre de masse, un split a été installé. Toutefois, le principal inconvénient de ce dernier est de disperser le soluté ce qui aurait pour conséquence un élargissement des pics chromatographiques et donc une perte de résolution, en particulier pour des ratios de split faibles. Afin de calculer la dispersion résultant du montage à différents ratios, le split a été installé entre le détecteur UV et la HRMS comme indiqué sur la Figure 37. La variation du ratio de split est réalisée en utilisant différentes longueurs de capillaires allant à la poubelle tandis que le capillaire installé entre le split et la HRMS demeure constant. L'ensemble des capillaires possède un diamètre de 125 μm.

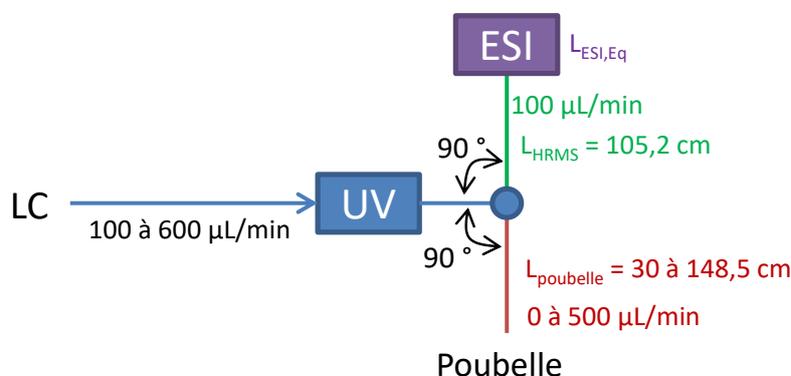


Figure 37 : Montage pour calculer les dispersions à plusieurs ratios de split

La dispersion totale du soluté ( $\sigma_{total}^2$ ) correspond à la somme des variances liées à la dispersion de la colonne chromatographique ( $\sigma_{col}^2$ ) et à la dispersion extra-colonne ( $\sigma_{ext}^2$ ) (Éq. 4). La dispersion extra-colonne résulte des dispersions à l'injection ( $\sigma_{injection}^2$ ), à l'intérieur des capillaires ( $\sigma_{tubing}^2$ ), dans les détecteurs UV et HRMS ( $\sigma_{UV}^2$  et  $\sigma_{HRMS}^2$ ) et du split ( $\sigma_{split}^2$ ) (Éq. 5).

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{ext}^2 \quad (\text{Éq. 4})$$

$$\sigma_{ext}^2 = \sigma_{injection}^2 + \sigma_{tubing}^2 + \sigma_{UV}^2 + \sigma_{HRMS}^2 + \sigma_{split}^2 \quad (\text{Éq. 5})$$

Afin de limiter la perte de plateaux théoriques ( $N_{col}$ ), la dispersion extra-colonne doit être aussi faible que possible. Le rapport entre  $\sigma_{col}^2$  et  $\sigma_{total}^2$  ( $\beta^2$ ) représente le pourcentage de plateaux restants. Ici,

nous avons cherché à évaluer le rapport entre  $\sigma_{col}^2$  et  $(\sigma_{split}^2 + \sigma_{col}^2)$  pour différents ratios de split qui correspond à la perte de plateaux théoriques liée uniquement au split.

Pour un composé ayant un facteur de rétention à l'élution ( $k_e$ ) de 3,  $\sigma_{col}^2$  est égal à  $187 \mu\text{L}^2$  selon Éq. 6.

$$\sigma_{col}^2 = \frac{V_0^2(1+k_e)^2}{N_{col}} \quad (\text{Éq. 6})$$

avec  $V_0$  le volume mort de la colonne (en  $\mu\text{L}$ ) et  $N_{col}$  estimé en divisant la longueur de la colonne ( $L_{col}$  en mm) par 3 fois la taille des particules ( $d_p$  en mm).

Il reste maintenant à évaluer  $\sigma_{split}^2$ . On notera :

$$\sigma_{LC}^2 = \sigma_{injection}^2 + \sigma_{tubing}^2 + \sigma_{UV}^2 \quad (\text{Éq. 7})$$

L'équation 5 devient alors :

$$\sigma_{ext}^2 = \sigma_{LC}^2 + \sigma_{HRMS}^2 + \sigma_{split}^2 \quad (\text{Éq. 8})$$

Pour évaluer la dispersion d'un pic chromatographique ( $\sigma^2$  en  $\mu\text{L}^2$ ), l'équation de Dorsey-Foley est utilisée (Éq. 9).

$$\sigma^2 = \frac{(As+1,25) F^2 W_{0,1}^2}{41,7} \quad (\text{Éq. 9})$$

avec F le débit de la phase mobile (en  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), As l'asymétrie du pic ( $As = B/A$  ; où B est la largeur du pic entre le début et le sommet du pic ; A la largeur du pic entre le sommet et la fin du pic à une hauteur de pic de 10% en min) et  $W_{0,1}$  la largeur du pic à 10% de la hauteur (en min).

L'exploitation du pic chromatographique obtenu lors de l'injection sans colonne chromatographique d'une solution d'acide syringique à 1 mM a été réalisée dans trois situations différentes :

- (1) En exploitant le signal chromatographique obtenu par le détecteur UV, la variance mesurée donne accès à la somme des variances liées à l'injection, aux capillaires et au détecteur UV, nommée ici  $\sigma_{LC}^2$ .
- (2) En absence de split entre le détecteur UV et la HRMS (mise en place d'une union zéro volume mort) et avec un débit de  $100 \mu\text{L}/\text{min}$ , l'exploitation du chromatogramme obtenu en HRMS donne accès à la somme des variances  $\sigma_{LC}^2$ , et  $\sigma_{HRMS}^2$ . Connaissant  $\sigma_{LC}^2$ , on peut ainsi en déduire  $\sigma_{HRMS}^2$ .
- (3) En ré-introduisant le split dans le montage, l'exploitation du chromatogramme obtenu en HRMS donne accès à la variance totale  $\sigma_{ext}^2$  correspondant à la somme des variances  $\sigma_{LC}^2$ ,  $\sigma_{HRMS}^2$  et  $\sigma_{split}^2$ . Les deux premières étant connu, la dispersion liée au split peut être obtenue selon l'équation 10. Plusieurs ratios de split ont été testés en modifiant le débit de la LC (de  $100$  à  $600 \mu\text{L}/\text{min}$ ) et en maintenant constant le débit entrant dans le spectromètre de masse ( $100 \mu\text{L}/\text{min}$ ) via l'utilisation de différentes longueurs de capillaires entre le split et la poubelle. De cette manière, nous avons pu considérer  $\sigma_{HRMS}^2$  constante et égale à celle préalablement mesurée en absence split avec un débit de  $100 \mu\text{L}/\text{min}$ .  $\sigma_{LC}^2$  et  $\sigma_{ext}^2$  ont été mesurées pour chaque ratio de split.

$$\sigma_{split}^2 = \sigma_{ext}^2 - \sigma_{LC}^2 - \sigma_{HRMS}^2 \quad (\text{Éq. 10})$$

Le ratio de split a été mesuré expérimentalement ( $Z_{exp}$ ) et calculé théoriquement ( $Z_{th}$ ) avec la loi de Poiseuille en considérant un écoulement laminaire (Éq. 11).

$$Z_{th} = \frac{R_{poubelle}}{R_{HRMS} + R_{ESI} + R_{poubelle}} \text{ avec } R_i = \frac{128 \times \eta \times L_i}{\pi \times d_i^4} \quad (\text{Éq. 11})$$

$R_i$  correspond aux résistances dues au frottement dans le capillaire entre le split et la poubelle ( $R_{poubelle}$ ), entre le split et la source d'ionisation ( $R_{HRMS}$ ), et dans la source d'ionisation ( $R_{ESI}$ ).  $L_i$  et  $d_i$  sont les longueurs et diamètres des capillaires (en m) et  $\eta$  la viscosité du fluide (en Pa.s). L'équation 11 prend uniquement en compte les pertes de charge régulières liées aux frictions entre le liquide et la paroi des capillaires. Les pertes de charge singulières, comme les coudes, ne sont pas prises en compte car considérées similaires de part et d'autre du split. En effet, le split a été positionné de telle manière que l'angle entre l'UV et la poubelle, et l'UV et la HRMS soit le même ( $90^\circ$ ). Par ailleurs, les diamètres des capillaires allant à la poubelle et à la HRMS sont les mêmes, ainsi, pour une viscosité constante, l'équation 11 devient :

$$Z_{th} = \frac{L_{poubelle}}{L_{HRMS} + L_{ESI,Eq} + L_{poubelle}} \quad (\text{Éq. 12})$$

Ne connaissant pas exactement la géométrie des capillaires dans l'ESI, une longueur équivalente ( $L_{ESI,Eq}$ ) a été évaluée expérimentalement. À noter que cette longueur équivalente prend également en compte une potentielle perte de charge singulière en cas d'un changement de diamètre entre le capillaire allant à la source d'ionisation et celui présent à l'intérieur de l'ESI (rétrécissement ou élargissement). La Figure 38 représente le ratio de split mesuré expérimentalement en fonction de celui calculé théoriquement via l'équation 12. La prédiction du ratio de split est en accord avec l'expérience.

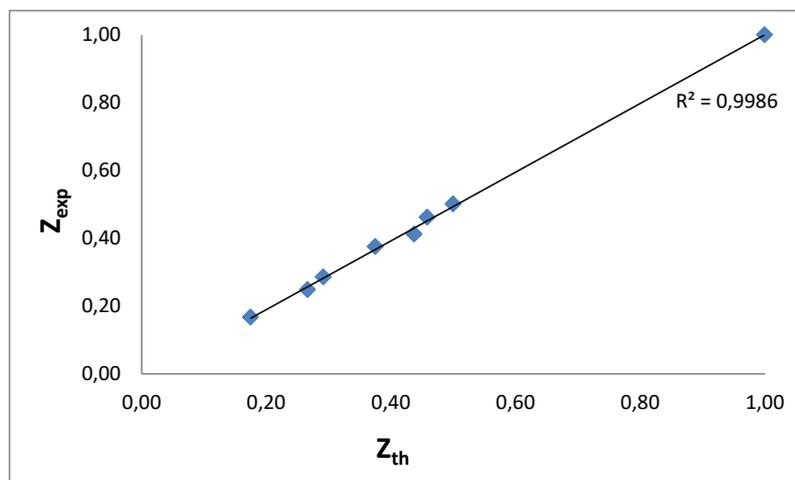


Figure 38 : Ratio de split mesuré expérimentalement versus ratio de split théorique

La Figure 39 représente le pourcentage de plateaux théoriques restants ( $\sigma_{col}^2 / (\sigma_{split}^2 + \sigma_{col}^2)$ ) en fonction du ratio de split. Avec un rapport de 0,20 (1:5), environ 60% des plateaux théoriques sont perdus uniquement à cause du split ce qui peut avoir pour conséquence de re-mélanger des composés qui auraient été séparés. Afin de conserver au moins 70% des plateaux théoriques, **un ratio de split de 0,45 (1:2,2)** au minimum est nécessaire, ce qui correspond à un débit de 270  $\mu\text{L}/\text{min}$  dirigé vers le spectromètre de masse. En conséquence, ce rapport a été utilisé par la suite.

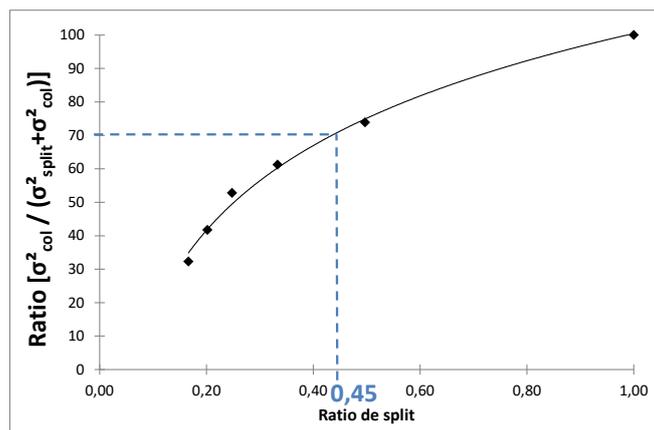


Figure 39 : Pourcentage de plateaux théoriques restants en fonction du ratio de split

Pour l'APCI, aucun split n'a été utilisé. Grâce au four tubulaire, l'APCI peut supporter un débit plus élevé que l'ESI. De plus, l'APCI est une technique d'ionisation dont le signal est dépendant de la quantité d'analyte, ce qui signifie qu'un split diminuerait le signal MS comme illustré sur la Figure S1. À l'opposé, le signal en ESI dépend de la concentration [187].

### 3.2. Position de la source d'ionisation

Afin d'optimiser la position de la source APCI et ESI, quatre molécules modèles ont été injectées en FIA (*Flow Injection Analysis*) à une concentration de 1 mM. Quatre positions sont possibles : de A qui est la position la plus proche du capillaire de transfert, à D la plus éloignée. La distance entre deux positions est de 0,5 cm. Les aires des EIC mesurées en fonction de la position de la source sont représentées sur la Figure 40.

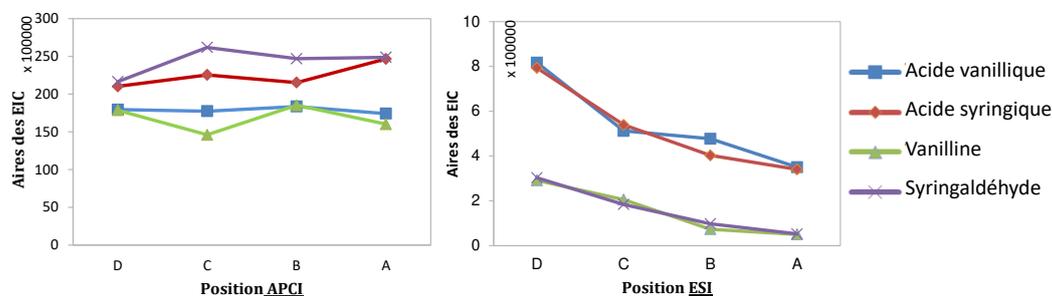


Figure 40 : Impact de la position de la source d'ionisation APCI (gauche) et ESI (droite) en mode négatif pour quatre molécules modèles

Pour l'APCI, la position de la source n'a pas eu d'impact réel sur l'efficacité d'ionisation des composés modèles. En revanche, pour l'ESI, les aires des EIC des composés sont grandement dépendantes de la position du spray. La vanilline et le syringaldéhyde ont une aire cinq fois plus faible dans la position A que dans la position D, la plus éloignée. **Pour la suite, la source a été fixée en position D pour l'ESI et l'APCI.** Par ailleurs, ces observations sont cohérentes avec le processus d'ionisation de chaque source d'ionisation. En effet, en APCI, la phase mobile est vaporisée et l'ionisation se produit en phase gazeuse. Au contraire, en ESI, l'ionisation a lieu en phase liquide avec la formation d'un spray grâce à la tension appliquée entre l'aiguille de l'ESI et le cône. Ainsi, la position du spray a un impact direct sur le champ électrique (E) qui devient plus intense lorsque ce dernier est situé dans une position plus proche (Éq. 13).

$$E = \frac{V}{A \cdot r \cdot \ln\left(\frac{4d}{r}\right)} \quad (\text{Éq. 13})$$

avec  $V$  la tension appliquée ( $V$ ),  $A$  une constante empirique estimée par Smith comme étant égale à 0,667 [188],  $r$  le rayon du capillaire (cm) et  $d$  la distance entre le spray et le cône (cm) [188,189].

Il est important de noter que la position optimale de la source dépend de nombreux autres paramètres tels que le débit du gaz nébulisant ou la tension du capillaire de transfert. Ces paramètres ont été optimisés par la suite avec un CCD.

### 3.3. Impact des additifs

Il est bien connu que la composition de la phase mobile joue un rôle important lors des étapes de désolvatation et d'ionisation [134–138]. Pour l'ESI, le solvant utilisé doit avoir une constante diélectrique suffisante pour former des gouttelettes chargées ainsi qu'une faible tension de surface. De plus, les additifs doivent être utilisés avec une concentration aussi faible que possible. En effet, l'ESI est un procédé d'ionisation compétitif. Lorsque plusieurs composés sont présents dans une même gouttelette, ils entrent en compétition pour un nombre limité de charges à la surface de cette gouttelette, ce qui peut entraîner un phénomène de suppression ionique. Dans cette étude, la phase mobile contient 0,01% (v/v) d'acide formique afin de maintenir les acides carboxyliques sous leur forme protonée pendant la séparation chromatographique. Le pH mesuré du solvant aqueux est alors de 3,2. En ESI positif, l'acide formique est une bonne source de protons ; cependant, pour le mode négatif, un pH d'environ 8 serait préférable pour favoriser la formation d'anions dans la phase liquide. Afin d'évaluer l'effet des additifs en ESI et APCI négatifs, quatre composés modèles (acide vanillique, acide syringique, vanilline et syringaldéhyde) ont été injectés par FIA en utilisant de l'acide formique, de l'hydroxyde d'ammonium et du formiate d'ammonium à des concentrations variant de 0,1  $\mu\text{M}$  à 50 mM. Les résultats sont présentés sur la Figure 41.

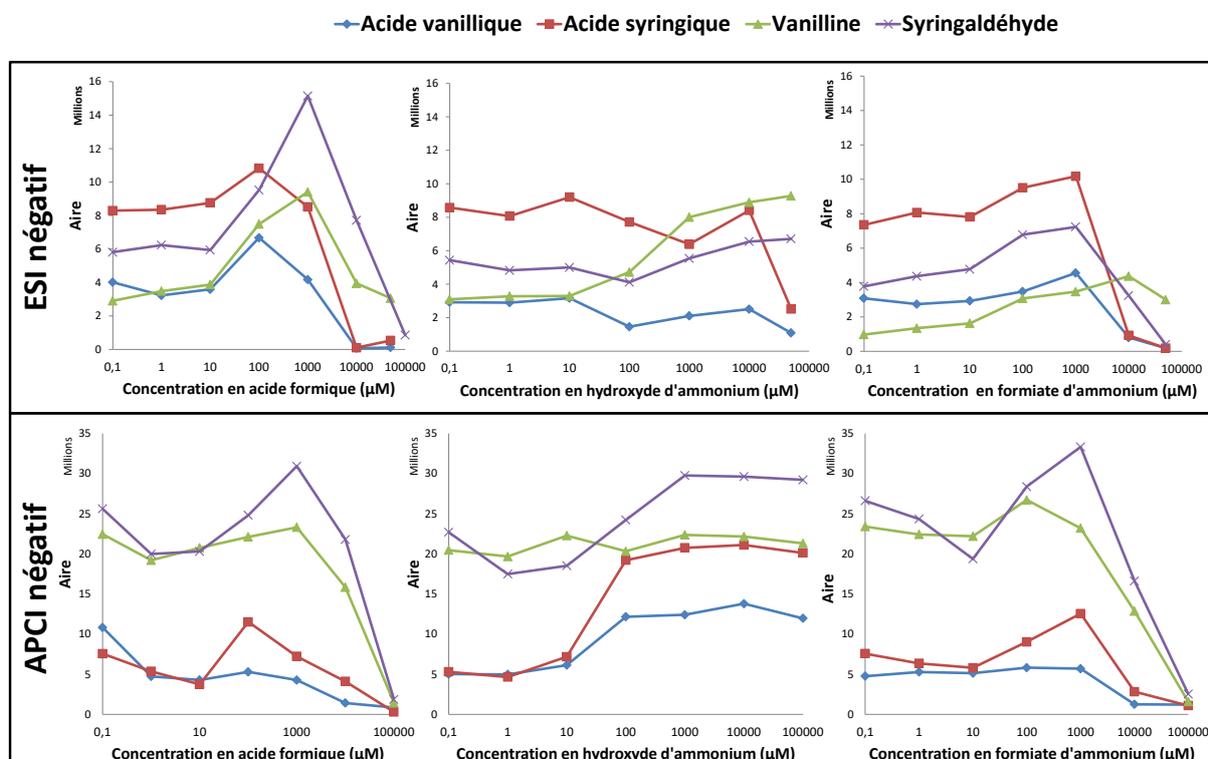


Figure 41 : Impact de l'acide formique, de l'hydroxyde d'ammonium et du formiate d'ammonium sur les aires des ions  $[M-H]^-$  des quatre molécules en ESI et APCI négatif

Concernant l'ESI négatif, de manière inattendue, l'efficacité de l'ionisation ne s'est pas détériorée avant que la concentration en acide formique n'atteigne environ 1 mM. Entre 0,1  $\mu$ M et 1 mM, l'ionisation des acides carboxyliques n'a que peu été affectée par l'acide formique alors que la réponse des aldéhydes a été largement exaltée ( $\times 3,2$  pour la vanilline entre 0,1  $\mu$ M et 1 mM). Ce phénomène est appelé "ionisation en sens inverse" (en anglais « *wrong-way-round ionization* ») [134,152]. Le processus d'ionisation en ESI est complexe et de nombreux facteurs l'influencent, tels que la volatilité de la phase mobile, sa tension de surface, sa conductivité, la force ionique, le pH, les réactions ion-molécule en phase gazeuse, etc. Bien que les composés soient théoriquement ionisés en phase liquide, l'ionisation des analytes neutres dans la phase gazeuse pourrait également se produire par des réactions de transfert de protons impliquant des espèces éluantes chargées provenant de solvants et/ou d'additifs. Une telle exaltation de la réponse des aldéhydes pourrait s'expliquer par (1) une ionisation par transfert de protons en phase gazeuse ou (2) une ionisation à l'interface liquide-gaz des gouttelettes. Il est connu que les réactions d'oxydoréduction qui se produisent au niveau du spray, c'est-à-dire la réduction pour le mode négatif, créent une différence significative de pH entre la solution et les gouttelettes [138,190–192]. L'ajout de protons provenant d'acides pourrait alors faciliter la réaction de réduction et donc modifier considérablement le pH à la surface des gouttelettes [131]. Ainsi, même si les solutés ne sont pas ionisés dans la phase mobile, comme c'est le cas pour les deux aldéhydes étudiés ici qui ont un pKa compris entre 7 et 8, la modification du pH des gouttelettes pourrait alors rendre possible leur ionisation en phase liquide. À partir de concentrations élevées, entre 10 et 50 mM d'acide formique, une forte suppression d'ionisation est observée.

L'hydroxyde d'ammonium et le formiate d'ammonium renforcent la réponse des aldéhydes, en particulier le signal de la vanilline de façon similaire à l'acide formique. Ces additifs ont permis d'augmenter le pH, de sorte que l'ionisation ait pu se produire directement dans la phase mobile. Par ailleurs, une suppression d'ionisation limitée se produit avec l'hydroxyde d'ammonium et ce même pour des fortes concentrations. En revanche, comme pour l'acide formique, lorsque la concentration de formiate d'ammonium dépasse 1 mM, on observe une perte de signal pour les quatre composés. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène repose sur la taille de la partie anionique du formiate d'ammonium  $\text{HCOO}^-$  qui a un volume plus élevé que celle de l'hydroxyde d'ammonium  $\text{OH}^-$ . Ainsi,  $\text{HCOO}^-$  a une meilleure affinité pour la surface des gouttelettes, ce qui entraîne une compétition pour l'ionisation entre le  $\text{HCOO}^-$  à haute concentration et les solutés. De plus, il est également possible de former des adduits de type  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$  en présence d'acide formique qui pourraient entrer en compétition avec la formation des ions  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Dans les conditions employées, seul l'acide vanillique et l'acide syringique ont formé des adduits de ce type. Toutefois, il ne semble pas que ces derniers soient en compétition avec les ions  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . En effet, de façon similaire, les aires des EIC des deux types d'ions diminuent simultanément au-delà de 1 mM de FA (Figure 42).

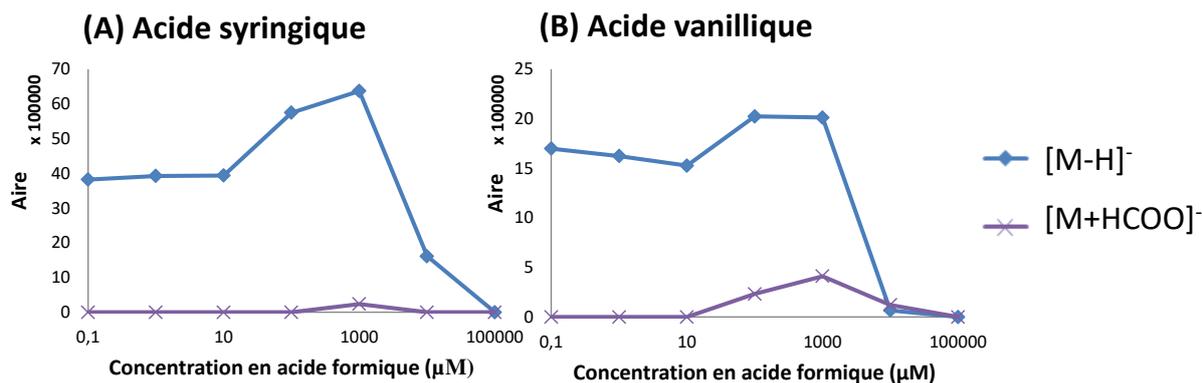


Figure 42 : Impact de l'acide formique sur la formation des ions  $[M-H]^-$  et  $[M+HCOO]^-$  en APCI négatif pour (A) l'acide syringique et (B) l'acide vanillique

En ce qui concerne l'APCI négatif, le pH de la phase mobile n'a ici plus d'impact étant donné que l'ionisation a lieu en phase gazeuse. Ainsi, des tendances similaires sont observées avec l'acide formique et le formiate d'ammonium. Une perte de signal apparaît vers 1 mM pour ces deux additifs. À l'inverse, l'augmentation de la concentration en hydroxyde d'ammonium permet dans un premier temps d'augmenter le signal puis un palier est visible entre 1 et 50 mM.

Au vu de ces résultats, le **pourcentage initial d'acide formique dans la phase mobile : 0,01% (v/v) correspondant à 2,7 mM**, a été maintenu. Par ailleurs, l'ajout d'un make-up composé d'hydroxyde d'ammonium pourrait sembler pertinent. Toutefois, l'ajout de ce dernier reviendrait à injecter dans les sources d'ionisation un solvant composé à la fois d'acide formique et d'hydroxyde d'ammonium. Afin de vérifier le potentiel apport du make-up, un échantillon aqueux issu du prétraitement d'une biomasse a été analysé en APCI négatif avec uniquement de l'acide formique dans la phase mobile puis avec une solution d'hydroxyde d'ammonium à 50 mM ajouté post-colonne (Figure S2). L'hydroxyde d'ammonium a eu pour effet de diminuer le signal. En conclusion, **aucun additif supplémentaire n'a été ajouté comme make-up dans les modes ESI et APCI négatif. Ces conditions sont également compatibles avec les modes ESI et APCI positif.** L'ajout d'acide formique n'a pas eu d'impact sur la réponse de quatre molécules modèles en APCI positif. En revanche, l'ajout d'hydroxyde et de formiate d'ammonium résulte en une forte diminution des aires des ions  $[M+H]^+$  (Figure 43).

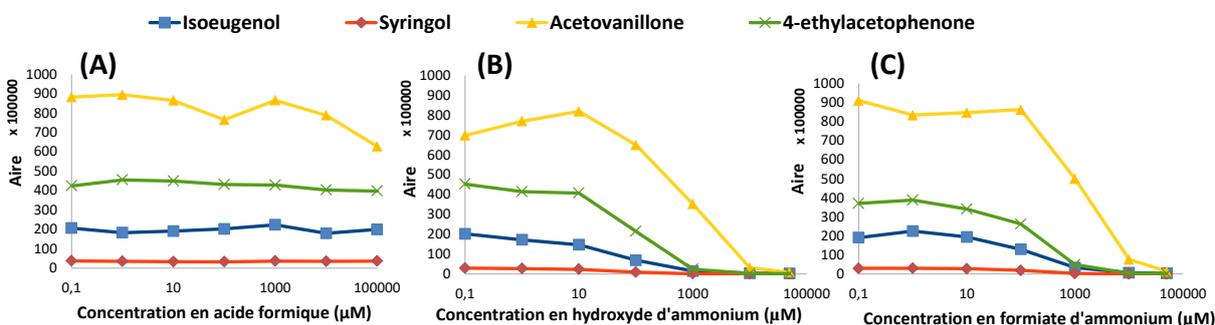


Figure 43 : Impact de (A) l'acide formique, (B) hydroxyde et (C) formiate d'ammonium sur les aires des ions  $[M+H]^+$  des quatre molécules modèles en APCI positif

Pour le syringol, l'acétovanillone et le 4-éthylacétophénone, l'augmentation de la concentration des sels d'ammonium a conduit à la formation d'ions du type  $[M+NH_4]^+$ . L'intensité relative des ions  $[M+NH_4]^+$  reste infime en comparaison des ions  $[M+H]^+$  pour l'acétovanillone et le

4-éthylacétophone, en revanche, pour le syringol, au-dessus de 100  $\mu\text{M}$  d'hydroxyde ou de formiate d'ammonium, l'adduit ammonium est plus intense que  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figure 44).

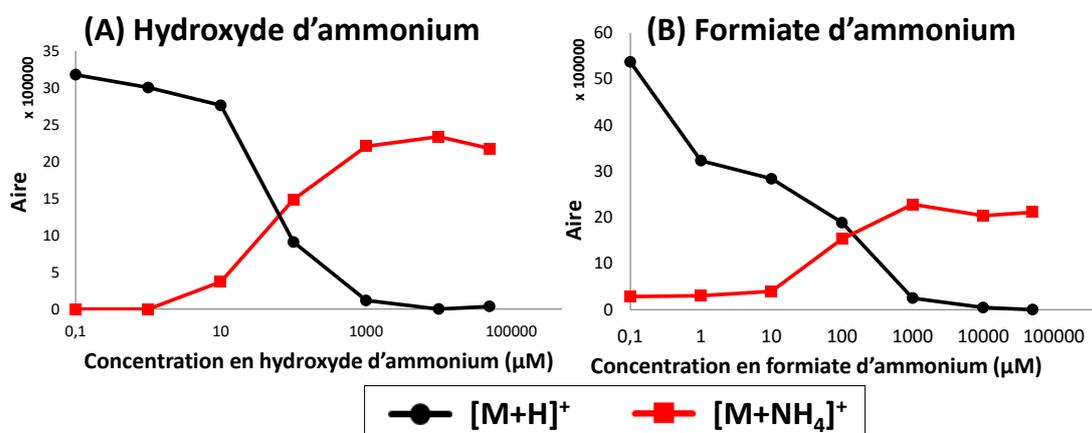


Figure 44 : Impact (A) de l'hydroxyde et (B) formiate d'ammonium sur le type d'ions formé par le syringol en APPI positif. En ESI positif, trois pourcentages d'acide formique dans la phase mobile ont été comparés (0,01%, 0,025% et 0,05%). Il s'est avéré que le meilleur signal était obtenu avec le plus faible pourcentage d'acide, soit 0,01%.

Le Tableau 15 résume les paramètres optimisés à ce stade et ceux restant à être optimisés via des plans d'expériences dans la seconde partie de ce chapitre.

Tableau 15 : Récapitulatif des paramètres optimisés à ce stade et de ceux restant à être optimisés via les plans d'expériences

	ESI positif	ESI négatif	APCI positif	APCI négatif
<b>Ratio de split</b>	0,45 (1:2,2)		/	
<b>Additif</b>	0,01% d'acide formique dans les phases mobiles			
<b>Position de la source</b>	D			
<b>Tension du spray / décharge corona</b>	4,0 kV	-3,5 kV	20 $\mu\text{A}$	
<b>Gaz nébulisant</b>	Optimisés via les plans d'expériences			
<b>Gaz séchant</b>				
<b>Gaz rideau</b>				
<b>Température du capillaire de transfert</b>				
<b>Tension du capillaire de transfert</b>				
<b>Tension de la première lentille</b>	+25 V par rapport à la tension du capillaire de transfert			

#### 4. Plans d'expériences composites centrés pour l'optimisation des conditions des sources ESI et APCI

Il existe un large choix de plans d'expériences. On distingue souvent les plans de criblage qui correspondent majoritairement à des plans factoriels fractionnaires, et les plans de surface de

réponse tels que les plans composites. Les plans factoriels complets à deux niveaux nécessitent de réaliser  $2^k$  expériences, avec  $k$  le nombre de facteurs, et permettent ainsi d'établir des modèles mathématiques du premier degré permettant de prendre en compte les interactions entre les facteurs. En considérant uniquement les interactions d'ordre deux, c'est-à-dire impliquant seulement deux facteurs, les plans factoriels complets à deux niveaux permettent d'obtenir l'équation de régression ci-dessous :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Éq. 14})$$

où  $y$  est la réponse,  $x_i$  la valeur du facteur  $i$ ,  $\beta_0$  une constante,  $\beta_i$  les coefficients du premier ordre et  $\beta_{ij}$  les coefficients d'interaction d'ordre deux entre les facteurs  $i$  et  $j$ .

Afin de diminuer le nombre d'expériences, des plans factoriels fractionnaires à deux niveaux demandant  $2^{k-1}$  expériences peuvent être réalisés. Dans le cas où le nombre de facteurs est égal à 5, ce type de plans permettra également de modéliser les réponses selon l'équation 9. En revanche, les interactions d'ordre supérieur à deux seront aliasées, c'est-à-dire confondues, avec les autres coefficients du modèle. Les plans factoriels complets et fractionnaires à deux niveaux, ne peuvent construire que des modèles linaires. Pour obtenir un modèle quadratique, il faut un minimum de trois niveaux par facteurs. Bien qu'il existe des plans factoriels à trois niveaux, ces derniers sont très coûteux en nombre d'expériences. En effet, pour cinq facteurs, un plan d'expériences factoriel complet à trois niveaux est composé de 243 expériences. Dans cette thèse, **un plan d'expériences composite centré (CCD)** a donc été sélectionné afin de limiter le nombre d'expériences tout en ayant la possibilité de **modéliser les réponses selon un polynôme du second degré avec interactions du second ordre** (Éq. 15).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Éq. 15})$$

Avec  $\beta_{ii}$  les coefficients quadratiques.

Pour chaque mode d'ionisation, un plan d'expériences comprenant cinq paramètres clés a été construit. Pour l'ESI, les débits de gaz nébulisant, séchant et rideau, la température et la tension du capillaire de transfert ont été étudiés. Pour l'APCI, les expériences préliminaires ont montré que le débit du gaz rideau n'influait pas l'ionisation, il a donc été exclu du plan et la température du four tubulaire a été ajoutée à l'étude. Les plages étudiées pour chaque variable sont résumées dans le Tableau 16. **Le choix de ces plages, aussi nommées domaines d'études, est crucial pour modéliser les réponses par la suite.** En effet, avec des plages trop restreintes, on risquerait de modéliser les variations du bruit. À l'inverse, avec des plages trop larges, les risques seraient (1) qu'un modèle quadratique ne soit pas capable de modéliser les réponses et (2) d'avoir une part importante des expériences avec une réponse nulle, en particulier pour les extrémités du plan.

**Tableau 16 : CCD pour les quatre modes d'ionisation (UA correspond à des unités arbitraires).**

Mode	Facteurs	Unité	Minimum	Maximum	Valeur basse « -1 »	Valeur haute « +1 »	Centre	
ESI positif	A	Gaz nébulisant	UA	10	36	-1 = 10	+1 = 36	22,9
	B	Gaz séchant	UA	0	24	-1 = 0	+1 = 24	12,1
	C	Gaz rideau	UA	0	14	-1 = 0	+1 = 14	7,05
	D	Température du capillaire de transfert	°C	200	360	-1 = 200	+1 = 360	279
	E	Tension du capillaire de transfert	V	50	110	-1 = 50	+1 = 110	79,8
ESI négatif	A	Gaz nébulisant	UA	10	40	-1 = 19	+1 = 31	25
	B	Gaz séchant	UA	0	14	-1 = 6	+1 = 14	10
	C	Gaz rideau	UA	6	20	-1 = 6	+1 = 14	10
	D	Température du capillaire de transfert	°C	170	350	-1 = 222	+1 = 298	260
	E	Tension du capillaire de transfert	V	-50	-100	-1 = -65	+1 = -86	-75
APCI positif	A	Gaz nébulisant	UA	10	50	-1 = 10	+1 = 50	30
	B	Gaz séchant	UA	10	40	-1 = 10	+1 = 40	25
	C	Température du capillaire de transfert	°C	250	450	-1 = 250	+1 = 450	350
	D	Tension du capillaire de transfert	V	20	50	-1 = 20	+1 = 50	35
	E	Température du four tubulaire	°C	250	450	-1 = 250	+1 = 450	350
APCI négatif	A	Gaz nébulisant	UA	10	50	-1 = 10	+1 = 50	30
	B	Gaz séchant	UA	10	40	-1 = 10	+1 = 40	25
	C	Température du capillaire de transfert	°C	250	450	-1 = 250	+1 = 450	350
	D	Tension du capillaire de transfert	V	-20	-50	-1 = -20	+1 = -50	-35
	E	Température du four tubulaire	°C	250	450	-1 = 250	+1 = 450	350

Chaque CCD est composé de :

- un plan factoriel avec  $2^k$  expériences (k étant le nombre de facteurs, ici 5), chaque point factoriel a été répété 3 fois,
- $2 \times k$  points axiaux également répétés 3 fois,
- 5 points centraux.

Dans ce travail, l'ensemble des points expérimentaux ont été répétés et non uniquement le point central comme cela se fait habituellement dans la littérature [122,171,178,193]. De cette façon, la répétabilité de chaque set de conditions a été estimée et les conditions d'ionisation instables ont pu être mises en évidence. Au total, 131 injections du mélange modèle MM1 ou MM2 selon le mode d'ionisation (positif ou négatif) ont été effectuées pour chacun des quatre modes d'ionisation. Les EIC des douze composés modèles ont été intégrés. Les aires mesurées ont été utilisées comme réponses et ont été exploitées en créant un modèle quadratique par molécule. Les modèles ont été construits avec 80% des points expérimentaux, les 20% restants ont été utilisés comme points de validation. En effet, un modèle comportant cinq facteurs nécessite le calcul de 21 coefficients (6 coefficients du premier ordre, 5 coefficients quadratiques et 10 coefficients d'interactions doubles) et donc la réalisation d'un minimum de 21 expériences. Or, nous réalisons 43 sets de conditions (hors répétitions) par plans d'expériences, soit un degré de liberté de 22 ce qui nous permet d'utiliser certains points des plans d'expériences comme points de validation. Enfin, la dernière étape a

consisté à optimiser les réponses des composés simultanément avec une fonction de désirabilité afin d'obtenir les conditions les plus appropriées.

**Les résultats provenant de l'APCI négatif sont présentés à titre d'exemple dans ce chapitre.**

Dans un premier temps, pour simplifier le modèle, seuls les coefficients significatifs ayant une valeur p inférieure à 0,1 ont été conservés. L'analyse de la variance (ANOVA) du modèle quadratique pour l'acide vanillique est présentée dans le Tableau 17. La valeur F du modèle est égale à 58,42, ce qui indique que le modèle est significatif (valeur-p < 0,05). Une valeur-p inférieure à 0,05 indique que les termes du modèle sont significatifs (avec un intervalle de confiance  $\alpha = 0,05$ ). Dans ce cas, A, B, D, E, AB, AC, AE, BC, BD, CD, CE, A<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> et D<sup>2</sup> ont été considérés comme des termes significatifs. Bien que le coefficient C, correspondant à la température du capillaire de transfert, ne soit pas significatif, le coefficient quadratique C<sup>2</sup> et plusieurs coefficients d'interaction impliquant le paramètre C sont quant à eux significatifs. Cet exemple surligne bien l'importance de prendre un modèle quadratique.

**Tableau 17 : ANOVA du modèle quadratique pour l'acide vanillique en APCI négatif**

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Valeur F	Valeur p
Modèle	3,834E+014	16	2,396E+013	58,42	< 0,0001
A	8,610E+012	1	8,610E+012	20,99	< 0,0001
B	1,374E+013	1	1,374E+013	33,49	< 0,0001
C	6,838E+011	1	6,838E+011	1,67	0,2001
D	1,637E+013	1	1,637E+013	39,92	< 0,0001
E	2,969E+013	1	2,969E+013	72,39	< 0,0001
AB	2,701E+012	1	2,701E+012	6,58	0,0120
AC	3,187E+012	1	3,187E+012	7,77	0,0065
AE	9,636E+012	1	9,636E+012	23,49	< 0,0001
BC	2,194E+012	1	2,194E+012	5,35	0,0231
BD	5,125E+012	1	5,125E+012	12,50	0,0007
BE	1,384E+012	1	1,384E+012	3,37	0,0696
CD	4,258E+013	1	4,258E+013	103,81	< 0,0001
CE	3,234E+013	1	3,234E+013	78,85	< 0,0001
A <sup>2</sup>	1,694E+012	1	1,694E+012	4,13	0,0452
C <sup>2</sup>	3,937E+013	1	3,937E+013	96,00	< 0,0001
D <sup>2</sup>	1,754E+012	1	1,754E+012	4,28	0,0416

Une seconde façon de démontrer l'importance de considérer à la fois les interactions entre les paramètres expérimentaux et les coefficients quadratiques, est de construire un modèle quadratique avec interactions, un modèle linéaire avec interactions et un modèle linéaire sans interactions. La Figure 45 représente les valeurs prédites en fonction des valeurs expérimentales pour ces trois modèles. Les points cochés correspondent aux points de vérification/validation.

**Le modèle linéaire sans interactions n'est dans la capacité ni de modéliser, ni de prédire la réponse de l'acide vanillique** comme le démontre la valeur très faible du R<sup>2</sup> (0,2230). **L'ajout des interactions permet d'améliorer le modèle linéaire, cependant son R<sup>2</sup> demeure faible (0,4511).** À l'inverse, **l'ajout simultané des termes quadratiques et des coefficients d'interactions permet d'obtenir un bon accord entre les résultats expérimentaux et les prévisions du modèle** avec un R<sup>2</sup> de 0,9148 pour le modèle quadratique de l'acide vanillique. Toutefois, le R<sup>2</sup> augmente chaque fois qu'une variable indépendante est ajoutée au modèle ; un modèle de régression contenant plus de variables qu'un autre devrait donc fournir une meilleure valeur de R<sup>2</sup> (le principal risque étant la sur-modélisation dans ce cas). Au contraire, le R<sup>2</sup><sub>ajusté</sub> n'augmente que si un nouveau terme améliore les performances du modèle, autrement ce dernier diminue. Le R<sup>2</sup><sub>prédit</sub> est utilisé afin de déterminer dans quelle mesure le modèle est capable de prédire des points expérimentaux non utilisés pour

construire le modèle. Pour calculer cette valeur, un point du plan d'expériences est provisoirement supprimé, puis l'équation de régression calcule/prédit la valeur théorique de la réponse en ce point. Cette procédure est effectuée sur l'ensemble des points du plan d'expériences. Le  $R^2_{\text{prédit}}$  est également un outil pour éviter la sur-modélisation. Dans notre cas, le  $R^2_{\text{prédit}}$  est de 0,8786, valeur en adéquation avec le  $R^2_{\text{ajusté}}$  de 0,8992. Le positionnement des points de validation sur les graphiques représentant la valeur prédite en fonction de la valeur expérimentale est également un indicateur de sur-modélisation. Notre plan d'expériences n'étant pas saturé (nombre d'expériences > nombre de coefficients), nous pouvons inclure les interactions triples dans le modèle quadratique de l'acide vanillique (Figure 46). Il apparaît alors que de nombreux points de validation sont éloignés de la droite de parité tandis que les points utilisés pour construire le modèle sont très proches de cette droite. Cette observation indique clairement une **sur-modélisation** de la réponse de l'acide vanillique en APCI négatif. Le **modèle quadratique avec interactions doubles est donc le modèle le plus performant**.

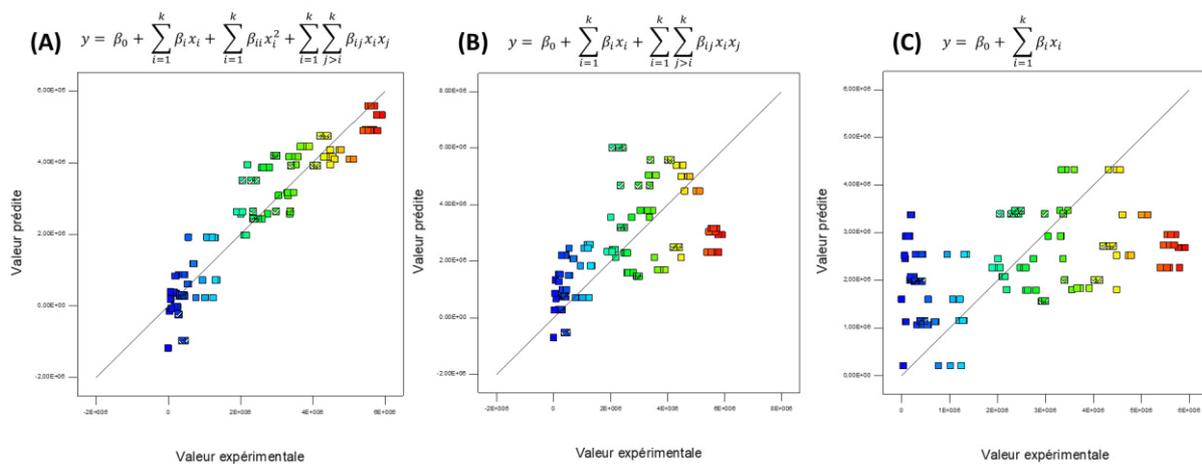


Figure 45 : Valeurs prédites en fonction des valeurs expérimentales avec (A) un modèle quadratique avec interactions (B) un modèle linéaire avec interactions et (C) un modèle linéaire sans interactions dans le cas de la réponse de l'acide vanillique en APCI négatif

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \sum_{l>n}^k \beta_{ijl} x_i x_j x_l$$

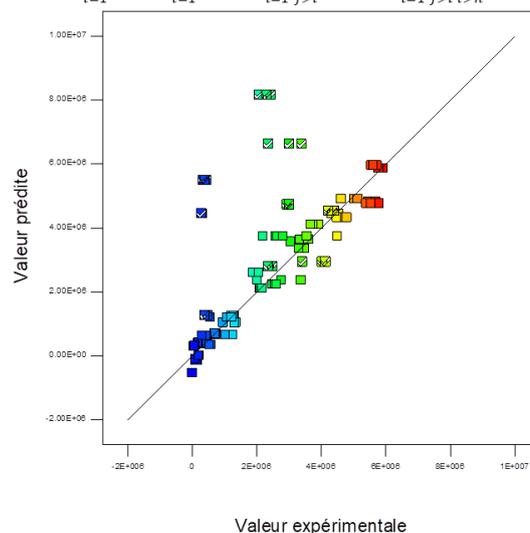
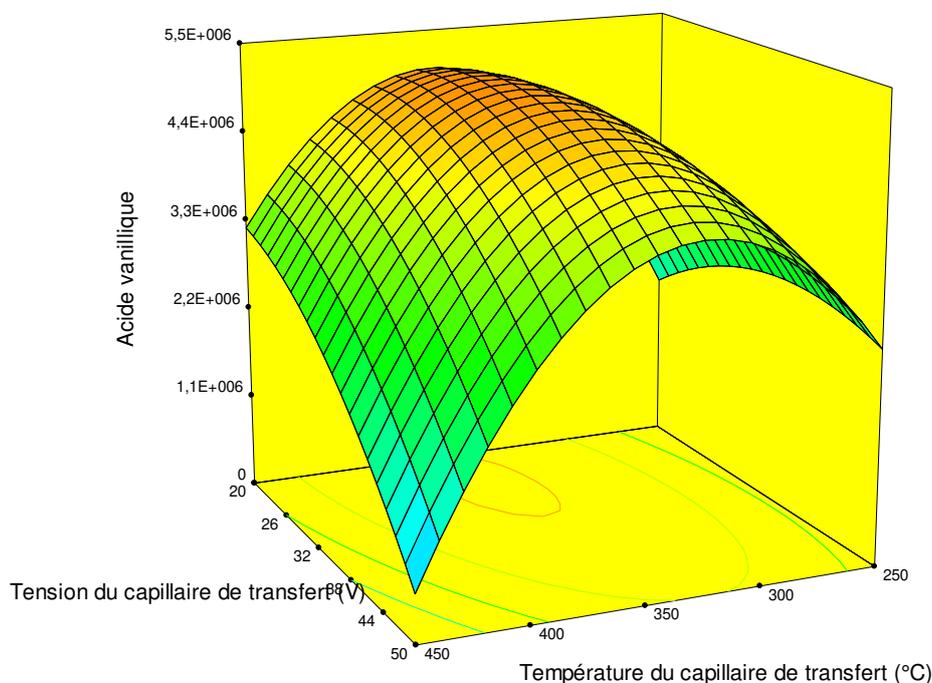


Figure 46 : Valeurs prédites en fonction des valeurs expérimentales avec un modèle quadratique avec interactions triples dans le cas de la réponse de l'acide vanillique en APCI négatif

Les interactions entre les facteurs peuvent être représentées à l'aide de surfaces de réponse. À titre d'exemple, la Figure 47 illustre la surface de réponse entre la température et la tension du capillaire de transfert pour l'acide vanillique en APCI négatif. Pour une faible tension du capillaire, la température optimale du capillaire est supérieure à 350°C alors que pour une tension élevée, une température inférieure à 350°C est préférée.



**Figure 47 : Surface de réponse de la tension du capillaire de transfert en fonction de sa température pour l'acide vanillique en APCI négatif (les gaz nébulisant, séchant et la température du four tubulaire sont fixés à 30 U.A., 20 U.A. et 350°C).**

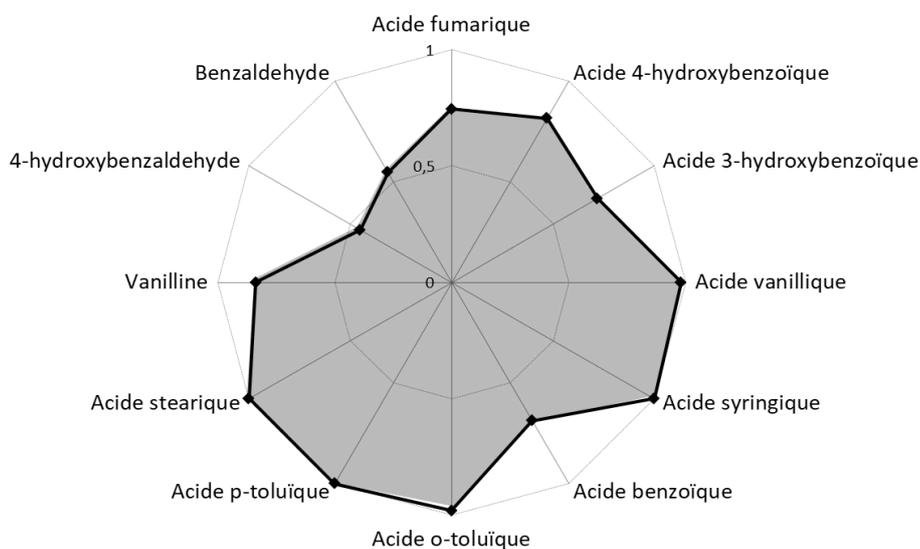
Lorsque tous les modèles quadratiques pour les douze composés modèles ont été construits, les conditions optimales pour chaque analyte peuvent être calculées individuellement. Cependant, dans cette étude, nous recherchons un unique set de paramètres optimaux permettant de détecter correctement tous les analytes. Ainsi, **une fonction de désirabilité qui combine tous les modèles quadratiques a été utilisée pour maximiser simultanément toutes les réponses** (Tableau 18).

**Tableau 18 : Conditions optimisées pour les quatre modes d'ionisation**

Facteurs	ESI neg	ESI pos	APCI neg	APCI pos
Débit du gaz nébulisant (AU)	32	36	39	50
Débit du gaz séchant (AU)	14	24	10	22
Débit du gaz rideau (AU)	6	0	/ (0)	/ (0)
Température du capillaire de transfert (°C)	298	275	376	250
Tension du capillaire de transfert (V)	-86	50	-29	20
Température du four tubulaire (°C)	/	/	450	404

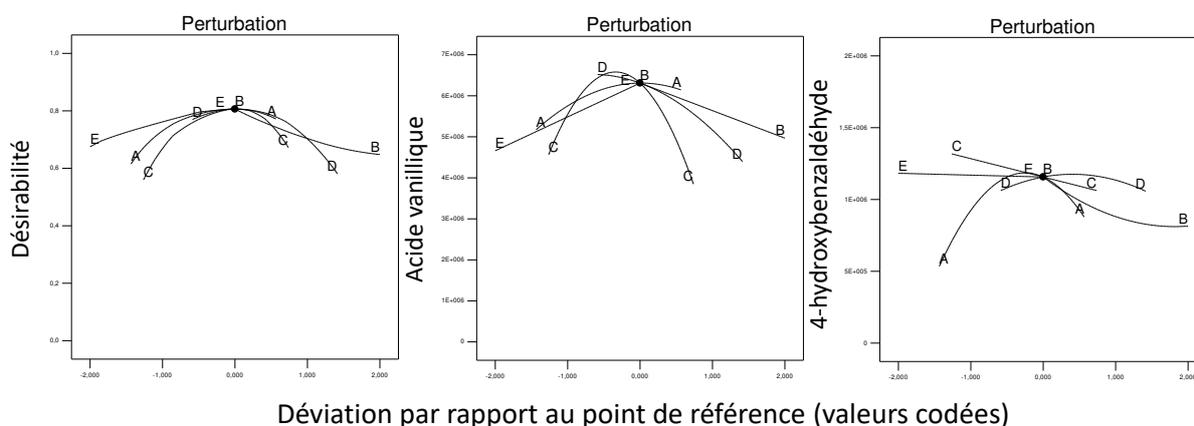
La fonction de désirabilité permet de trouver **le meilleur compromis** afin d'obtenir un signal suffisant pour chaque analyte. Ces conditions expérimentales optimales seront ensuite appliquées à des échantillons complexes contenant des analytes proches des composés modèles. L'objectif est donc de détecter le maximum de composés afin d'atteindre une caractérisation la plus complète possible.

Ainsi, dans les conditions optimisées, la réponse individuelle de chaque composé n'est pas nécessairement maximale (désirabilité individuelle < 1), en revanche, la désirabilité globale représentée par l'aire grisée sur la Figure 48, tend vers son maximum.



**Figure 48 : Désirabilités individuelles de chaque composé modèle dans les conditions optimisées en APCI négatif**

La Figure 49 décrit les perturbations dans des conditions optimisées pour la désirabilité et pour deux composés modèles (acide vanillique et 4-hydroxybenzaldéhyde). Par exemple, la valeur du facteur C (température du capillaire de transfert) a été optimisée à 376°C, toutefois, une meilleure réponse aurait été obtenue à une température plus basse pour l'acide vanillique. À l'inverse, une température légèrement supérieure aurait permis une meilleure ionisation du 4-hydroxybenzaldéhyde. Les conditions optimisées sont donc bel et bien un compromis permettant de détecter l'ensemble des analytes. Une autre remarque concerne la stabilité des conditions optimales. La perturbation de la fonction de désirabilité montre un plateau pour l'ensemble des paramètres expérimentaux à l'exception du facteur B (débit du gaz séchant). Cela signifie, par exemple, qu'une température du four tubulaire plus faible (facteur E) pourrait être utilisée sans avoir de conséquences importantes sur la désirabilité.



**Figure 49 : Impact de la modification des paramètres dans les conditions optimisées sur la fonction de désirabilité globale, l'acide vanillique et le 4-hydroxybenzaldéhyde**

Globalement pour les gaz nébulisant et séchant, des débits optimaux plus élevés sont obtenus dans le mode positif que dans le mode négatif. En contrepartie, des températures plus élevées ont été

déterminées en mode négatif. Cette différence de conditions de désolvatation entre le mode positif et négatif pourrait être liée à une plus grande stabilité des ions en mode négatif.

## 5. Application des méthodes optimisées à une huile de pyrolyse

Les conditions optimisées ont été appliquées à une huile de pyrolyse rapide de bois. L'analyse LC-UV/HRMS résulte en cinq détections complémentaires : UV, ESI et APCI en modes positif et négatif (ESI+, APCI+, ESI-, APCI-). Les spectres UV ont été enregistrés de 210 à 400 nm. L'identification des formules brutes a été réalisée en considérant entre 0 et 100 atomes de carbone, hydrogène et oxygène ainsi qu'avec une précision de 2 ppm.

Le chromatogramme UV à 254 nm et le BPC (*Base Peak Chromatogram*) en ESI négatif de l'huile de pyrolyse sont représentés Figure 50. Le BPC en ESI négatif comporte un grand nombre de pics révélant une sensibilité élevée, en particulier entre 10 et 30 minutes.

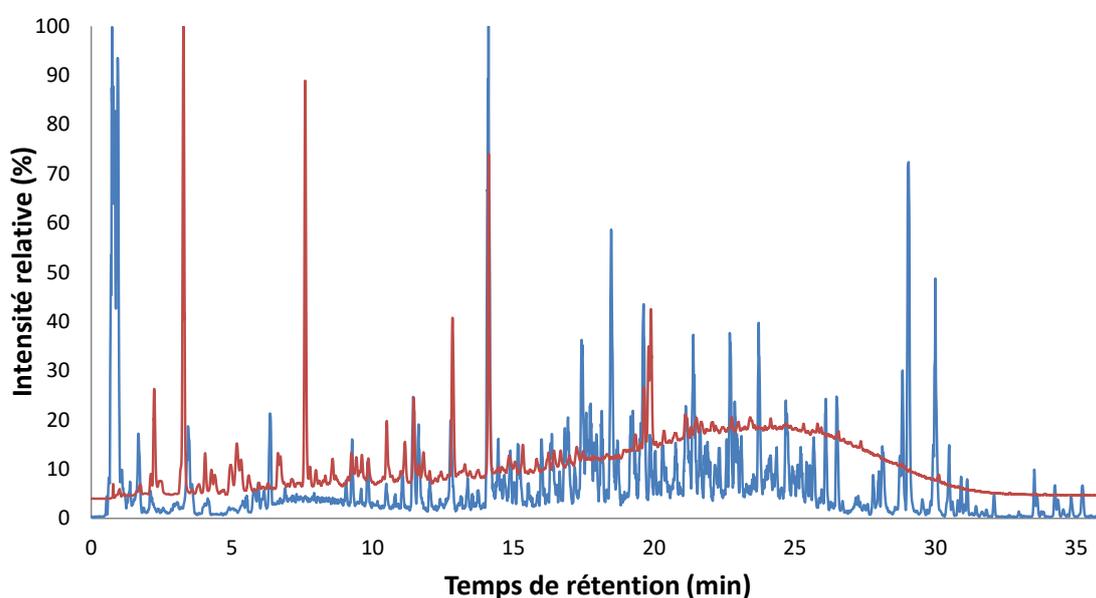


Figure 50 : Chromatogrammes UV à 254 nm (en rouge) et BPC en ESI négatif (en bleu) d'une huile de pyrolyse

En intégrant l'ensemble du BPC en ESI négatif, deux zones principales sont clairement distinguées sur le spectre de masse (Figure 51). La première comprend des rapports  $m/z$  entre 100 et 450 alors que la seconde se situe entre 450 et 900  $m/z$ . Lorsque l'huile de pyrolyse est infusée sans aucune dimension de séparation chromatographique en amont de la source d'ionisation, la seconde zone du spectre de masse n'est pas aussi bien détectée en raison du phénomène de suppression d'ionisation.

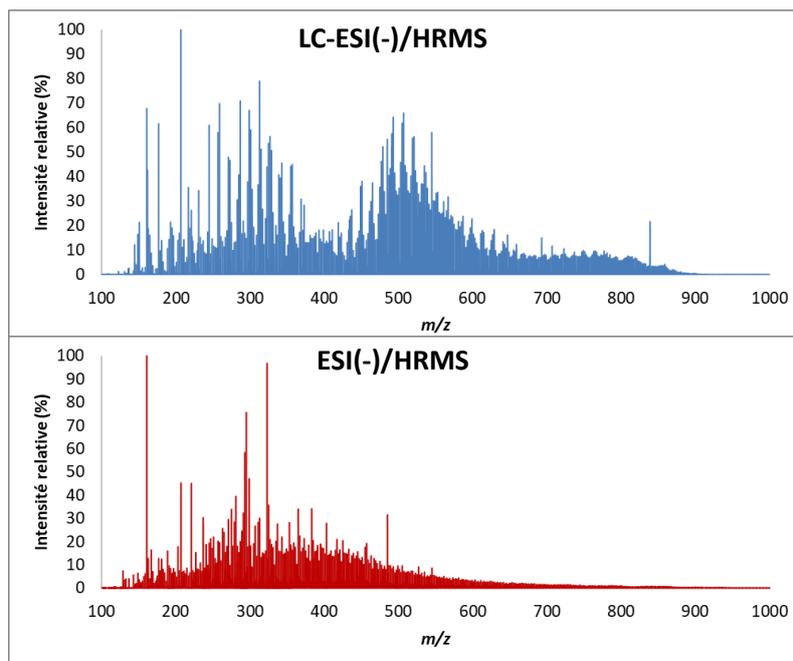


Figure 51 : Spectres de masse d'une huile de pyrolyse obtenus avec et sans méthode de séparation en amont de la source ESI négatif

Un biais peut donc être introduit pour la caractérisation des bio-huiles avec l'analyse par introduction directe, en particulier pour les composés lourds ( $m/z > 500$ ). Afin d'identifier les classes de molécules qui souffrent de ce phénomène de suppression d'ions en introduction directe, la distribution du nombre d'atomes d'oxygène des composés détectés en ESI négatif par introduction directe a été comparée à celle obtenue avec le couplage LC/HRMS (Figure 52). Il apparaît que les molécules ayant un faible nombre d'atomes d'oxygène ( $< 4$ ) n'ont pas été détectées en introduction directe. Ainsi, la séparation préalable par chromatographie liquide améliore considérablement la détection des molécules lourdes et des molécules modérément polaires.

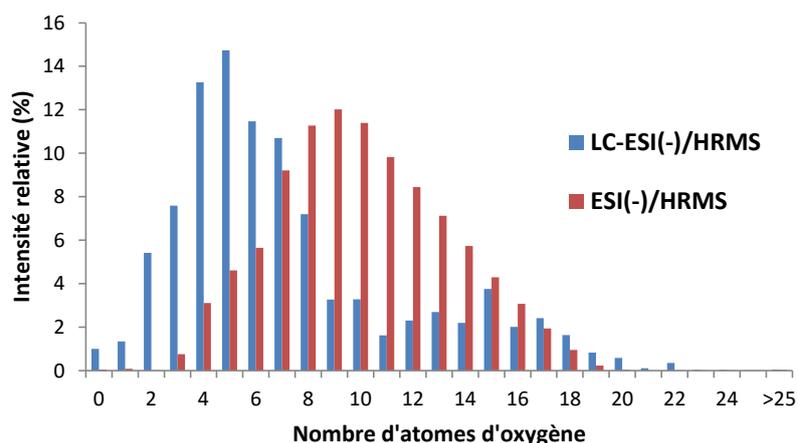


Figure 52 : Distribution qualitative du nombre d'atomes d'oxygène des composés détectés en ESI négatif par LC/HRMS (en bleu) et par infusion (en rouge)

Par ailleurs, en plus de limiter l'effet de suppression d'ionisation, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse permet de distinguer les isomères, ce qui est impossible avec l'analyse en introduction directe. Le Tableau 19 présente quelques exemples d'isomères élués à différents temps de rétention.

**Tableau 19 : Exemples d'isomères présents dans une huile de pyrolyse séparés et détectés par LC/HRMS**

Formules brutes	Temps de rétention (min)				Masse unitaire (uma)	
$C_7H_6O_3$	8.42	9.08	10.32		137	
$C_6H_8O_4$	5.1	8.42	9.21		143	
$C_9H_{10}O_2$	16.49	16.91	17.14		149	
$C_8H_8O_3$	10.32	11.94	13.2		151	
$C_9H_8O_3$	11.31	12.13			163	
$C_9H_{10}O_3$	9.55	10.09	13.33	13.67	14.19	165
$C_8H_8O_4$	10.12	10.98	11.34	12.7		167
$C_9H_{12}O_3$	8.89	9.77				167
$C_{10}H_{10}O_3$	12.96	14.19	14.62			177
$C_9H_{10}O_4$	6.51	9.84	10.18	11.42	11.54	181
$C_{13}H_{12}O_4$	14.79	16.61	17.96	18.1	20.13	231
$C_{14}H_{14}O_4$	17.06	17.67	19.83	20.13	20.61	245
$C_{15}H_{14}O_4$	17.93	18.92	19.67			257
$C_{15}H_{16}O_4$	18.45	19.24	19.93	21.63	21.94	259
$C_{15}H_{14}O_5$	15.73	17.44	18.65			273
$C_{16}H_{18}O_4$	23.21	23.38	23.61	23.92		273
$C_{17}H_{16}O_5$	17.69	19.75	20.93	22.17	25.31	299
$C_{17}H_{16}O_5$	17.69	19.75	20.93			299
$C_{18}H_{18}O_5$	21.27	22.41	22.83			313
$C_{19}H_{22}O_5$	18.98	19.45	21.05			329
$C_{28}H_{32}O_7$	24.22	24.48				479
$C_{20}H_{32}O_{13}$	22.58	23.19				479
$C_{27}H_{28}O_8$	21.19	21.84				479
$C_{28}H_{30}O_8$	21.4	22.13	22.49			493
$C_{29}H_{34}O_7$	25.19	25.51				493
$C_{22}H_{36}O_{18}$	6.44	6.85				587

De plus, un **gain de résolution est apporté par la dimension de séparation LC**, compensant ou améliorant la résolution relativement faible de la HRMS dans nos conditions de couplage. En effet, pour rappel, la résolution du FT-ICR a été abaissée à 12 500 à  $m/z$  400 afin d'obtenir un nombre de points suffisant à la description des pics chromatographiques. À cette résolution, la HRMS seule ne permettrait pas de distinguer des composés tels que  $C_{28}H_{32}O_7$  ( $[M-H]^- = 479.2073 m/z$ ),  $C_{20}H_{32}O_{13}$  ( $[M-H]^- = 479.1770 m/z$ ) et  $C_{27}H_{28}O_8$  ( $[M-H]^- = 479.1711 m/z$ ) (Tableau 19). En effet, pour une masse nominale de 479, la résolution en masse est d'environ 10 500 et par conséquent la largeur à mi-hauteur sur le spectre de masse est de 0,0456. L'écart en masse entre les composés  $C_{20}H_{32}O_{13}$  et  $C_{27}H_{28}O_8$  n'étant que de 0,0059 ; afin d'atteindre une séparation à la base des pics, une résolution d'environ 162 000 serait nécessaire en introduction directe, tandis qu'une résolution beaucoup plus faible est suffisante par LC/HRMS grâce à la résolution, plus communément nommée capacité de pics, apportée par la séparation LC. Dans l'exemple présenté, une capacité de pics de près de 300 est obtenue lors de l'analyse de l'huile de pyrolyse en RPLC. Les capacités de pics des couplages seront décrites dans le Chapitre 7.

Pour les échantillons complexes produisant un grand nombre de données à traiter, **le diagramme de van Krevelen est un bon moyen de représenter les données HRMS**. Le plus grand nombre de formules brutes identifiées a été obtenu en ESI négatif (*c.a.* 5500). À l'opposé, seulement 500 formules ont été identifiées avec le mode APCI négatif. Les bio-huiles lignocellulosiques sont connues pour être thermiquement instables de par la quantité importante de sucres et autres composés

thermosensibles qu'elles contiennent. Ainsi, lors de l'ionisation en APCI, les composés thermosensibles ont formé un substrat noir qui s'est déposé sur le four tubulaire de la source en raison de la température trop élevée (450°C). Néanmoins, des expériences à 350°C n'ont pas permis d'améliorer le signal. L'ESI étant une source d'ionisation plus douce que l'APCI, elle est donc plus adaptée à ce type d'échantillon. Toutefois, l'APCI à l'inverse de l'ESI, ne forme pas d'adduits pendant le processus d'ionisation, ce qui simplifie l'interprétation des données. De plus, l'APCI est complémentaire de l'ESI, en particulier pour les espèces de faible polarité qui souffrent d'une faible efficacité d'ionisation en ESI. Par rapport au mode d'ionisation négatif, seules 900 formules moléculaires ont pu être calculées avec le mode d'ionisation positif (APCI+ et ESI+). Pour une caractérisation la plus complète possible, l'utilisation des quatre modes d'ionisation est pertinente, comme le montre le diagramme de Venn (Figure 53).

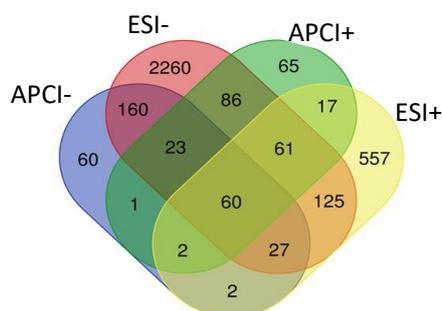


Figure 53 : Diagramme de Venn représentant le nombre de formules brutes identifiées dans les quatre modes d'ionisation

Un diagramme de van Krevelen incluant tous les modes d'ionisation a été construit (Figure 54) : les composés élués avec moins de 20% de MeOH ont été représentés en rouge, en bleu ceux élués entre 20 et 80% de MeOH et en vert avec plus de 80%. Les points rouges correspondent principalement aux composés de type sucre provenant de la cellulose et des hémicelluloses. Ces carbohydrates sont des composés très polaires et n'ont donc pas été très retenus sur la phase stationnaire apolaire. Les composés présentant une plus grande affinité avec la phase stationnaire (points bleus) correspondent probablement aux dérivés de la lignine (composés phénoliques). Enfin, les points verts éluant avec plus de 80% de MeOH pourraient correspondre à des lipides (acides gras et résiniques).

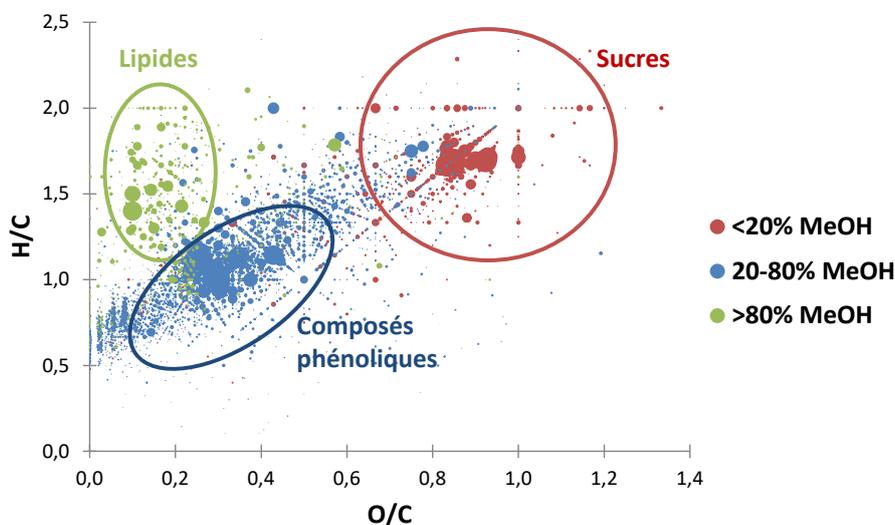


Figure 54 : Diagramme de van Krevelen d'une huile de pyrolyse rapide de bois

## 6. Conclusion

Bien que l'analyse LC-UV/HRMS ait montré un grand intérêt pour l'analyse de mélanges complexes depuis plusieurs années, peu de méthodologies d'optimisation rationnelles sont disponibles dans la littérature bien qu'elles soient nécessaires pour obtenir une méthode analytique sensible et contrôlée. Dans ce chapitre, **un plan d'expériences** a été réalisé afin **d'optimiser les étapes de désolvatation et d'ionisation** d'un système impliquant une colonne à polarité de phase inversée couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (FT-ICR). Les effets de cinq paramètres clés expérimentaux ont été étudiés pour **les sources ESI et APCI dans les modes positif et négatif**. Dans notre étude, plus de 130 expériences ont été réalisées pour chaque mode d'ionisation, en utilisant des mélanges modèles contenant 12 composés oxygénés. Cette approche chimiométrique a permis de **prendre en compte toutes les interactions possibles du second ordre**, ce qui n'aurait pas été possible avec l'optimisation classique consistant à faire varier une variable à la fois. Des **modèles quadratiques** ont été construits pour chaque composé modèle, puis **les réponses ont été simultanément maximisées à l'aide d'une fonction de désirabilité** permettant ainsi d'obtenir les conditions optimisées.

De plus, **le ratio de split, la position de la source d'ionisation et l'impact des additifs**, ont été étudiés en amont du plan d'expériences. En ce qui concerne l'ESI, un split a été ajouté afin de réduire le débit de la phase mobile à l'entrée du spectromètre de masse. La dispersion induite par ce système a été prise en compte pour conserver suffisamment de plateaux théoriques et ne pas re-mélanger des composés préalablement séparés en LC. De plus, il a été démontré qu'en ESI la position de la source avait un impact non négligeable sur la réponse des molécules modèles, à l'inverse de l'APCI. Enfin, au vu de l'étude sur l'influence de l'acide formique, l'hydroxyde et le formiate d'ammonium, aucun additif supplémentaire n'a été ajouté en sortie de LC.

Les **conditions optimisées en ESI et APCI en modes positif et négatif ont été appliquées à l'analyse d'une huile de pyrolyse rapide** afin d'illustrer l'efficacité d'une telle méthodologie. Le mode ESI négatif a permis une caractérisation détaillée de l'huile, fournissant plus de 5500 formules brutes. Un **biais entre l'analyse par LC/HRMS versus introduction directe** a également été observé, notamment pour les composés modérément polaires avec une haute masse moléculaire. Ainsi, la LC, première dimension du couplage, a permis **i) d'atténuer les effets de matrice** au sein de la source d'ionisation, **ii) de différencier les isomères** ayant les mêmes formules brutes mais des temps de rétention différents, **iii) de fournir des formules brutes** pour un grand nombre de composés oxygénés.

Toutefois, bien que le couplage LC/HRMS permette d'améliorer la caractérisation des échantillons issus de la biomasse lignocellulosique, il demeure de nombreuses co-élutions en LC qui peuvent conduire à des effets de matrice et donc des biais dans la composition des échantillons mais aussi complexifier l'interprétation des spectres de masse. Ainsi, le prochain chapitre traitera de l'analyse LC/HRMS d'échantillons de biomasse pré-fractionnés en amont. Par ailleurs, pour aller plus loin dans la connaissance des échantillons, une analyse structurale sera réalisée à l'aide d'expériences de fragmentation.



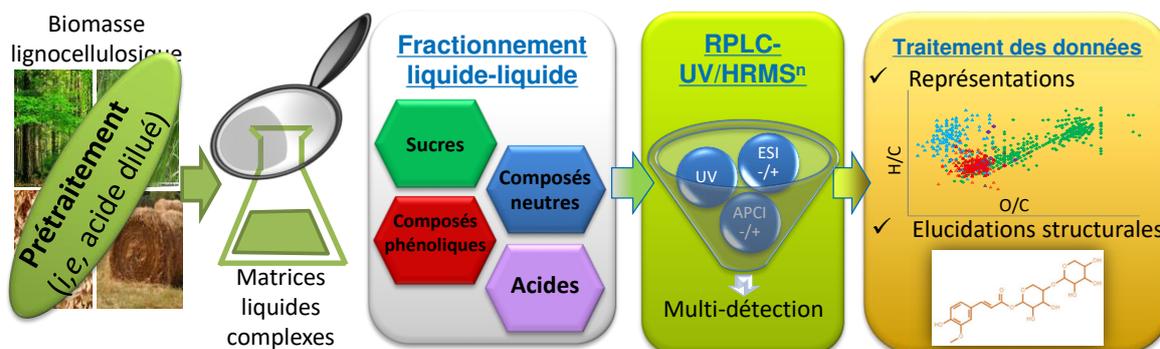
# Chapitre 4 – Couplage RPLC-UV/HRMS<sup>n</sup> pour caractériser des échantillons de biomasse pré-fractionnés

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

« Characterization of liquid–liquid extraction fractions from lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry »

Carole Reymond, Alexis Dubuis, Agnès Le Masle, Cyril Colas, Ludovic Chahen, Emilie Destandau, Nadège Charon

*Journal of Chromatography A* (2020) 460569, DOI 10.1016/j.chroma.2019. 460569



<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 105 -</b>
<b>2. PRESENTATION RPLC-UV/HRMS DES ECHANTILLONS DE BIOMASSE AQUEUX .....</b>	<b>- 106 -</b>
<b>3. FRACTIONNEMENT PAR EXTRACTIONS LIQUIDE-LIQUIDE SUCCESSIVES .....</b>	<b>- 107 -</b>
<b>4. CARACTERISATION DES FRACTIONS PAR RPLC/HRMS<sup>N</sup> .....</b>	<b>- 108 -</b>
4.1. FRACTION AQUEUSE 3 .....	- 110 -
4.1.1. <i>Fragmentation de molécules modèles représentatives</i> .....	- 110 -
4.1.2. <i>Caractérisation de l'échantillon</i> .....	- 111 -
4.2. FRACTION ORGANIQUE 2 .....	- 113 -
4.2.1. <i>Fragmentation de molécules modèles représentatives</i> .....	- 113 -
4.2.2. <i>Caractérisation de l'échantillon</i> .....	- 113 -
4.3. FRACTION ORGANIQUE 3 .....	- 114 -
4.3.1. <i>Fragmentation de molécules modèles représentatives</i> .....	- 114 -
4.3.2. <i>Caractérisation de l'échantillon</i> .....	- 115 -
4.4. FRACTION AQUEUSE 1 .....	- 116 -
<b>5. INTERET ET FIABILITE DES BASES DE DONNEES .....</b>	<b>- 123 -</b>
5.1. PRESENTATION DES PLATEFORMES .....	- 124 -
5.1.1. <i>MetFrag</i> .....	- 124 -
5.1.2. <i>CFM-ID</i> .....	- 126 -
5.2. EXEMPLES D'APPLICATION .....	- 128 -
<b>6. CONCLUSION .....</b>	<b>- 131 -</b>

## 1. Introduction

Dans le chapitre précédent, une méthodologie impliquant des plans d'expériences a été proposée afin d'optimiser des conditions de désolvatation et d'ionisation des analytes. Cette méthodologie a été appliquée à l'optimisation d'une méthode de séparation par chromatographie à polarité de phase inversée couplée à un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique. Quatre modes d'ionisation ont été utilisés en complément d'une détection UV : l'ESI et l'APCI dans les modes positif et négatif. Cette multi-détection a pour ambition de tendre vers une caractérisation la plus exhaustive possible des mélanges complexes. L'application à une huile de pyrolyse a révélé que la chromatographie en phase liquide en tant que première dimension permettait d'atténuer les effets de matrice au sein des sources API. En effet, un biais a été constaté entre la distribution des rapports  $m/z$  obtenus en introduction directe et en LC/HRMS. Par ailleurs, le couplage a permis de séparer des isomères et plus globalement d'augmenter la résolution globale de la méthode analytique.

Toutefois, **malgré l'apport du couplage LC/HRMS pour la caractérisation d'échantillons issus de la biomasse lignocellulosique, des co-élutions subsistent en LC.** Ainsi, des effets de matrice peuvent se produire et potentiellement créer un biais dans la caractérisation des mélanges d'intérêt. De plus, comme mentionné dans la partie *Objectif et Méthodologie de la thèse*, **des informations structurales sont requises.** Ainsi des expériences de fragmentation sont nécessaires pour approfondir la caractérisation et l'élucidation structurale des composés de ces échantillons.

Dans la littérature, une majorité des études traitant de la fragmentation induite par collision (CID) en HRMS avec ou sans dimension de séparation en amont, s'est concentrée sur les composés dérivés de la lignine [35–37,39,40,72,194–196]. Jarrell *et al.* ont étudié par LC/HRMS<sup>n</sup> les composés dérivant de la lignine produits à partir du traitement organosolv d'une biomasse [38]. L'étude de composés modèles ainsi que des expériences de fragmentation jusqu'à la MS<sup>3</sup> leur a permis de proposer environ 35 formules développées incluant des monomères et des dimères de dérivés de lignine, ainsi que des complexes lignine-carbohydrate (hétérosides). Ces complexes lignine-carbohydrate ont également été étudiés récemment par Boes *et al.* en HRMS<sup>n</sup> [28]. Cependant, lorsque l'on considère des échantillons très complexes, la LC peut manquer de résolution, ce qui entraîne des co-élutions et donc une augmentation des effets de matrice. Afin de simplifier la composition des échantillons et limiter les co-élutions, une étape de fractionnement peut être effectuée en amont de l'analyse RPLC/HRMS<sup>n</sup>. Parmi ces méthodes de fractionnement, l'extraction liquide-liquide (LLE) est une technique attrayante et facile à mettre en œuvre pour séparer des composés de polarités différentes [29,197,198]. De plus, elle permet de récupérer la totalité de l'échantillon, ce qui est essentiel pour caractériser pleinement les produits issus de la biomasse. Le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) a déjà été employé pour extraire les phénols, les acides organiques et les produits de dégradation neutres des hydrolysats de biomasse [29]. L'extraction au MTBE permet d'isoler des composés hautement hydrophiles tels que les sucres d'autres molécules oxygénées [14,199]. Une méthodologie intéressante basée sur des extractions liquide-liquide successives associées à des modifications du pH a été proposée par Kanaujia *et al.* pour fractionner une huile de pyrolyse rapide [197]. Ainsi, le fractionnement par LLE à plusieurs étapes semble être une approche prometteuse dans le but de fractionner les produits de la biomasse par familles chimiques [198].

**Des méthodes de fractionnement de matrices lignocellulosiques aqueuses ont également été mises en place au sein d'IFPEN au cours de la thèse d'Alexis Dubuis.** Parmi elles, une succession

d'extractions liquide-liquide a permis de fractionner les échantillons en quatre familles chimiques principales : sucres, acides organiques, composés phénoliques et composés neutres.

Dans ce chapitre, les fractions issues de ce protocole LLE sont caractérisées par RPLC/HRMS<sup>n</sup> en utilisant deux sources d'ionisation (ESI et APCI) dans les modes négatif et positif. L'objectif est ici d'étudier l'intégralité des échantillons issus de la biomasse lignocellulosique, des sucres jusqu'aux composés aromatiques provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses et de la solubilisation de la lignine. L'exploitation approfondie des données LC, HRMS et des spectres de fragmentation en lien avec une étude sur molécules modèles lorsque ces dernières sont disponibles, permettront de proposer des structures développées inédites et plus largement, d'avancer dans la compréhension de la composition des échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique. Par ailleurs, une dernière partie traitera de l'intérêt, de la fiabilité des bases de données et de la comparaison de spectres de fragmentation expérimentaux avec des spectres *in silico*.

## 2. Présentation RPLC-UV/HRMS des échantillons de biomasse aqueux

Dans un premier temps, plusieurs échantillons issus du prétraitement de la biomasse lignocellulosique ont été analysés par RPLC-UV/HRMS. La Figure 55 présente les chromatogrammes obtenus en UV et en ESI négatif pour huit échantillons étudiés. Les échantillons nommés A<sub>i</sub> sont des jus de cuisson acide de pailles de blé obtenus avec différents degrés de sévérité (température, quantité d'acide). Les échantillons B<sub>i</sub> quant à eux correspondent aux fractions des extractibles à l'eau de différents substrats de biomasse prétraités à l'acide (Cf. Chapitre 2). Les différentes allures des chromatogrammes démontrent clairement la diversité des échantillons en fonction du procédé de conversion et du substrat initial. Par ailleurs, similairement à l'huile de pyrolyse présentée dans le Chapitre 3, de nombreuses co-élutions demeurent en RPLC.

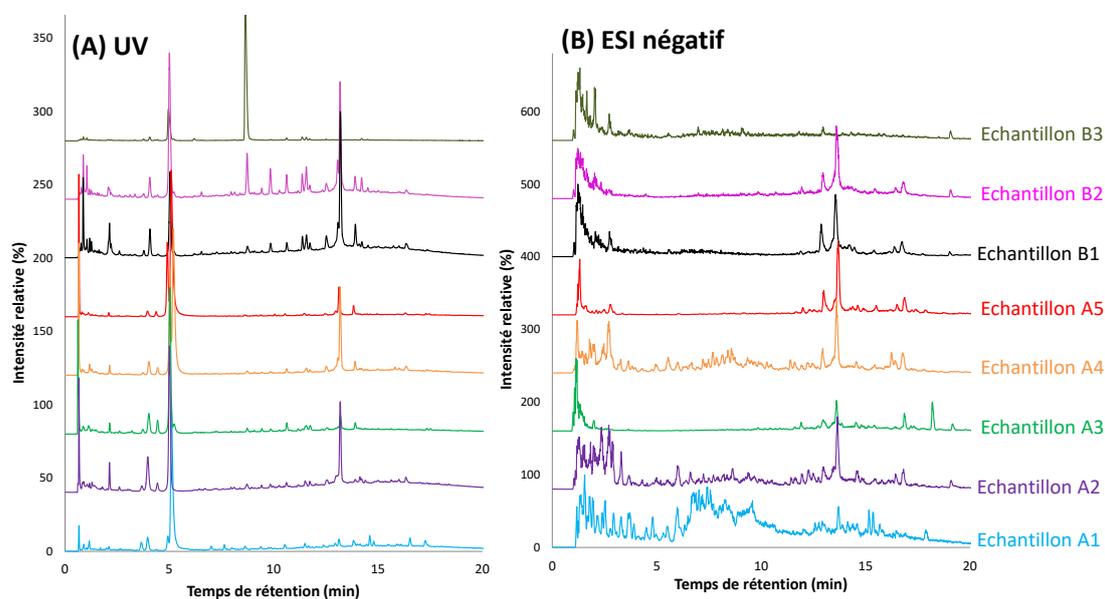


Figure 55 : Chromatogrammes obtenus en UV à 254 nm et en ESI négatif (TIC) de différents échantillons aqueux issus de la conversion biochimique de biomasses lignocellulosiques (colonne de type C18, phases mobiles (A) eau + 0,01% de FA / (B) MeOH + 0,01% de FA, gradient de 1% à 99% de B entre 4 et 30 min)

Bien qu'à première vue les chromatogrammes UV puissent sembler peu complexes, un agrandissement de ces derniers montre une forte dérive de la ligne de base liée à une résolution insuffisante pour séparer convenablement les analytes (Figure 56).

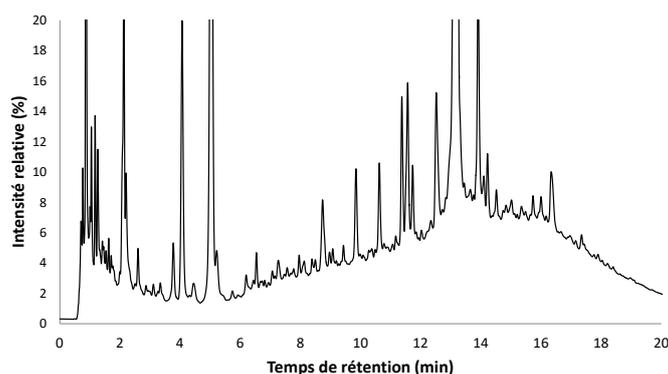


Figure 56 : Agrandissement du chromatogramme UV à 254 nm de l'échantillon B1

### 3. Fractionnement par extractions liquide-liquide successives

Le fractionnement basé sur des LLE successives a été sélectionné afin d'améliorer la caractérisation RPLC-UV/HRMS des échantillons de biomasse aqueux. **Quatre fractions, sélectives des familles chimiques ciblées, sont obtenues à partir de l'échantillon de biomasse initial.** L'objectif est de limiter les co-élutions afin d'améliorer l'interprétation des chromatogrammes ainsi que des données de fragmentation. Plus précisément, **les composés hautement solubles dans l'eau (c'est-à-dire les sucres) sont récupérés principalement dans la phase aqueuse 1 (AQ1), les composés non ionisables à pH 12 principalement dans la phase organique 2 (ORG2), les phénols (pKa > 9) principalement dans la phase organique 3 (ORG3) et les acides carboxyliques (pKa < 7) principalement dans la phase aqueuse 3 (AQ3) comme l'illustre la Figure 57.**

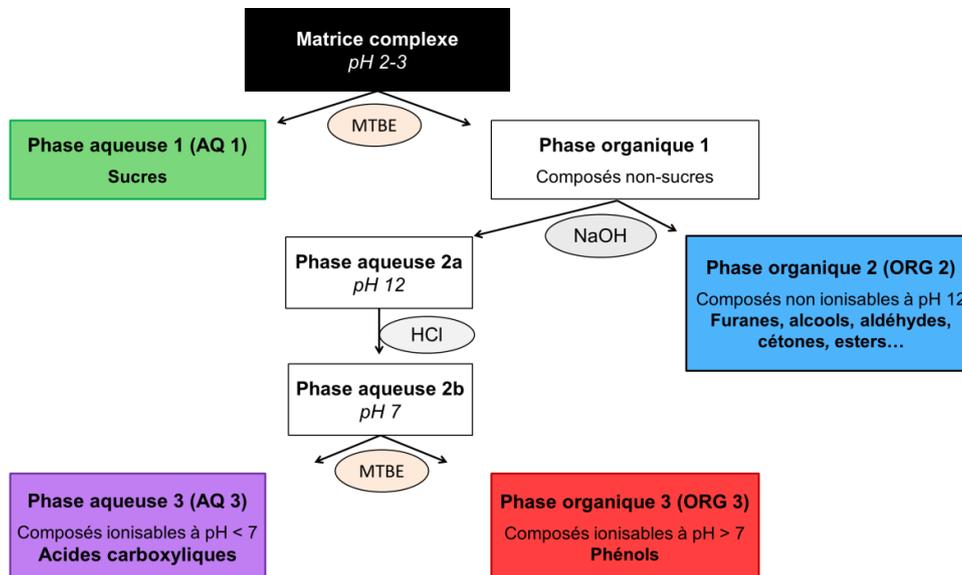
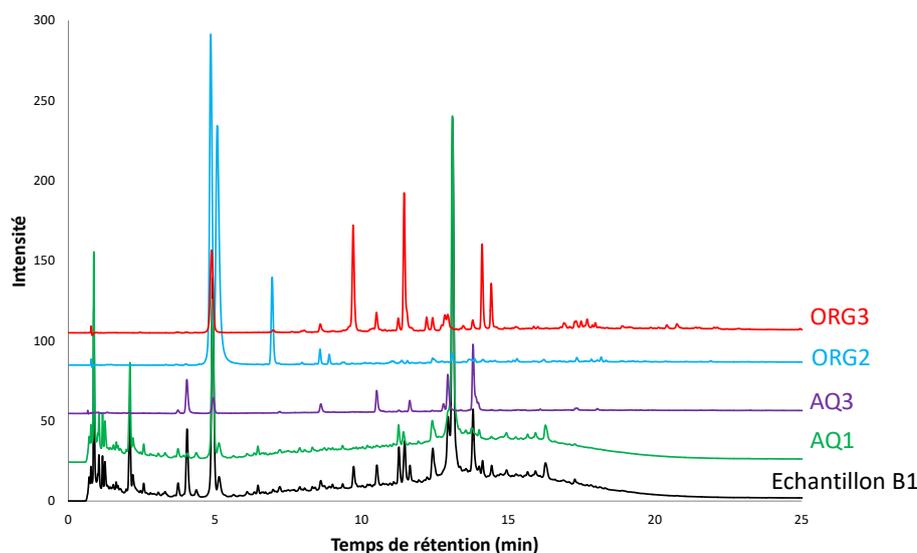


Figure 57 : Protocole LLE pour le fractionnement des échantillons aqueux issus de la conversion de la biomasse

Le protocole LLE a été appliqué à l'échantillon B1. Le bilan massique, réalisé sur les extraits secs des quatre fractions, a révélé **une proportion significative de sucres et la présence de produits minoritaires (AQ1 : 89%, ORG2 : 2%, ORG3 : 4%, AQ3 : 3%, pertes : 2%)**. Les fractions organiques ont été concentrées comme décrit dans le Chapitre 2 afin d'améliorer l'analyse des produits minoritaires. Pour rappel, les composés présents dans AQ1 ont la même concentration qu'initialement dans l'échantillon non-fractionné, ceux dans AQ3 ont été dilués par deux pendant le protocole LLE tandis

que ceux dans ORG2 et ORG3 ont été concentrés avec un facteur  $\times 18$ . Les chromatogrammes UV obtenus pour l'ensemble de l'échantillon et les fractions LLE sont présentés Figure 58.



**Figure 58 : Chromatogrammes UV à 254 nm de l'échantillon B1 non-fractionné et des quatre fractions LLE (colonne de type C18, phases mobiles (A) eau + 0,01% de FA / (B) MeoH + 0,01% de FA, gradient de 1% à 99% de B entre 4 et 30 min)**

Le chromatogramme UV à 254 nm de l'échantillon entier présente une soixantaine de pics d'intensités très différentes, révélant de nombreuses co-élutions. Il est donc difficile à traiter sans fractionnement préalable. Il est intéressant de noter que certaines molécules de type sucre dans AQ1 portent des groupes chromophores responsables de leur réponse en UV. Le couplage avec la HRMS et des expériences de fragmentation sont nécessaires afin de progresser dans la caractérisation structurale de ces composés polyfonctionnels.

#### 4. Caractérisation des fractions par RPLC/HRMS<sup>n</sup>

Bien que certaines fractions LLE représentent une partie minoritaire de l'échantillon, leur caractérisation est cruciale. En effet, lors du prétraitement de la biomasse qui est la première étape de la transformation biochimique, certains inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation alcoolique sont libérés. Ces inhibiteurs peuvent avoir un impact sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique, même à faible concentration. Certains d'entre eux sont déjà connus, comme les composés phénoliques ou les furanes, mais beaucoup d'autres demeurent encore inconnus. **Afin de caractériser toutes les classes de composés dans l'échantillon de biomasse initial, les fractions de LLE ont été analysées par RPLC/HRMS<sup>n</sup> en utilisant les sources ESI et APCI dans les modes positif et négatif (ESI-/+ et APCI-/+).** Les molécules déprotonées  $[M-H]^-$  et les molécules protonées  $[M+H]^+$  sont principalement formées en modes négatif et positif respectivement. La HRMS a permis de mesurer le rapport  $m/z$  avec une précision de 2 ppm. Les formules brutes ont été calculées en considérant entre 1 et 100 atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. L'azote a également été pris en compte pour les calculs des formules moléculaires en mode positif. Au total, pour les quatre fractions LLE, 480 formules ont été identifiées en ESI-, 444 en ESI+, 109 en APCI- et 122 en APCI+. Bien que l'ESI- soit le mode d'ionisation le plus approprié pour cet échantillon en détectant le plus grand nombre de composés, les autres détectations sont **complémentaires** et donc nécessaires pour une caractérisation complète de l'échantillon. Un diagramme de Venn est présenté en Figure 59, mettant en jeu les quatre modes d'ionisation utilisés.

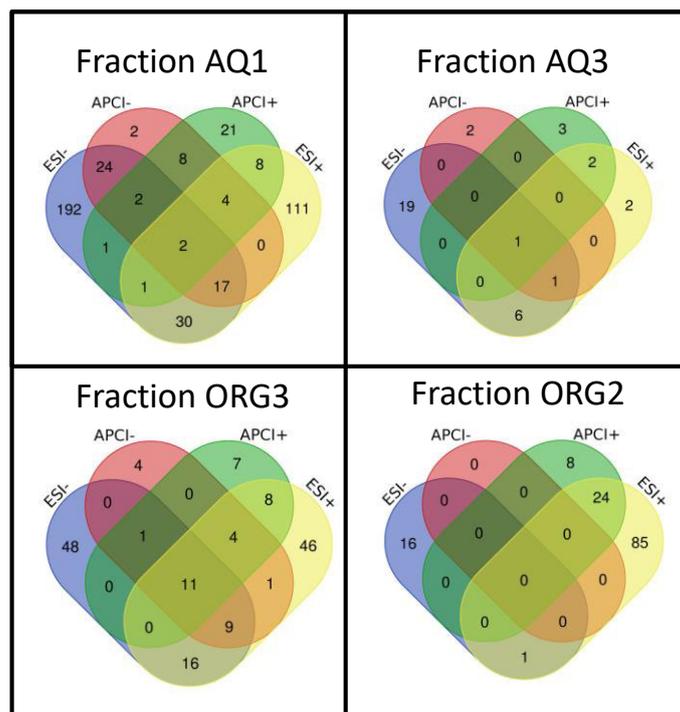


Figure 59 : Diagramme de Venn représentant le nombre de formules brutes identifiées dans les différents modes d'ionisation. Seules les formules brutes sont comptabilisées ici ; les isomères n'ont pas été considérés.

Pour représenter tous les composants détectés, des diagrammes de van Krevelen ont été construits, représentant les rapports atomiques H/C versus O/C afin de révéler les zones correspondantes aux différentes classes chimiques (Figure 60).

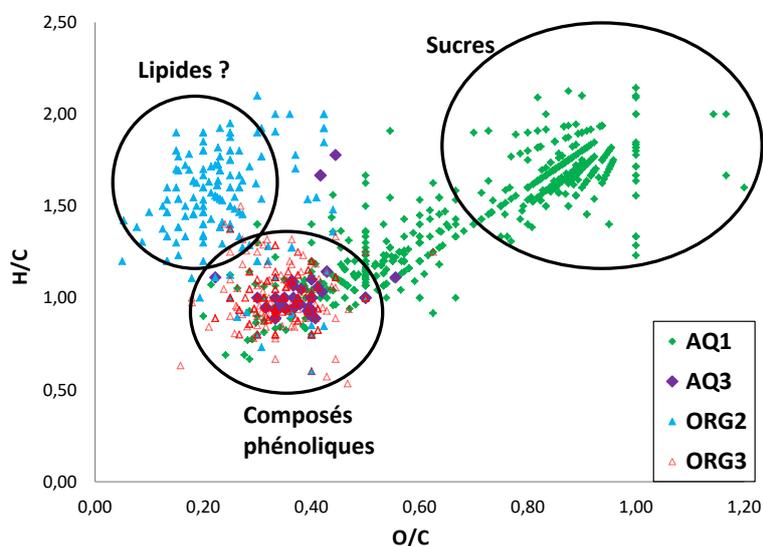


Figure 60 : Diagramme de van Krevelen regroupant l'ensemble des composés détectés pour les quatre fractions LLE

Les fractions LLE occupent des positions différentes sur le diagramme de van Krevelen, ce qui démontre la différence chimique entre les composés. AQ3 et ORG3 sont principalement centrées sur une zone située avec des rapports H/C et O/C de 1 et 0,4 respectivement. Cette zone correspond à celle des composés phénoliques [26]. La fraction ORG2 pourrait contenir des lipides avec des rapports H/C relativement élevés et des rapports O/C faibles [26]. Enfin, les composés présents dans AQ1 sont répartis en deux zones différentes, dont l'une correspondant aux sucres (rapports H/C et O/C supérieurs à 1,5 et 0,8 respectivement). La composition de chaque fraction est décrite en détails

dans la suite de ce chapitre. **Des spectres de masse de fragmentation ont été acquis à haute résolution pour les ions les plus abondants de chacune des quatre fractions et interprétés afin d'obtenir les formules brutes des fragments.** De plus, lorsque des molécules modèles représentatives des fractions étaient disponibles, une étude préalable de leur fragmentation a été réalisée. **Les expériences de fragmentation décrites dans ce chapitre ont été réalisées au sein d'une trappe ionique linéaire (LTQ) positionnée en amont de l'analyseur FT-ICR/MS.** Ainsi, la fragmentation CID produira des **fragments provenant uniquement de l'ion précurseur.**

#### 4.1. Fraction aqueuse 3

Selon le protocole LLE, **la fraction AQ3 est dédiée aux acides carboxyliques.** Par ailleurs, le diagramme de van Krevelen indique la présence de composés aromatiques dans cette fraction. Dans un premier temps, des acides phénoliques ont donc été étudiés afin d'appréhender les mécanismes de fragmentation de cette famille chimique. Le choix des étalons s'est également basé sur des molécules déjà identifiées dans ce type d'échantillons [14,33].

##### 4.1.1. Fragmentation de molécules modèles représentatives

Une douzaine d'acides carboxyliques aromatiques (MM3) ont été analysés en RPLC/HRMS<sup>n</sup>. Seul l'ion majoritaire (intensité relative à 100%) est sélectionné comme précurseur et soumis aux étapes de fragmentation. L'ensemble des acides carboxyliques étudiés possèdent un pKa inférieur à 5. Ils sont donc représentatifs des composés présents dans la fraction AQ3. Les fragments produits et identifiés en ESI négatif pour chacun d'eux sont présentés dans le Tableau 20.

Ces acides carboxyliques peuvent être compartimentés en plusieurs sous-catégories. La première catégorie comprend les **composés ne comportant pas de groupement méthoxyle.** Ces derniers ne présentent qu'**une seule perte de CO<sub>2</sub>.** En effet, les groupements hydroxyles portés par un cycle aromatique (groupement phénolique) ne sont pas fragmentés dans les conditions appliquées. De plus, pour les composés ne portant pas de groupement phénolique ou un seul (acides benzoïque et salicylique), aucun fragment n'a été détecté.

La seconde catégorie d'acides carboxyliques correspond aux **acides avec un groupement méthoxyle adjacent à un groupement hydroxyle.** Le fragment majoritaire en MS<sup>2</sup> pour cette catégorie est une **perte du radical •CH<sub>3</sub> associée à une perte de CO<sub>2</sub>** plus ou moins intense en fonction de la structure de la molécule. La comparaison des spectres MS<sup>2</sup> de l'acide férulique et de l'acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique (isomères de position) montre que l'intensité relative du fragment majoritaire, correspondant à la perte du radical •CH<sub>3</sub>, est de 100% pour les deux molécules alors que l'intensité relative correspondant à la perte de CO<sub>2</sub> n'est que de 10% pour l'acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique tandis qu'elle représente 75% pour l'acide férulique. Étant donné que ces molécules possèdent deux sites déprotonables (fonctions acide et phénol), le processus de fragmentation ne sera pas le même en fonction de la position de la charge. Une hypothèse serait que lorsque la charge se situe sur le groupement hydroxyle de l'acide férulique, cette dernière peut se délocaliser sur la fonction acide et ainsi favoriser la perte de CO<sub>2</sub>.

Enfin, la dernière catégorie inclut **les molécules avec deux fonctions méthoxyles** (acides syringique et sinapique). La fragmentation de ces composés a conduit à une **première perte majoritaire du radical •CH<sub>3</sub>** en MS<sup>2</sup> et une perte plus faible de CO<sub>2</sub>. En MS<sup>3</sup>, la perte majoritaire pour l'acide syringique est un autre radical •CH<sub>3</sub> tandis que l'acide sinapique perd principalement CO<sub>2</sub>. En MS<sup>4</sup>, l'inverse est donc logiquement observé. De façon surprenante, l'acide sinapique présente une perte

de CO en MS<sup>5</sup> indiquant une ouverture du cycle aromatique. La même observation avait été faite par Marcum *et al.* lors de la fragmentation de l'acide syringique et l'acide sinapique [41].

**Tableau 20 : Fragmentation des composés modèles de type acide carboxylique en ESI négatif**

Etalon (formule brute – pKa*)	Structure	m/z	t <sub>R</sub> (min)	Pertes MS <sup>2</sup>	Pertes MS <sup>3</sup>	Pertes MS <sup>4</sup>	Pertes MS <sup>5</sup>
Acide benzoïque (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> – 4,1)		121,0294	14,3	/			
Acide salicylique (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> – 2,8)		137,0243	9,0	/			
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> – 4,2)		153,0192	6,5	- CO <sub>2</sub> [100%]			
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> – 2,5)		153,0192	7,1	- CO <sub>2</sub> [100%]			
Acide cinnamique (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> – 4,3)		147,0451	18,2	- CO <sub>2</sub> [100%]			
Acide paracoumarique (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> – 3,8)		163,0399	13,2	- CO <sub>2</sub> [100%]			
Acide caféique (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> – 3,0)		179,0348	11,3	- CO <sub>2</sub> [100%]			
Acide férulique (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> – 3,6)		193,0505	14,2	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CO <sub>2</sub> [75%] - (*CH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub> ) [3%]	- CO <sub>2</sub> [100%]		
Acide 3-hydroxy-4-methoxycinnamique (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> – 3,6)		193,0505	14,9	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CO <sub>2</sub> [10%] - (*CH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub> ) [2%]	- CO <sub>2</sub> [100%]		
Acide vanillique (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> – 4,2)		167,0349	11,0	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CO <sub>2</sub> [6%]			
Acide syringique (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> – 3,9)		197,0454	12,1	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CO <sub>2</sub> [15%] - (*CH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub> ) [1%]	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CO <sub>2</sub> [1%]	- CO <sub>2</sub> [100%]	
Acide sinapique (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> – 3,4)		223,0610	14,6	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CO <sub>2</sub> [22%] - (*CH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub> ) [9%]	- CO <sub>2</sub> [100%] - •CH <sub>3</sub> [8%] - (*CH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub> ) [9%]	- •CH <sub>3</sub> [100%] - CHO [5%]	- CO [100%]

\* pKa de la fonction acide calculé à partir du site <https://chemicalize.com/calculation>

Deux acides aliphatiques (acides stéarique et palmitique) ont également été fragmentés en mode négatif. Pour ces deux composés, seule une perte d'eau en MS<sup>2</sup> a pu être identifiée.

**En résumé de l'étude sur composés modèles, il apparaît que la perte de CO<sub>2</sub> est typique des acides carboxyliques phénoliques. De plus, les pertes de •CH<sub>3</sub> indiquent la présence de groupements méthoxyles.**

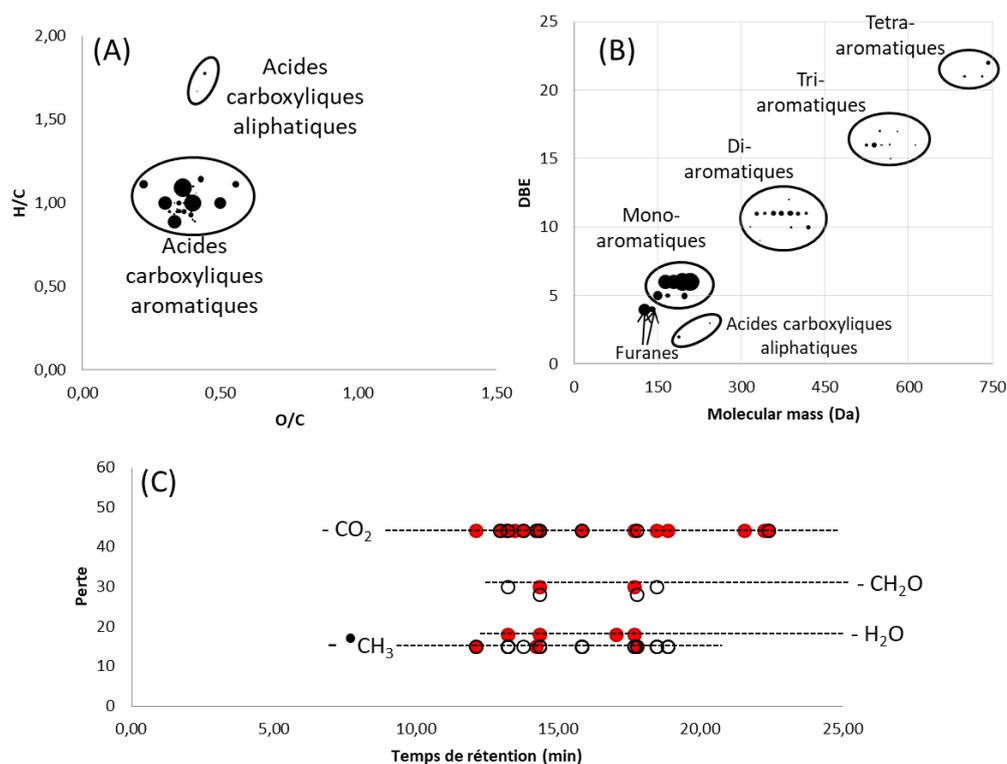
#### 4.1.2. Caractérisation de l'échantillon

La fraction AQ3 représente 3% de notre échantillon de biomasse initial. Malgré le faible pourcentage massique de cette fraction, il a été nécessaire de réaliser le protocole de fractionnement pour isoler les produits minoritaires et identifier les espèces qui n'ont pas été détectées en présence de la fraction majoritaire (AQ1) en raison d'effets de matrice. Sur le diagramme de van Krevelen, les composés détectés dans cette fraction sont principalement **centrés autour de H/C égal à 1,0 et O/C égal à 0,4 indiquant potentiellement la présence de cycles aromatiques** (Figure 61A). De plus, les composés présents dans AQ3 ont été retenus en RPLC (temps de rétention entre 10 et 20 min, ce qui est en accord avec l'hypothèse de la présence d'acides aromatiques). Ces acides carboxyliques

aromatiques peuvent être séparés entre **les composés mono, di, tri et tétra aromatiques en traçant la valeur du DBE en fonction de la masse moléculaire** (Figure 61B).

Par ailleurs, peu d'acides carboxyliques aliphatiques ont été détectés dans cette fraction. En effet, à l'opposé des acides aromatiques, les acides aliphatiques présentent un rapport H/C élevé et un DBE faible. Des furanes tels que le 5-HMF ont également été observés. De par leur faible log P, ces derniers ont été distribués dans plusieurs fractions LLE.

Lors de la fragmentation en ESI négatif, les principales pertes observées ont été le CO<sub>2</sub> provenant de la fragmentation de la fonction acide carboxylique et le radical <sup>•</sup>CH<sub>3</sub> provenant de la fragmentation du groupe méthoxyle attaché à un cycle aromatique (Figure 61C). Ces pertes sont en accord avec l'étude préliminaire réalisée sur des composés modèles. Parmi les 17 composés soumis à la fragmentation, 10 d'entre eux ont perdu la partie acide carboxylique comme fragment principal lors du premier événement CID. Lorsque des fonctions méthoxyles sont présentes sur un cycle aromatique, les pertes de radicaux <sup>•</sup>CH<sub>3</sub> sont en concurrence avec les pertes de CO<sub>2</sub>. Lorsque plusieurs groupements méthoxyles sont présents sur une molécule, plusieurs étapes de fragmentation sont nécessaires afin de tous les identifier.



**Figure 61 : (A) Diagramme de van Krevelen pour AQ3, (B) DBE en fonction de la masse moléculaire et (C) pertes observées en ESI négatif en MS<sup>2</sup> (points rouge) et de MS<sup>3</sup> à MS<sup>7</sup> (points avec un contour noir)**

Les données acquises nous ont permis d'identifier les acides coumarique, syringique et férulique comme des composés mono-aromatiques. Pour quelques composés di-aromatiques, l'eau a été la perte la plus abondante en MS<sup>2</sup> associée à une perte de CH<sub>2</sub>O (Tableau S1). Selon la littérature, l'association de ces deux pertes pourrait indiquer une liaison de type β-O-4 entre les deux cycles aromatiques [39]. Malgré l'intérêt que peuvent apporter les expériences de fragmentation, la fragmentation par CID a montré des limites quant à l'identification structurale des composés di, tri et tétra aromatiques. Une solution pour être capable de proposer une structure serait de cibler ces composés et construire l'arbre de fragmentation complet ou alors d'utiliser d'autres méthodes de

fragmentation impliquant des modes d'activations électroniques (EID *Electron Induced Dissociation*) ou encore des modes d'activations photoniques (IRMPD *Infrareded Multiphoton Dissociation*, UVPD *Ultraviolet Photodissociation*).

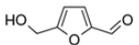
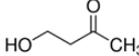
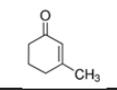
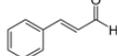
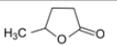
## 4.2. Fraction organique 2

Selon le protocole LLE, la fraction **ORG2 contient des molécules neutres à un pH > 12**. La fraction ORG2 représente une partie minoritaire (2%) de notre échantillon initial. La majorité des composés a été détectée avec des rapports  $m/z$  compris entre 90 et 600 en ESI positif, ce qui suggère la présence de groupes facilement protonables, comme des groupes carbonyles.

### 4.2.1. Fragmentation de molécules modèles représentatives

Sur la base des observations précédentes, six molécules représentatives de la fraction ORG2 de par leur caractère non ionisable à pH 12 (MM4), ont été fragmentées en ESI positif. Pour l'ensemble des composés, **une perte d'eau a été observée en MS<sup>2</sup>**. Une perte de CO supplémentaire a également été détectée pour le cinnamaldéhyde. Aucun ion en MS<sup>3</sup> n'a été mesuré. Le faible nombre de fragments peut s'expliquer par la faible taille des étalons étudiés ici.

Tableau 21 : Fragmentation de composés avec un pKa > 12 en ESI positif

Etalon (formule brute – pKa*)	Structure	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	$t_R$ (min)	Fragments en mode positif MS <sup>2</sup> [intensité relative]
5-hydroxyméthylfurfural (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> – 13,7)		127,0389	5,3	H <sub>2</sub> O [100%]
4-hydroxy-2-butanone (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> – 15,8)		89,0597	2,0	H <sub>2</sub> O [100%]
3-Méthyl-2-cyclohexen-1-one (C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O – /)		111,0804	11,9	H <sub>2</sub> O [100%]
Cinnamaldéhyde (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O – /)		133,0647	17,0	H <sub>2</sub> O [100%], CO [8%]
Valérolactone (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> – /)		101,0596	5,3	H <sub>2</sub> O [100%]

### 4.2.2. Caractérisation de l'échantillon

Sur le diagramme de van Krevelen, **les composés détectés dans ORG2 sont répartis entre 0,5 et 2,0 pour H/C et entre 0,1 et 0,5 pour O/C mais une partie importante est centrée autour de H/C égal à 1,5 et O/C égal à 0,2** (Figure 62A). Les deux pics les plus intenses observés sur le chromatogramme UV (Figure 58) ont été identifiés comme étant le 5-HMF ( $t_R = 5,2$  min) et le furfural ( $t_R = 5,5$  min). Contrairement à AQ3, les valeurs de DBE sont comprises entre 2 et 8 pour 95% des composés (Figure 62B). Un faible DBE associé à un rapport H/C relativement élevé est un premier indice pour attester de la présence de chaînes aliphatiques. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de fragmentation et la détection de pertes de C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> qui peuvent provenir de la fragmentation de chaînes aliphatiques (Figure 62C). De la même façon que sur les molécules modèles représentatives de cette fraction, de nombreuses pertes d'eau ont été observées. Ces pertes de H<sub>2</sub>O pourraient provenir de groupements carbonyles comme lors de la fragmentation du 3-méthyl-2-cyclohexen-1-one, ou alors de groupements hydroxyles. De plus, les pertes de CO survenant au cours de la première étape de fragmentation (MS<sup>2</sup>) peuvent également indiquer la présence de fonctions carbonyle telles que les groupes cétone et/ou aldéhyde [200]. Une autre perte abondante était celle de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (cétène), dont on sait qu'elle est caractéristique des groupements acétyles.

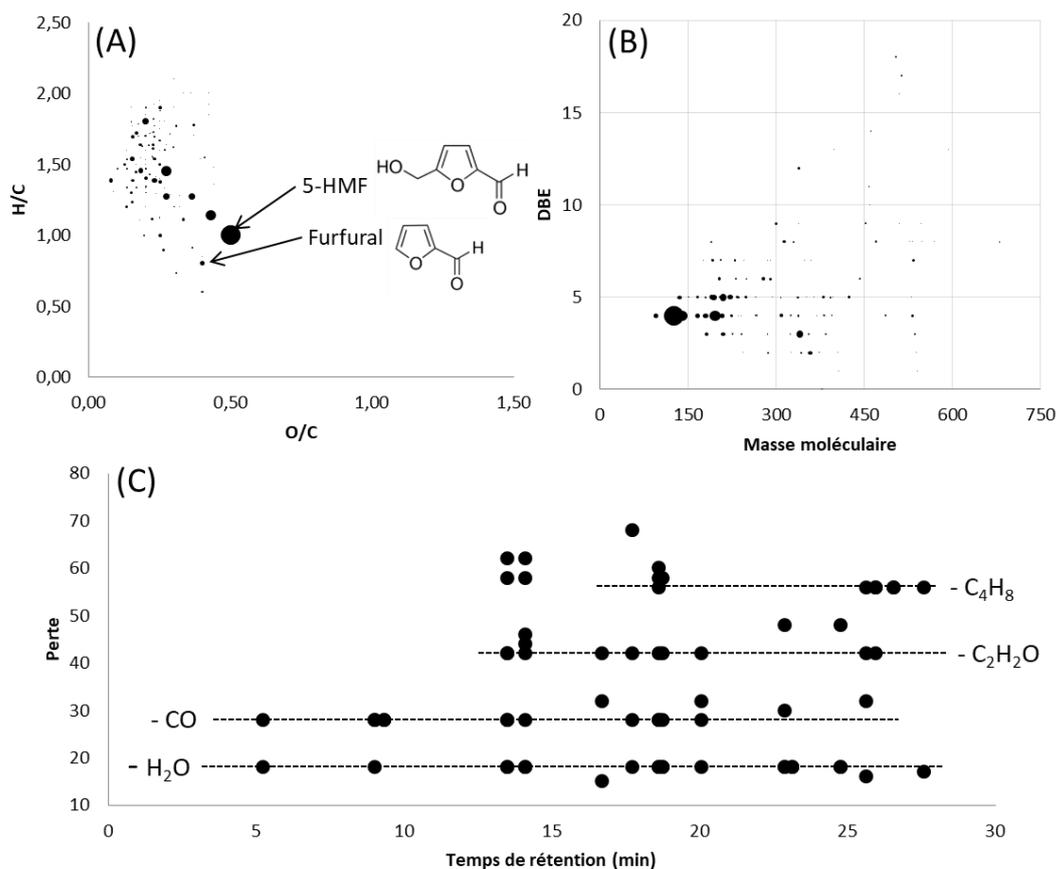


Figure 62 : (A) Diagramme de van Krevelen pour ORG2, (B) DBE en fonction de la masse moléculaire et (C) pertes en MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> observées en ESI positif.

### 4.3. Fraction organique 3

La fraction ORG3 représente 4% de l'échantillon initial et devrait être constituée de **composés phénoliques avec un pKa compris entre 7 et 12**. Comme pour AQ3, le diagramme de van Krevelen de ORG3 est **centré sur un ratio H/C de 1 et un ratio O/C de 0,4**, correspondant à la zone des composés aromatiques (Figure 63A)

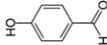
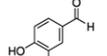
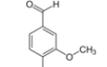
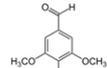
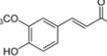
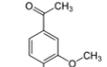
#### 4.3.1. Fragmentation de molécules modèles représentatives

Le choix de molécules représentatives de cette fraction s'est porté sur cinq aldéhydes et une cétone appartenant à la famille des composés phénoliques avec un pKa compris entre 7 et 10 (MM5). Ces derniers ont été fragmentés à la fois en mode positif et en mode négatif.

Similairement aux acides carboxyliques, la fragmentation de l'ion  $[M-H]^-$  conduit à **une perte de  $\bullet CH_3$  lorsque la molécule est fonctionnalisée avec un ou plusieurs groupements méthoxyles adjacents à un groupement phénolique**, autrement aucun fragment n'est détecté. Une fois l'ensemble des groupes méthoxyles fragmentés, une perte de CO a été identifiée pour le syringaldéhyde et le coniféraldéhyde. De la même manière que lors de la fragmentation des acides syringique et sinapique, Marcum *et al.* ont suggéré que la perte de CO provienne du groupe méthoxyle fragmenté et non de l'aldéhyde [41].

En mode positif, la perte de CO est retrouvée pour la plupart des étalons. Toutefois, il est difficile de conclure et d'extraire des processus typiques de la fragmentation des ions  $[M+H]^+$ .

Tableau 22 : Fragmentation de composés phénoliques dans les modes positif et négatif

Etalon (formule brute – pKa*)	Structure	m/z [M-H] <sup>-</sup> [M+H] <sup>+</sup>	t <sub>R</sub> (min)	Fragments en mode négatif MS <sup>2</sup> → MS <sup>3</sup> → MS <sup>4</sup> [intensité relative]	Fragments en mode positif MS <sup>2</sup> → MS <sup>3</sup> → MS <sup>4</sup> [intensité relative]
4-hydroxybenzaldéhyde (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> – 7,3)		121,0294 123,0440	10,2	Aucun fragment	CO [100%]
3,4-dihydroxybenzaldéhyde (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> – 7,5)		137,0243 139,0389	8,5	Aucun fragment	CO [100%] → H <sub>2</sub> O [100%]
Vanilline (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> – 7,8)		151,0400 153,0545	12,0	•CH <sub>3</sub> [100%]	CO [100%] → CO [100%]
Syringaldéhyde (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> – 7,2)		181,0505 183,0650	12,9	•CH <sub>3</sub> [100%] → •CH <sub>3</sub> [100%] → CO [100%]	CO [100%], C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> [5%] → (•CH <sub>3</sub> + CO) [100%], •CH <sub>3</sub> [40%] → CO [100%]
Coniféraldéhyde (C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> – 9,5)		177,0556 179,0701	14,7	•CH <sub>3</sub> [100%] → CO [100%]	H <sub>2</sub> O [100%], CH <sub>4</sub> O [70%], CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [4%] → CO [100%], •CH <sub>3</sub> [40%], H <sub>2</sub> O [4%]
Acétovanillone (C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> – 8,3)		165,0556 167,0701	13,4	•CH <sub>3</sub> [100%]	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100%] → CH <sub>4</sub> O [100%]

\* pKa de la fonction acide calculé à partir du site <https://chemicalize.com/calculation>

#### 4.3.2. Caractérisation de l'échantillon

Le graphique représentant le DBE en fonction de la masse moléculaire prouve également la nature phénolique des analytes de cette fraction (Figure 63B). Les fragmentations des composés mono-aromatiques ont permis une identification structurale avec une première perte de radicaux •CH<sub>3</sub> à partir du groupe méthoxyle, puis une combinaison de pertes de CO et de CO<sub>2</sub>. Comme observé lors de la fragmentation de molécules modèles, la perte de radicaux •CH<sub>3</sub> suivie de la perte de CO provient des groupements méthoxyles. En revanche, la perte de •CH<sub>3</sub> suivie de la perte de CO<sub>2</sub> pourrait indiquer la présence d'esters [41].

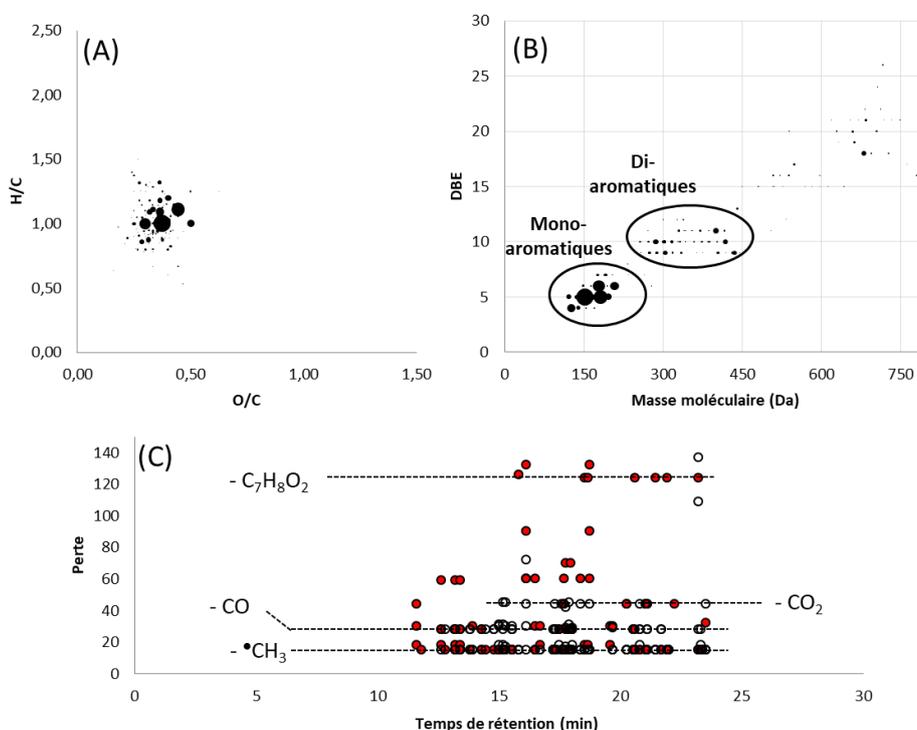


Figure 63 : (A) Diagramme de van Krevelen pour ORG3, (B) DBE en fonction de la masse moléculaire et (C) pertes en MS<sup>2</sup> (points rouges) et de MS<sup>3</sup> à MS<sup>6</sup> (points avec un contour noir) observées en ESI négatif.

L'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, le syringaldéhyde, l'acétosyringone et le coniféraldéhyde ont été identifiés comme des composés monomériques dans ORG3 (Tableau S2). Pour les composés di, tri et tétra-aromatiques, les schémas de fragmentation dépendent du type de liaison entre les unités. Par exemple, l'ion  $m/z$  273,0765 ( $C_{15}H_{14}O_5$ ) a été détecté à deux temps de rétention (12,6 et 17,3 min) et présente deux schémas de fragmentation différents. La perte principale du premier en  $MS^2$  est le fragment ( $CO + H_2O$ ), tandis que pour le second,  $\bullet CH_3$  est la perte majoritaire. Dans les deux cas, ces composés di-aromatiques ne se sont pas fragmentés en deux unités mono-aromatiques indiquant probablement une liaison carbone-carbone entre les unités de lignine (de type 5-5,  $\beta$ - $\beta$  ou  $\beta$ -5). À l'opposé, l'ion tétra-aromatique à  $m/z$  683,2144 ( $C_{38}H_{36}O_{12}$ ) a été fragmenté en deux fragments di-aromatiques :  $C_{18}H_{17}O_6$  et  $C_{20}H_{19}O_6$ . Ensuite, le fragment  $C_{18}H_{17}O_6$  perd trois  $\bullet CH_3$  au cours des étapes  $MS^3$ ,  $MS^4$  et  $MS^5$ ; ce qui peut correspondre à la fragmentation de trois groupes méthoxyles, mais suppose également une liaison carbone-carbone dans le fragment di-aromatique.

Dans de nombreux cas, le fragment correspondant au gaïacol ( $C_7H_8O_2$ ) a été mesuré pendant la fragmentation des composés tri et tétra-aromatiques (Tableau S2).

#### 4.4. Fraction aqueuse 1

**La dernière fraction AQ1 semble la plus riche et la plus complexe.** En effet, selon le protocole LLE, **une grande partie (89%) de l'échantillon initial est concentrée dans AQ1.** Les composés présents dans cette fraction sont très hydrophiles et pourraient correspondre à des molécules de type sucre. Selon le chromatogramme UV de la Figure 58, on peut distinguer deux groupes de pics : un premier qui correspond aux composés les moins retenus sur la colonne chromatographique apolaire, ayant des temps de rétention inférieurs à 10 min (éluant avec moins de 12% de méthanol dans la phase mobile), tandis qu'un second est constitué de composés fortement retenus, éluant après 10 min. Il a donc été supposé **que AQ1 contient des sucres fonctionnalisés avec des fonctions chimiques insaturées, ce qui expliquerait leur comportement en RPLC et leur détection en UV.** Au vu de ces premières observations et de la connaissance très limitée que l'on a sur ce type de molécules, il est **difficile de sélectionner des molécules représentatives de cette fraction.** Ainsi, nous avons fait le choix de directement analyser la fraction AQ1.

L'analyse RPLC/HRMS de AQ1 avec les différents modes d'ionisation a permis de calculer un nombre important de formules brutes qui ont été représentées sur le diagramme de van Krevelen en Figure 64. La taille des points représente l'intensité des ions. Toutefois, les résultats présentés sont simplement qualitatifs.

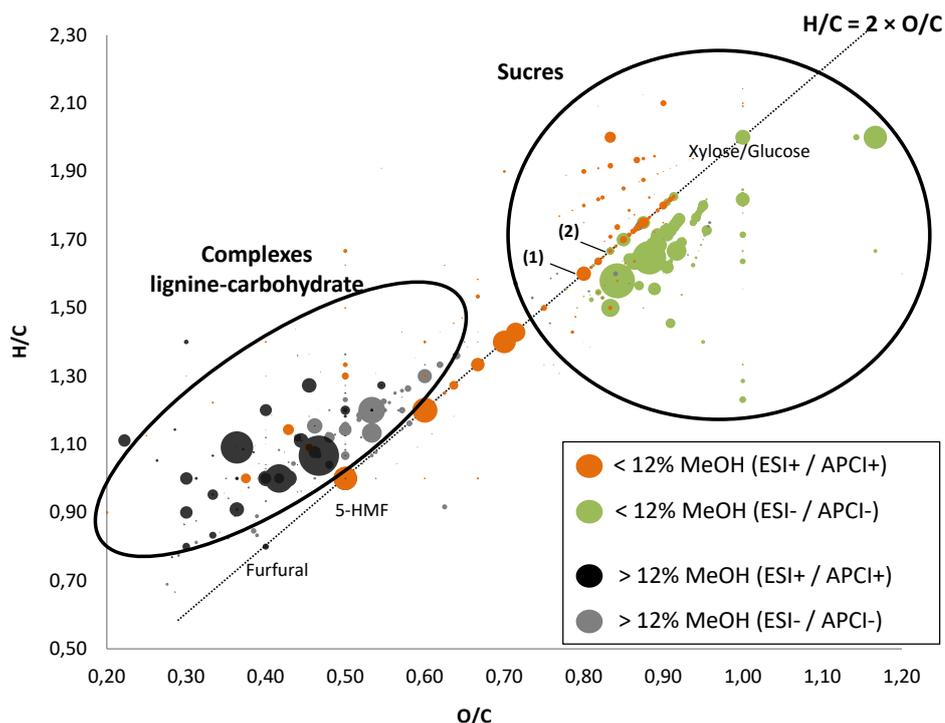


Figure 64 : Diagramme de van Krevelen pour AQ1. Des couleurs ont été utilisées pour différencier les composés peu retenus en RPLC (avec moins de 12% de MeOH en phase mobile en orange et vert) de ceux élués plus tard (noir et gris). Les détections en modes positif et négatif ont également été différenciées.

L'utilisation de différentes couleurs pour représenter les composés retenus (points noirs et gris) et non retenus (points verts et orange) en RPLC met en évidence une nouvelle famille chimique de composés qui pourrait correspondre aux **complexes lignine-carbohydrate (LCC)**. Cette classe de molécules, qui combine des dérivés de la lignine et des unités glucidiques, a déjà été signalée dans la littérature [28,201]. En raison de la partie phénolique, les LCC ont des rapports H/C et O/C plus faibles que les sucres "classiques" comme le glucose ou le xylose. Cette distinction peut également être mise en évidence lorsque l'on prend en compte le nombre d'insaturations (DBE) des composés en fonction de leur masse moléculaire (Figure 65). Pour une même masse moléculaire, un composé retenu en RPLC présente un DBE plus élevé qu'un composé non retenu en raison de son ou ses cycle(s) aromatique(s) fixé(s) à la partie glucidique.

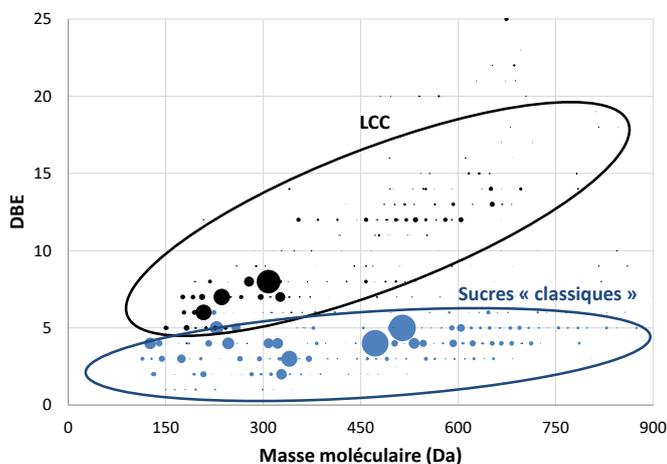


Figure 65 : DBE des composés identifiés dans AQ1 en fonction de leur masse moléculaire (en bleu : les composés élués avec moins de 12% de MeOH en RPLC ; en noir ceux élués avec plus de 12%)

Si l'on considère les sucres « classiques » dont les temps de rétention sont inférieurs à 10 min, on peut distinguer **plusieurs groupes à partir de la Figure 64** :

- certains composés détectés en modes négatif et positif sont situés sur une ligne où les rapports H/C sont deux fois plus élevés que les rapports O/C ( $H/C = 2 \times O/C$ ).
- sous cette ligne  $H/C = 2 \times O/C$ , les composés ont été ionisés uniquement en mode négatif (points verts), ce qui pourrait indiquer la présence d'une fonction acide carboxylique, facilement déprotonable. Il pourrait s'agir d'acides uroniques connus pour entrer dans la composition des hémicelluloses.
- au-dessus de la ligne  $H/C = 2 \times O/C$ , des composés azotés ont été principalement détectés dans le mode positif (points orange).

La ligne  $H/C = 2 \times O/C$  correspond aux **réactions de déshydratation** avec perte d'une molécule de  $H_2O$ . Les composés situés sur cette ligne peuvent être des intermédiaires de réaction, tels que ceux provenant de la dégradation du xylose pour produire du furfural ou du glucose pour produire du 5-hydrométhylfurfural (5-HMF). Par ailleurs, les oligomères constitués de plusieurs unités glucidiques de type  $C_xH_{2x}O_x$  (xylose, glucose, mannose, etc.) sont également situés sur cette ligne de déshydratation en raison de la perte d'eau pour condenser deux unités de sucre. D'un point de vue mathématique, un polymère comportant une infinité d'unités de xylose (ou de glucose) présente des rapports H/C et O/C qui tendent vers 1,60 et 0,80 respectivement (1,67 et 0,83 pour la série du glucose). Ces deux points sont dénommés (1) et (2) sur la Figure 64. De plus, ces deux points spécifiques correspondent également à la première déshydratation du xylose (ou du glucose), ce qui signifie que les composés situés en dessous de (1) et (2) sur la ligne de déshydratation sont des produits de dégradation des sucres.

Des expériences de fragmentation allant de  $MS^2$  à  $MS^7$  en ESI positif et négatif ont été réalisées. Les pertes de neutres habituelles pour les sucres telles que  $H_2O$  (18 Da),  $C_2H_4O_2$  (60 Da),  $C_5H_8O_4$  (132 Da),  $C_5H_{10}O_5$  (150 Da) ou  $C_6H_{10}O_5$  (162 Da) sont indiquées sur la Figure 66. Ces fragments confirment la présence de carbohydrates dans AQ1, sélectivement extraits par le protocole LLE. La perte de xylose peut donner des fragments  $C_5H_8O_4$  ou  $C_5H_{10}O_5$  en ESI négatif selon la façon dont le xylose est lié au reste de la molécule. Le fragment  $C_5H_{10}O_5$  peut également provenir d'une fragmentation spécifique d'un hexose ( $^{0,1}X^-$  selon la nomenclature de Domon et Costello [73]). Les pertes de xylose sont plus abondantes que celles de glucose ( $C_6H_{10}O_5$ ), ce qui est cohérent avec la concentration plus élevée de xylose (80,4 g/L) que de glucose (8,5 g/L) dans l'échantillon initial. La perte de  $C_3H_4O_2$  (72 Da) correspond à la partie restante du xylose après une perte de  $C_2H_4O_2$ . De plus, pour les composés retenus (temps de rétention entre 10 et 20 min), de nombreuses pertes de  $CO_2$  et de  $\bullet CH_3$  se sont produites principalement après l'étape de fragmentation  $MS^3$ . La perte de  $CO_2$  est une fragmentation typique des acides carboxyliques tandis que le radical  $\bullet CH_3$  révèle la présence de groupes méthoxyles sur un cycle aromatique. Ces observations concordent avec l'hypothèse de la présence de complexes lignine-carbohydate.

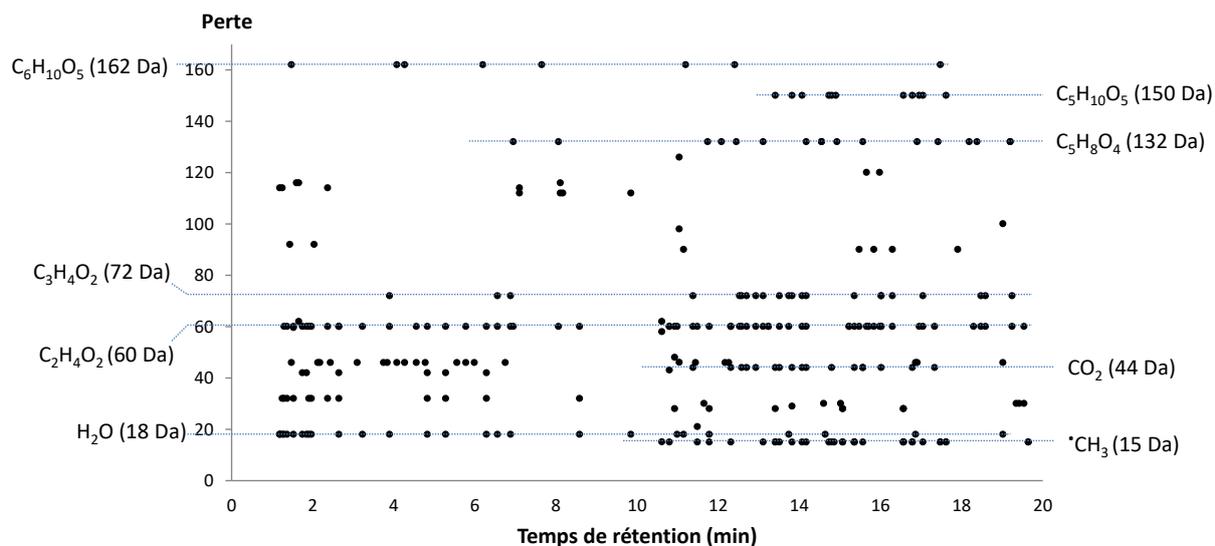


Figure 66 : Pertes observées suite à la fragmentation CID ( $MS^2$  à  $MS^7$ ) en ESI négatif de AQ1

Afin d'illustrer le processus de fragmentation avec quelques exemples de structures proposées, les fragmentations des pics les plus intenses sur le BPC sont détaillées dans la suite. Des pics ayant des temps de rétention différents ont été sélectionnés et localisés sur le diagramme de van Krevelen dédié à AQ1 (Figure 67). La nomenclature de Domon et Costello a été utilisée pour identifier les fragments.

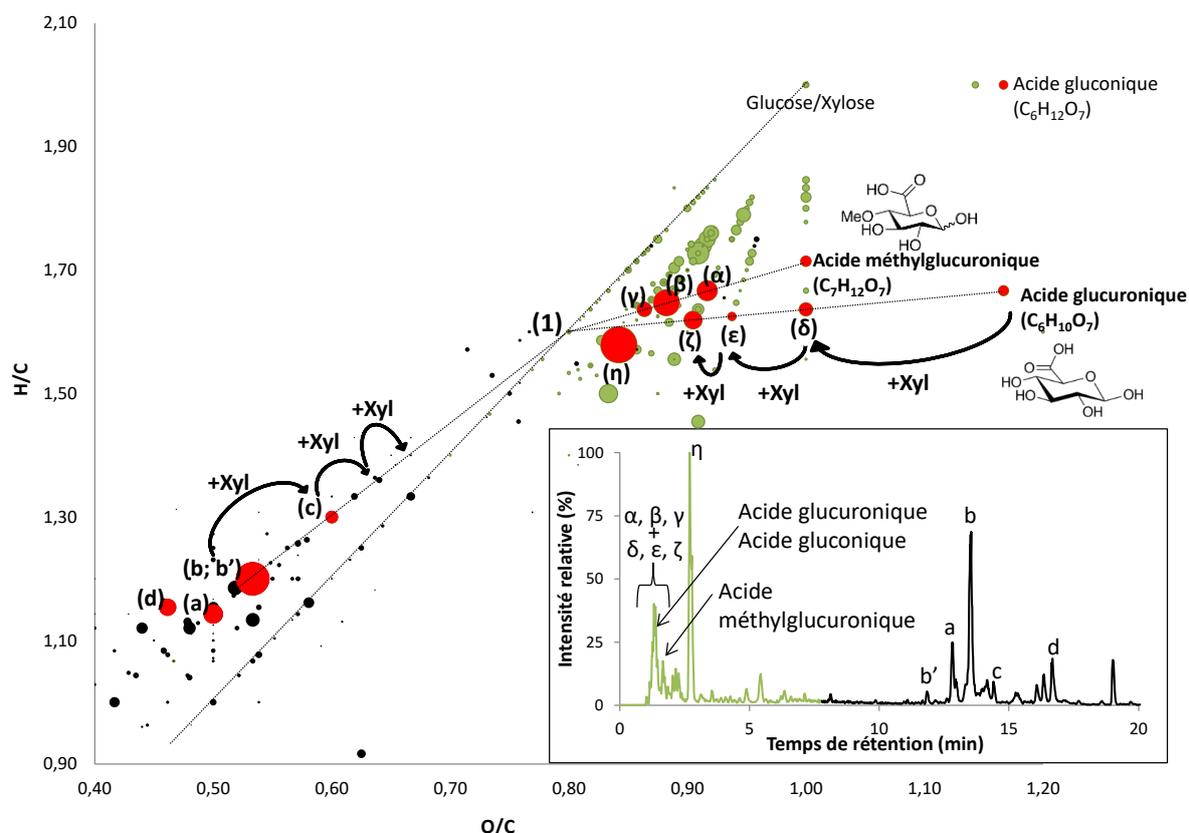
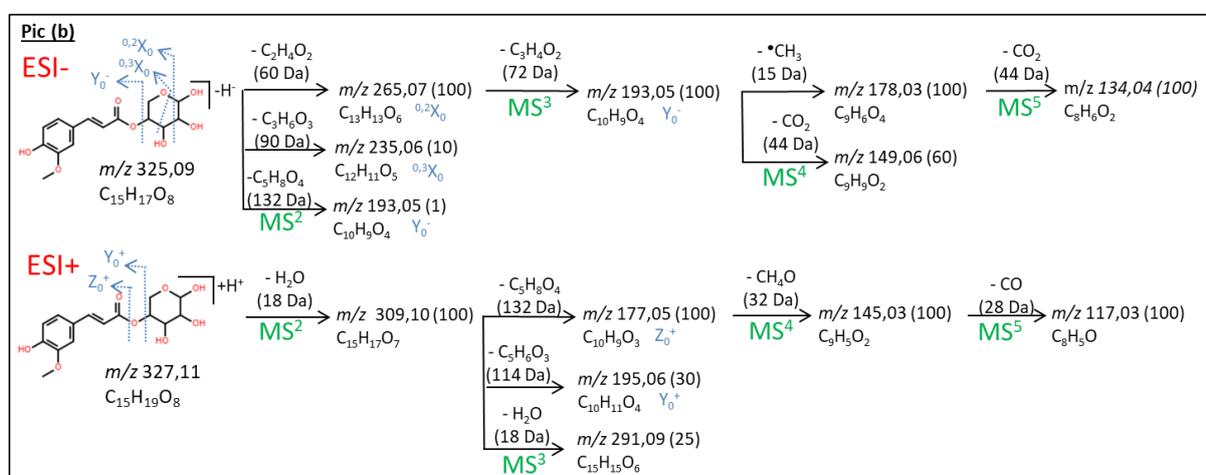


Figure 67 : BPC obtenu en ESI négatif pour AQ1 et diagramme de van Krevelen associé avec en rouge les pics annotés sur le BPC

Pour les composés les plus retenus, le pic le plus intense sur le BPC en ESI négatif (Figure 67) correspondant au pic annoté b à 13,5 min, a été identifié comme étant un acide férulique lié à un pentose (Figure 68). En ESI négatif, les fragmentations MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup> ont consisté en la perte de la partie xylose, conduisant au fragment Y<sub>0</sub><sup>-</sup>, puis les fragmentations de la partie lignine ont commencé avec les pertes de •CH<sub>3</sub> et CO<sub>2</sub>. L'analyse en ESI positif a fourni des informations complémentaires avec un processus de fragmentation différent : le fragment Z<sub>0</sub><sup>+</sup> a été formé, puis la fragmentation du groupe méthoxyle a consisté en une perte de CH<sub>4</sub>O au lieu de la perte du radical •CH<sub>3</sub> en ESI négatif. La dernière étape de fragmentation a été consacrée à une perte de CO. De plus, le spectre UV du composé b est le même que celui de l'acide férulique, ce qui renforce l'hypothèse de son identification. Le composé b' a la même formule brute et le même spectre UV que le composé b, mais sa fragmentation est différente. Cet isomère pourrait correspondre à un acide férulique lié à une unité xylose sur une position différente (par exemple sur le groupe hydroxyle de l'acide férulique au lieu du groupe acide carboxylique).



**Figure 68 : Fragmentation CID du composé b en ESI négatif et positif.**  
L'intensité relative de chaque fragment est indiquée entre parenthèses.

D'autres fragmentations ont confirmé la présence de LCC au sein des composés retenus. Les fragmentations des pics a et c ont permis d'identifier respectivement un acide coumarique lié à un pentose et un acide férulique lié à deux pentoses (Figure 69). La perte de la partie glucidique intervient en premier et ensuite la fragmentation de la partie phénolique se produit. Les positions de la liaison glycosidique et de la liaison reliant la partie phénolique à la partie glucidique n'ont pas pu être déterminées avec précision. Cependant, en considérant tous les fragments, le groupe phénolique pourrait être lié au xylose en position 4 pour les composés a, b et c. Pour le composé c, trois positions de la liaison glycosidique entre les deux unités de monomère de sucre sont possibles : 1-4, 1-3 et 1-2 (Figure S3). Pour certains composés et en particulier pour les molécules dont la fraction phénolique est chimiquement complexe (c'est-à-dire polyaromatique), aucune structure détaillée n'a pu être proposée. En ce qui concerne le pic d, la partie glucidique semble correspondre à un hexose tandis que la partie phénolique a la formule brute C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>7</sub>. Les fragmentations MS<sup>3</sup> à MS<sup>7</sup> ont donné des informations précieuses sur la partie phénolique telles que les pertes de •CH<sub>3</sub>, qui peuvent indiquer des groupes méthoxyles sur un cycle aromatique. De plus, la partie phénolique a un DBE de 11 pour seulement 20 atomes de carbone, ce qui devrait indiquer deux cycles aromatiques.

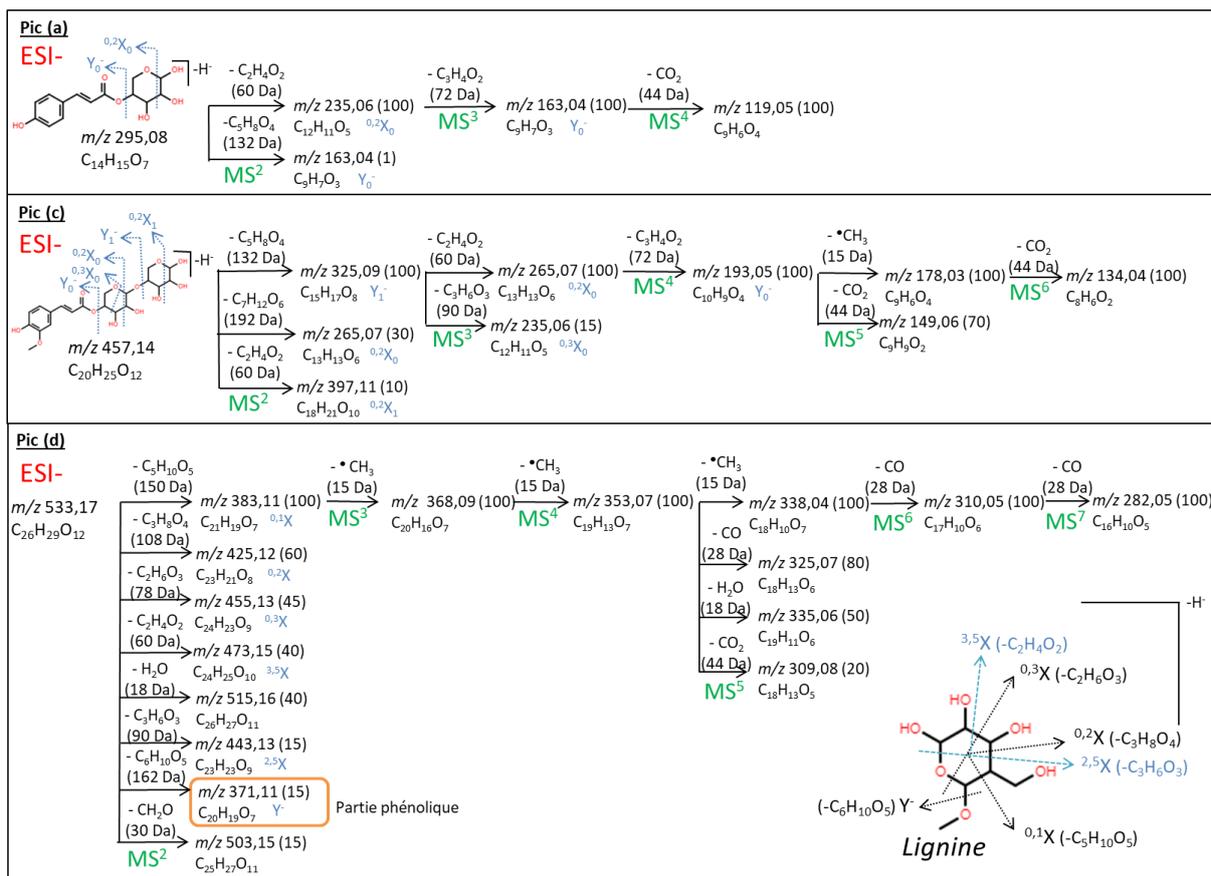


Figure 69 : Fragmentation CID des composés a, c et d en ESI négatif.  
L'intensité relative de chaque fragment est indiquée entre parenthèses.

Enfin, les composés de type LLC ont des points communs avec les composés détectés dans AQ3. En effet, lors de la fragmentation des LCC, les formules moléculaires de la partie phénolique exempte de la partie glucidique ont pu être identifiées et il s'avère que ces formules ont également été mesurées dans AQ3 dans de nombreux cas. Par exemple, pour le pic d, la partie phénolique était  $C_{20}H_{20}O_7$  (Figure 69) ; cette formule brute a également été mesurée en  $MS^1$  dans AQ3. De plus, le spectre UV du pic d est également similaire au pic correspondant à  $C_{20}H_{20}O_7$  dans AQ3. Cette observation suggère que les LCC sont principalement composés d'acides phénoliques associés à des sucres. Ainsi, comme les sucres n'absorbent pas en UV, la comparaison des spectres UV des LCC dans AQ1 et des acides phénoliques dans AQ3 pourrait être utilisée comme complément d'information lors de l'identification.

En ce qui concerne la première partie du chromatogramme (entre 0 et 5 min), de nombreux composés présentent des fragments similaires. En effet, beaucoup d'entre eux sont constitués d'un sucre avec une fonction acide carboxylique (comme l'acide méthylglucuronique ou l'acide glucuronique) fixé à une, deux ou trois unité(s) pentose et/ou hexose. Les spectres  $MS^2$  des pics  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont représentés sur la Figure 70. Les positions des groupements n'ont pas été prises en compte ici. L'identification de la partie acide méthylglucuronique est basée sur la détection d'un fragment à  $m/z$  207,0510 qui lors de sa fragmentation, perd  $CH_4O$  correspondant à un groupe méthoxyle. Les pics  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$  ont été identifiés comme étant de l'acide glucuronique avec respectivement une, deux et trois unités pentose.

Le pic le plus intense sur le BPC en ESI négatif, annoté  $\eta$  ( $m/z$  513,1469 /  $C_{19}H_{29}O_{16}$ ) présente des fragmentations similaires à celles du pic  $\beta$  mais il est un peu plus retenu en RPLC. Il pourrait avoir une structure similaire avec un groupe acétyle supplémentaire ( $COCH_3$ ) lié à un pentose.

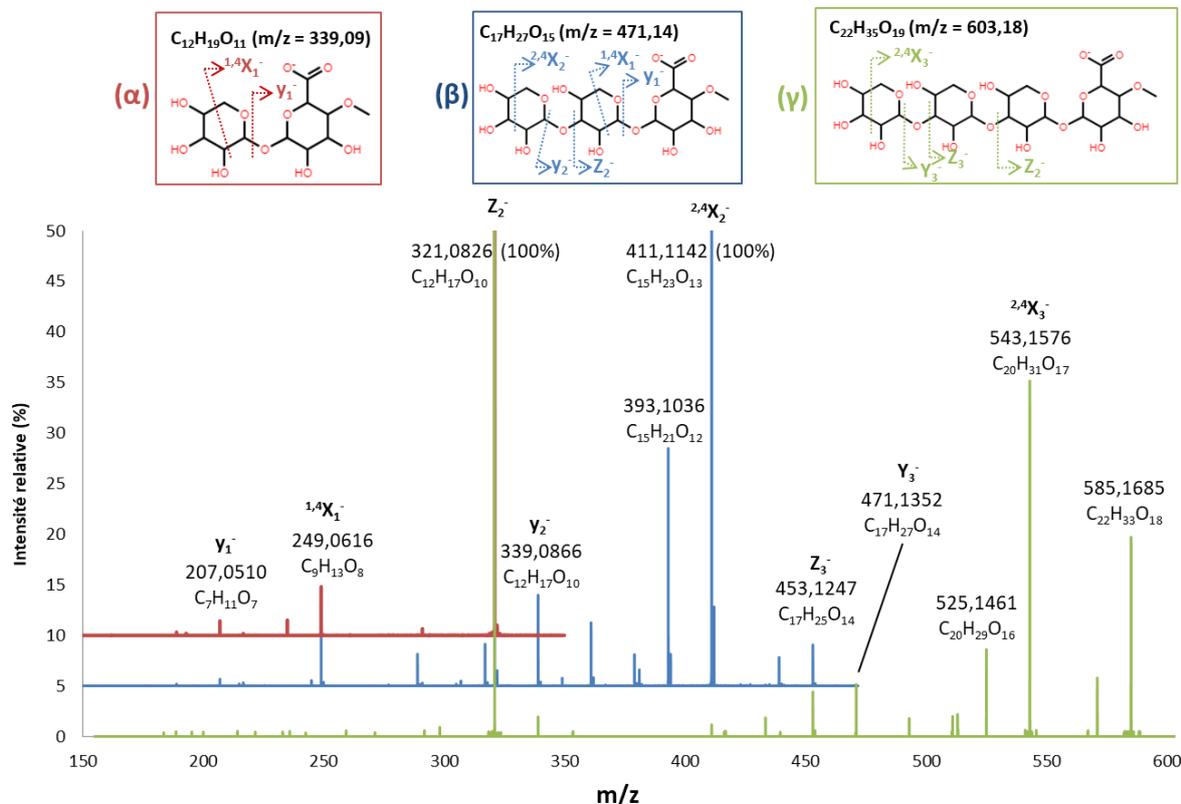


Figure 70 : Spectres de fragmentation MS<sup>2</sup> des composés  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$

Plus globalement, de nombreux oligomères de sucre combinant des acides uroniques et des unités pentose et/ou hexose sont présents dans la fraction AQ1. Le diagramme de van Krevelen présenté Figure 67 permet de situer une série de composés ayant la même structure de base (un acide uronique par exemple) à laquelle s'ajoutent X unités de pentose ou d'hexose. En effet, les composés d'une même série sont localisés sur une même ligne du digramme de van Krevelen, et ces lignes convergent vers le point (1) quand le nombre de pentoses augmente. Grâce à cette structuration, le diagramme pourrait être un outil aidant à l'identification des structures de molécules inconnues. Par exemple, l'acide férulique lié à un et deux pentoses (pics b et c respectivement) sont reliés par une droite qui passe également par le point (1). De même, cette droite traverse les points correspondant aux molécules  $C_{25}H_{34}O_{16}$  ( $H/C = 1,36$  ;  $O/C = 0,34$ ) et  $C_{30}H_{42}O_{20}$  ( $H/C = 1,40$  ;  $O/C = 0,66$ ). On peut donc faire l'hypothèse que ces composés correspondent à l'acide férulique lié à trois et quatre pentoses.

Il faut noter que pour cette fraction particulièrement complexe, malgré l'utilisation d'une séparation chromatographique en amont de la HRMS, **un certain nombre de composés sont co-élus en RPLC, en particulier dans la première partie du chromatogramme où les composés très polaires éluent.** Ces co-élutions peuvent entraîner un effet de matrice et une suppression d'ionisation. Ainsi, certains composés pourraient ne pas être détectés. Une méthode de séparation chromatographique bidimensionnelle dédiée a été optimisée pour cette classe de molécules et sera présentée dans le Chapitre 5.

## 5. Intérêt et fiabilité des bases de données

Dans ce chapitre, les spectres de fragmentation ont été traités manuellement afin de proposer des structures développées. Cependant, le grand nombre de composés détectés et fragmentés ne permet pas un traitement manuel de l'ensemble des spectres de fragmentation. Afin d'automatiser ce travail d'interprétation, plusieurs stratégies consistant à comparer les spectres expérimentaux avec un tiers ont vu le jour. Ces dernières peuvent être divisées en deux catégories (Figure 71) :

**(1) comparaison des spectres expérimentaux avec des bases de données spectrales** (NIST, MassBank, METLIN, etc.)

**(2) comparaison via des approches prédictives qui consistent à simuler des spectres de fragmentation** (spectres *in silico*).

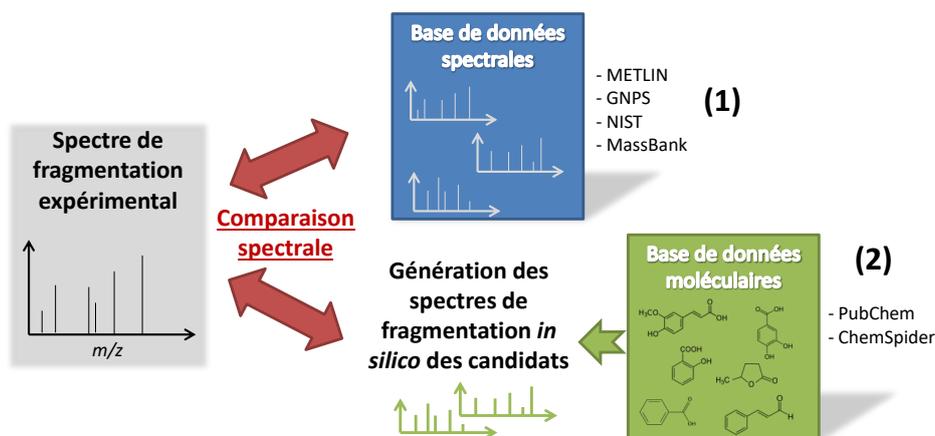


Figure 71 : Stratégies pour l'exploitation automatisée de spectres de fragmentation

La première approche consistant à comparer le spectre expérimental à des spectres de référence provenant de bases de données spectrales est considérée comme la plus fiable [202,203]. Cependant, les bibliothèques spectrales sont largement incomplètes [204]. De plus, les spectres contenus dans ces bases ont été acquis sur un instrument avec des conditions analytiques fixées. Or, un spectre de fragmentation est dépendant de ces conditions, ce qui peut engendrer des différences entre le spectre expérimental et un spectre issu d'une base de données, bien que ces derniers correspondent à la même molécule.

Pour pallier ces limitations, une seconde approche a été mise en place. Elle consiste à remplacer les bases de données spectrales par des bases de données moléculaires beaucoup plus fournies et exhaustives (PubChem, Chemspider) [205]. À titre d'exemple, PubChem recense plus de 100 millions de composés et Chemspider plus de 80 millions, tandis que le NIST 2020 comprend des spectres de fragmentation pour seulement 31 000 molécules. À partir du rapport  $m/z$  de l'ion précurseur et de l'erreur en masse ou alors directement à partir de la formule brute de l'ion parent, les bases de données moléculaires sont interrogées et un certain nombre de candidats sont proposés pour la formule brute sélectionnée. Des spectres de fragmentations *in silico* sont ensuite générés pour les candidats extraits des bases et comparés au spectre de fragmentation expérimental. Il existe plusieurs modes de génération de fragments *in silico* qui diffèrent selon le logiciel employé. Quatre approches principales pour l'exploitation de données MS/MS ont été distinguées par Hufsky *et al.* [206,207]:

(1) la prédiction du spectre à partir de règles de fragmentation (*i.e.* MAGMa),

(2) la fragmentation combinatoire qui vise à expliquer les fragments observés via des modèles physiques en considérant par exemple les énergies de dissociation des liaisons (*i.e.* MetFrag),

(3) la prédiction du spectre à l'aide d'un modèle statistique, préalablement appris sur des données d'apprentissage, qui estime la probabilité d'un événement de fragmentation (*i.e.* CFM-ID),

(4) la prédiction d'empreintes moléculaires (présence ou non de cycles aromatiques, de groupements hydroxyles, etc.), via un modèle préalablement appris, afin de décrire le spectre expérimental, suivi de leur comparaison aux structures moléculaires présentes dans les bases de données (*i.e.* CSI-FingerID).

Chacune des quatre approches possède ses propres avantages et inconvénients. Le CASMI (*Critical Assessment of Small Molecules Identification*) qui est un concours d'identification de spectres inconnus de molécules recensées dans les bases de données (composés « inconnus, connus »), est un bon indicateur de l'efficacité des différentes approches et des logiciels disponibles [208]. Globalement, les algorithmes *in silico* doivent être améliorés. En effet, à partir des spectres fournis au cours des challenges CASMI 2016, il a été démontré que l'utilisation d'outils d'identification purement *in silico* permettait d'identifier correctement seulement entre 17 et 25% des composés [209]. Tandis que l'utilisation simultanée de plusieurs approches *in silico* ainsi que des bases de données spectrales permettait d'identifier jusqu'à 93% des composés.

Afin d'estimer l'intérêt ainsi que le degré de fiabilité de ces approches pour l'identification des composés présents dans nos échantillons, les fragments MS<sup>2</sup> de quelques molécules modèles et analytes de l'échantillon précédemment étudiés ont été importés sur deux plateformes : MetFrag beta et CFM-ID 3.0. Ces deux logiciels permettent de combiner l'approche *in silico* et la comparaison avec des spectres expérimentaux issus de bases de données. Leur fonctionnement est décrit ci-dessous.

## 5.1. Présentation des plateformes

### 5.1.1. MetFrag

Afin de procéder à l'identification structurale via MetFrag, la première étape est d'indiquer la formule brute du composé. Dans le cas où cette dernière n'aurait pas été calculée, il est possible d'indiquer le rapport  $m/z$  associé à une tolérance en masse ainsi qu'au mode d'ionisation. Ensuite, il faut sélectionner une base de données à interroger. Seule une base à la fois peut être sélectionnée sur cette plateforme. Il est en revanche possible de télécharger sa propre base de données. Nous avons fait le choix de sélectionner PubChem qui est l'une des bases de données les plus exhaustives. Un certain nombre de candidats possibles pour la formule brute indiquée sont alors extraits. Par exemple, en indiquant la formule brute de l'acide vanillique (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>), 777 candidats ont été trouvés à partir de la base de données PubChem.

La seconde étape consiste à indiquer le rapport  $m/z$  de nos fragments avec leurs intensités respectives obtenues expérimentalement en MS<sup>2</sup> ainsi qu'une tolérance, ici de 2 ppm. MetFrag est un logiciel utilisant la fragmentation combinatoire afin d'expliquer les fragments observés sur un spectre de fragmentation expérimental. La base de ce type d'approche est de générer tous les fragments possibles d'un candidat en cassant toutes les liaisons. Cependant, ce processus peut être lent. Afin d'accélérer le temps de calcul et de limiter le nombre de fragments improbables, MetFrag

prend en compte les énergies de dissociation des liaisons. À partir de ces dernières, les fragments vont pouvoir obtenir un score. Ainsi, plus l'énergie de dissociation d'une liaison est faible et plus le fragment obtenu aura un score élevé. À **partir des scores obtenus pour chaque fragment d'un candidat, ce dernier obtient un score global normalisé compris entre 0 et 1 provenant uniquement de l'approche *in silico* (Score 1).**

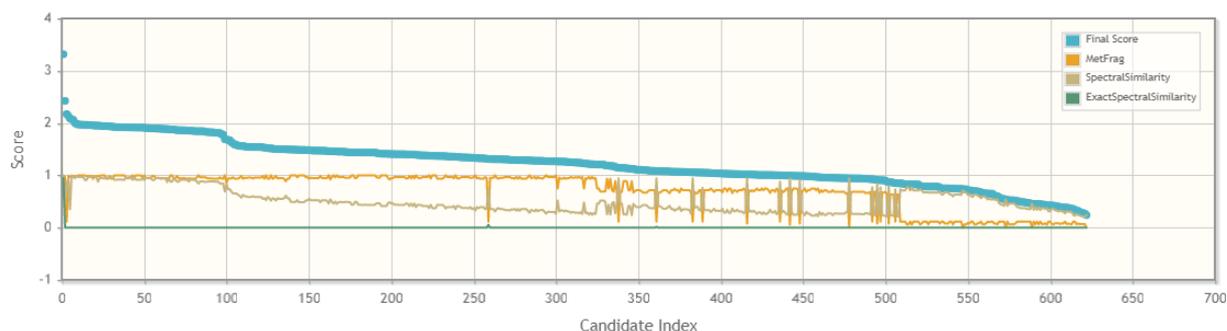
En complément de la fragmentation *in silico*, MetFrag permet également de comparer le spectre expérimental à la base de données spectrales MoNa (*MassBank of North America*). **Deux scores peuvent être obtenus ici : le Spectral Similarity (Score 2) et l'Exact Spectral Similarity (Score 3).** Le score 3 est basé uniquement sur la similitude spectrale entre le spectre expérimental et les spectres de la base de données tandis que le score 2 est calculé à la fois à partir de la similarité spectrale mais aussi avec la similarité structurale entre les structures des candidats issus de la base de données moléculaires (PubChem) et ceux issus de la base de données spectrales (MoNa) [207]. La Figure S4, issue de la littérature, illustre le calcul des scores et plus particulièrement du score 2.

Enfin, **il est possible d'inclure deux notations supplémentaires correspondant à la fréquence de citations** soit en utilisant le nombre de brevets où le nom du candidat apparaît ou le nombre de citations répertorié dans PubChem. L'hypothèse est qu'une molécule souvent citée est un candidat plus probable qu'une autre moins citée. Ce critère peut permettre d'améliorer le nombre d'identifications correctes, cependant il limite également la probabilité de découvrir de nouvelles molécules

**Le score final correspond à la somme des cinq scores.**

Lorsque l'on soumet le spectre de fragmentation de l'acide vanillique dans MetFrag, le candidat avec le score final le plus haut (3,315) est bien l'acide vanillique. Si l'on regarde en détail le score de chaque critère obtenu pour les différents candidats, il apparaît que le Score 1 relatif à l'approche *in silico* (score intitulé « MetFrag » sur la Figure 72) n'est que très peu différenciant. En effet, ce dernier est proche de 1 pour environ 300 candidats, plus précisément 61 candidats obtiennent le score de 1. Le score 2 (nommé « SpectralSimilarity », en marron sur la Figure 72) permet de discriminer davantage les propositions. Il est compris entre 0,8 et 1 pour environ 90 candidats, mais seuls 2 candidats ont un score de 1. Enfin, le score 3 (en vert, nommé « ExactSpectralSimilarity ») permet de ne retenir qu'un seul candidat avec un score de 0,947, tandis que le second candidat a un score 3 très faible de 0,051. Concernant les notations à partir du nombre de citations (non représentées sur la figure), l'acide vanillique est classé troisième en considérant le nombre de brevets et cinquième en considérant le nombre de références dans PubChem.

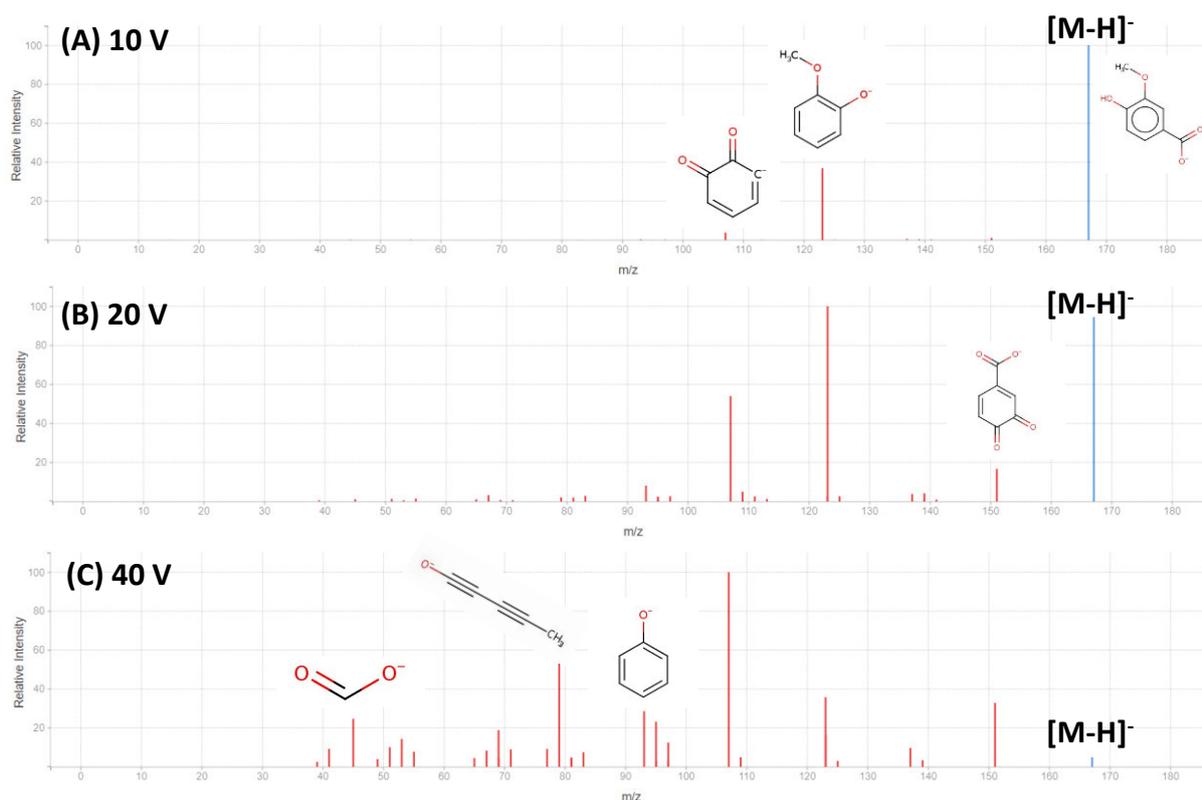
Bien que la comparaison de nos données avec des spectres expérimentaux de la base MoNa semble être la façon la plus pertinente de rechercher une formule développée pour les composés modèles étudiés comme l'acide vanillique, les scores associés ne peuvent pas être les seuls critères. En effet, si la molécule recherchée n'est pas présente dans la base de données, alors ces scores deviennent nuls.



**Figure 72 : Score 1 (en orange, « Metfrag »), Score 2 (en marron, « SpectralSimilarity »), Score 3 (en vert, « ExactSpectralSimilarity ») et Score final (en bleu) pour les candidats issus de l'interrogation de la base de données PubChem via l'outil MetFrag sur les données MS et MS<sup>2</sup> de l'acide vanillique**

### 5.1.2. CFM-ID

La deuxième plateforme employée est CFM-ID 3.0. Ce logiciel est basé sur un modèle statistique préalablement appris à partir de données d'apprentissage qui sont composées des couples spectre/structure (données de METLIN). À partir de ce modèle, il est possible de prédire le spectre de fragmentation d'une structure à trois énergies de fragmentation (10, 20 et 40 V). La Figure 73 représente les trois spectres MS<sup>2</sup> prédits pour l'acide vanillique tandis que la Figure 74 représente le spectre expérimental obtenu en ESI négatif.



**Figure 73 : Spectres MS<sup>2</sup> prédits par CFM-ID en mode négatif pour l'acide vanillique à trois énergies (A) 10, (B) 20 et (C) 40 V**

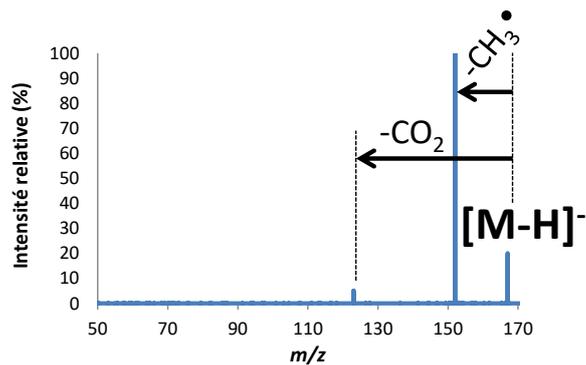


Figure 74 : Spectre MS<sup>2</sup> expérimental de l'acide vanillique en ESI négatif

Les spectres prédits à 20 et 40 V présentent de nombreux fragments tandis que le spectre expérimental ne contient que deux fragments et un résidu de l'ion parent. Ce trop grand nombre de fragments prédits est lié à la réduction du nombre de dimensions du modèle statistique employé qui est un modèle de Markov. Durant la phase d'apprentissage, un arbre de fragmentation est construit pour chaque composé en cassant toutes les liaisons. Ensuite, grâce aux couples spectre/structure, il est possible d'attribuer une probabilité d'occurrence pour chaque événement de fragmentation. Cependant, cela nécessite de connaître tous les fragments et par conséquent une puissance de calcul trop importante. Le nombre de dimensions du modèle a donc été réduit. Pour cela, le modèle considère certains fragments comme étant similaires et ne calcule donc plus qu'une probabilité. La Figure 75 présente un schéma simplifié. Les blocs de couleur représentent des sous-structures d'un composé. Dans ce cas-ci, le modèle va indifféremment attribuer la même probabilité de fragmentation de la liaison entre le bloc vert et le bloc bleu, qu'il y ait ou non la présence du bloc orange.

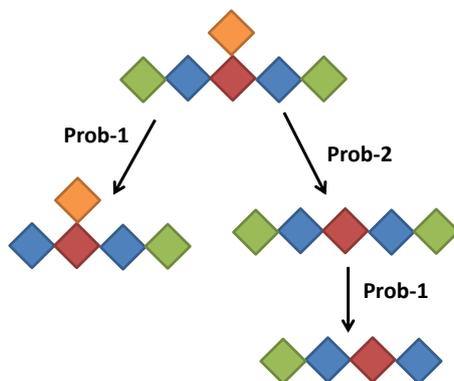


Figure 75 : Schématisation de la réduction du nombre de dimensions du modèle de Markov utilisé par CFM-ID

A partir du modèle construit, CFM-ID va pouvoir créer une librairie de spectres MS/MS. Cette librairie contient à la fois des spectres *in silico* générés par CFM-ID à partir de bases de données moléculaires comme HMDB et KEGG, mais aussi des spectres expérimentaux provenant de bases de données spectrales (MassBank, MetaboBASE, etc.). Cette librairie contient au total près de 398 000 spectres MS/MS pour 229 000 molécules, incluant 310 000 spectres *in silico* et 88 000 spectres expérimentaux de type ESI-MS/MS [210].

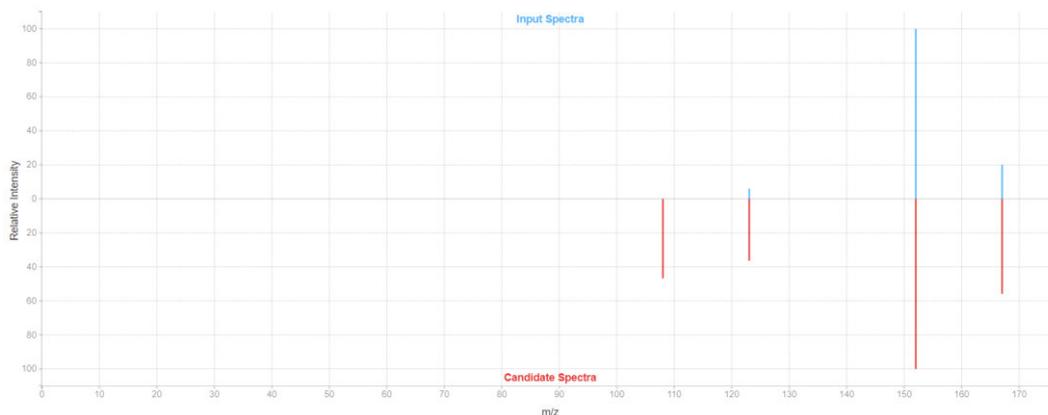
Pour procéder à l'identification, de la même façon que sur la plateforme MetFrag, les informations du type rapport  $m/z$ , tolérance en masse, mode d'ionisation, fragments et intensités associées en MS<sup>2</sup> sont utilisés comme données d'entrée. Onze bases de données plus ou moins spécifiques d'un

domaine (HMDB, KEGG, MassBank, NIST, DrugBank, PhytoHub, FiehnLib, ContaminantDB, iTree, CASMI2016, MetaboBASE) sont disponibles et peuvent être sélectionnées simultanément pour rechercher les candidats en fonction de la formule brute calculée. **La similarité entre le spectre expérimental et les spectres issus de la librairie (*in silico* et expérimentaux) est ensuite évaluée et permet d'obtenir un score pour chaque candidat.** Pour ce faire, deux méthodes sont disponibles (DotProduct ou Jaccard) qui diffèrent par leur algorithme pour calculer la similarité entre deux spectres de fragmentation.

CFM-ID 3.0 permet également d'inclure les métadonnées des candidats renseignés dans les bases de données (fréquence de citations et classification chimique). **La fréquence de citations permet d'ajouter une deuxième notation.** Enfin, **la classification chimique permet d'obtenir un troisième score.** CFM-ID prédit la famille chimique à laquelle appartient le composé recherché (acide méthoxybenzoïque par exemple) à partir des classes des candidats les mieux classés. Un score est ensuite calculé en comparant la classe prédite et la classe du candidat.

**Le classement final des candidats compris entre 0 et 1 combine les trois notations.**

Lorsque l'on soumet le spectre de fragmentation de l'acide vanillique dans CFM-ID, le candidat avec le score final le plus haut (0,96143) est bien l'acide vanillique. Si l'on regarde en détail les différents classements, l'acide vanillique a obtenu le meilleur score pour la similarité entre le spectre expérimental et le spectre dans la librairie. Le spectre de la librairie correspondait ici à un spectre expérimental issu de la base de données spectrales MassBank, ce qui explique la bonne similarité (Figure 76).



**Figure 76 : Comparaison du spectre expérimental (haut) et du spectre issu de la librairie de CFM-ID (bas)**

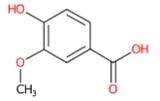
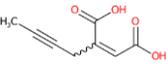
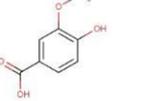
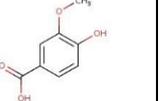
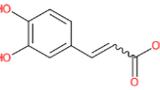
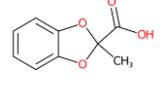
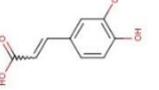
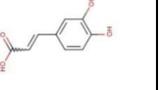
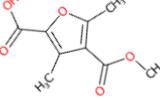
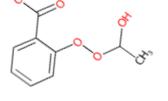
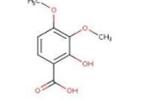
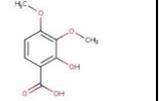
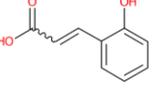
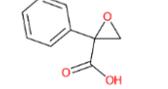
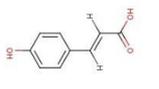
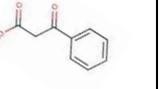
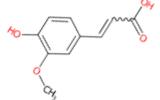
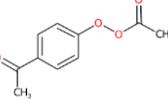
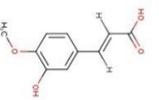
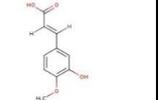
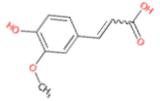
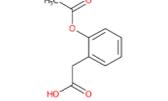
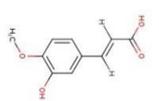
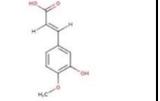
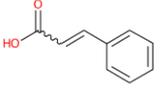
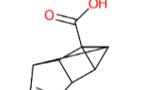
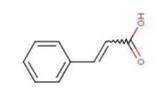
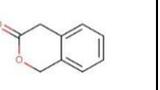
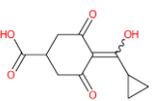
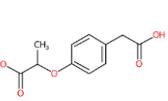
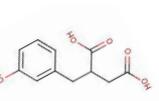
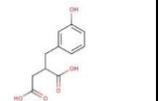
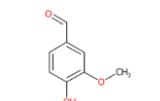
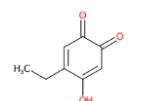
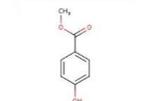
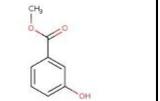
Concernant la notation pour la fréquence de citations, l'acide vanillique a également obtenu le meilleur score, ex aequo avec l'acide 3,4-dihydroxyphenylacétique. La classe prédite correspond aux acides m-méthoxybenzoïques et aux dérivés. L'acide vanillique a obtenu la troisième place derrière deux de ses isomères de position : l'acide 5-méthoxysalicylique et l'acide 3-hydroxy-5-méthoxybenzoïque.

## 5.2. Exemples d'application

Neuf spectres de fragmentation de molécules modèles phénoliques étudiées dans ce chapitre ont été importés dans les deux plateformes. Le Tableau 23 indique le rang auquel la molécule attendue est proposée avec toutes les notations (comparaison spectrale avec spectres *in silico* et expérimentaux, fréquence de citations et classification chimique) et le rang en utilisant seulement la comparaison spectrale, et ce pour chacune des plateformes. Le tableau intègre également la

structure du candidat en position 1 selon le score total ou seulement les scores concernant la comparaison spectrale. Les deux plateformes ont permis de retrouver la bonne structure pour tous les étalons dans le top 10 en considérant le score final. La structure a été retrouvée pour 8 étalons sur 9 dans le top 1 avec MetFrag et pour 6 étalons sur 9 sur CFM-ID. En revanche, si l'on considère uniquement la comparaison spectrale, pour MetFrag, cinq molécules sur neuf ont été retrouvées en tant que première proposition et seulement 3/9 avec CFM-ID. MetFrag semble donc plus performant ici. Cependant, lorsque la fréquence de citations n'est pas utilisée, l'acide syringique et l'acide sinapique se sont retrouvés aux 99<sup>ème</sup> et 307<sup>ème</sup> positions sur MetFrag. La fréquence de citations permet donc d'améliorer les performances des deux logiciels. **Lorsque l'on cherche à identifier des molécules connues et largement étudiées dans la littérature, l'utilisation de la fréquence de citations est pertinente.** En revanche, **cette dernière ne sera pas forcément adaptée pour la recherche de molécules beaucoup moins référencées.**

Tableau 23 : Structures proposées par MetFrag et CFM-ID pour neuf molécules connues fragmentées en ESI négatif

Etalon	Rang Met Frag	Proposition n°1 MetFrag selon classement final	Proposition n°1 MetFrag selon score 1 (in silico)	Rang CFM-ID	Proposition n°1 CFM-ID selon classement final	Proposition n°1 CFM-ID selon score similarité spectrale
Acide vanillique	1			1		
Acide caféique	1			1		
Acide syringique	99			6		
Acide p-coumarique	3			1		
Acide férulique	1			3		
Acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique	6			1		
Acide cinnamique	1			1		
Acide sinapique	307			2		
Vanilline	1			2		

Les structures proposées par MetFrag et CFM-ID pour quatre molécules inconnues sélectionnées à titre d'exemples dans la fraction AQ1 issue de l'échantillon B1 ont été comparées avec les structures que nous avons proposées par traitement manuel des spectres de fragmentation (Tableau 24). Les structures proposées par les plateformes ne considèrent que les fragments obtenus en MS<sup>2</sup>, tandis que l'ensemble des étapes de fragmentation a été considéré lors du traitement manuel ainsi que les données complémentaires disponibles comme le temps de rétention, le spectre UV et la fraction LLE dans laquelle le composé a été extrait.

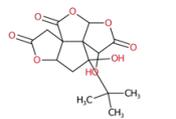
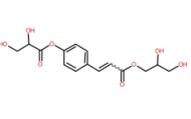
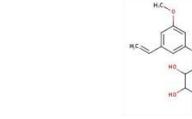
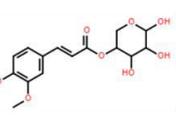
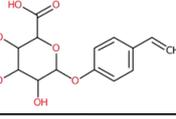
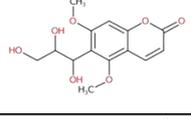
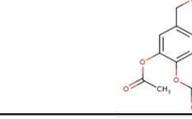
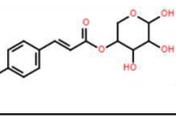
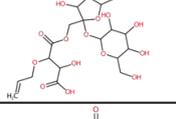
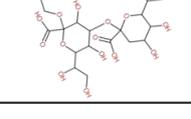
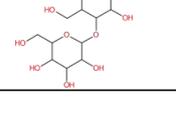
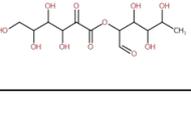
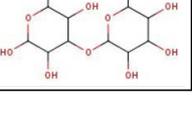
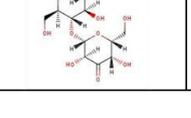
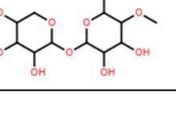
Pour le premier composé (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>), nous avons proposé un acide férulique lié à un pentose. Les structures proposées par les plateformes ne correspondent pas à notre proposition. Les fragments obtenus en MS<sup>2</sup> pour cette molécule correspondent à la fragmentation de la partie sucre de la molécule, ainsi la structure proposée par MetFrag en considérant uniquement les comparaisons spectrales (*in silico* ou spectres de MoNa) reste plausible. Toutefois, la perte de •CH<sub>3</sub> en MS<sup>3</sup> ne peut pas être expliquée avec cette structure. En revanche, lorsque l'on utilise également la fréquence de citations, la structure proposée par MetFrag semble improbable. La structure proposée par CFM-ID est également peu probable. En effet, aucune perte correspondant à la fragmentation d'un acide carboxylique n'a été mesurée en MS<sup>2</sup>. À noter que les scores issus des métadonnées n'ont pas influencé la structure proposée en première proposition pour CFM-ID.

Pour le deuxième composé, C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, aucune des propositions faites ne semble probable. Tout d'abord, ce composé est présent dans la fraction AQ1, il s'agit donc d'un composé particulièrement hydrophile. Ensuite, des pertes typiques de sucres, comme la perte de C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>, ont été mesurées en MS<sup>2</sup>. Les structures proposées ne remplissent aucun de ces deux critères. Toutefois, la structure proposée par MetFrag en considérant le score final se rapproche davantage de notre structure proposée que celle proposée par CFM-ID.

Pour le troisième composé, C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>, nous n'avons pas proposé de structure mais nous avons supposé que ce composé pouvait correspondre à un oligomère contenant deux pentoses liés à un acide méthylglucuronique avec une fonction acétyle supplémentaire. La structure proposée par MetFrag en se basant uniquement sur la similarité spectrale semble assez exotique avec deux acides carboxyliques portés par des atomes de carbone quaternaires. Seulement 4 candidats ont été trouvés à partir de la formule brute sur PubChem et aucun candidat n'a été trouvé dans les bases de données employées par CFM-ID. Il est possible que ce composé ne soit pas référencé dans les bases de données, même moléculaires. Les approches utilisées ici ne sont viables que pour la recherche de composés « inconnus, connus ». **Le verrou levé via cet exemple est la recherche « d'inconnu, inconnu », c'est-à-dire non référencé, qui demande de développer des approches n'ayant pas recours à des bases de données moléculaires ou spectrales.**

Enfin, pour le dernier composé, C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>, nous avons proposé une structure avec un pentose lié à un acide méthylglucuronique. Notre proposition est assez proche de celle faite par CFM-ID selon le score final, bien que cette dernière ne permette pas l'obtention du fragment Y<sub>1</sub><sup>-</sup> à m/z 249 (Figure 70). La fréquence de citations a permis à MetFrag de proposer une structure plus proche de celle que nous avons proposée.

**Tableau 24 : Structures proposées par MetFrag, CFM-ID et par traitement manuel des spectres de fragmentation**

Fraction - Formule brute	MetFrag		CFM-ID		Notre structure proposée
	Proposition n°1 selon classement final	Proposition n°1 selon score similarité spectrale	Proposition n°1 selon classement final	Proposition n°1 selon score similarité spectrale	
AQ1 – C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>					
AQ1 – C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>					
AQ1 – C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>			0 candidat trouvé dans les bases de données		/
AQ1 – C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>					

En conclusion, **l'utilisation de bases de données est pertinente pour des molécules connues et largement référencées** comme cela est le cas pour les étalons étudiés. Les bases de données spectrales ainsi que la fréquence de citations ont permis d'améliorer la performance des identifications pour les composés étalons. En revanche, ces **outils s'avèrent limités pour des composés peu connus, ou même probablement inconnus pour certains**. De plus, un certain recul de l'utilisateur est nécessaire pour estimer si les structures proposées sont probables par rapport à ses propres connaissances de l'échantillon. Par ailleurs, seul le mode négatif a été utilisé ici pour évaluer les deux plateformes étant donné que nous avons détecté la majorité des analytes en ESI négatif. Cependant, la plupart des algorithmes d'identification sont principalement nourris, alimentés et développés pour le mode positif.

Les approches combinant la fragmentation *in silico*, l'utilisation de base de données spectrales et les métadonnées semblent être un bon moyen d'identifier le plus tôt possible la présence de composés décrits dans la littérature (déréplication d'un mélange complexe). Le **véritable challenge** aujourd'hui est **d'identifier** non pas des molécules « inconnues, connues » mais **des composés inconnus non présents dans les bases de données** (composés « inconnus, inconnus »).

## 6. Conclusion

Dans ce chapitre, **une approche analytique multi-technique** combinant les extractions liquide-liquide, la RPLC/HRMS et les fragmentations multi-étapes, a été développée pour réaliser une caractérisation avancée d'un échantillon de biomasse provenant du prétraitement d'une paille de blé.

Le protocole d'extraction liquide-liquide a été appliqué à un échantillon de biomasse. L'objectif de ces extractions est d'organiser l'échantillon en quatre fractions selon la famille chimique des analytes. Chaque fraction a été analysée par RPLC/HRMS<sup>n</sup>. La combinaison du protocole LLE et de la séparation RPLC permet de limiter le risque de co-élutions et donc de suppression d'ionisation qui

peut se produire dans la source d'ionisation à pression atmosphérique. De cette façon, la composition de l'échantillon devrait être plus représentative que celle obtenue par introduction directe ou par analyse RPLC/HRMS seule. La spectrométrie de masse à haute résolution a permis de déterminer une formule brute pour chaque composé. Afin d'approfondir la compréhension de la composition chimique de produits provenant de la transformation de la biomasse, des **fragmentations multiples jusqu'à MS<sup>7</sup>** ont été réalisées. Les fragments typiques obtenus étaient conformes aux familles chimiques des fractions. Par exemple, une étude de la fragmentation de composés phénoliques a mis en évidence certaines pertes typiques comme les pertes de CO<sub>2</sub> pour les acides carboxyliques ou les pertes de radical •CH<sub>3</sub> lorsqu'une fonction méthoxyle est présente.

**En combinant les propriétés des fractions LLE, le temps de rétention, le spectre UV, la formule brute ainsi que les informations structurales fournies par les expériences de fragmentation**, des structures ont été proposées pour des composés possédant des masses moléculaires pouvant atteindre 600 g/mol. Ainsi, des propositions de structures impliquant des sucres avec des fonctions acides carboxyliques ou encore des complexes lignine-carbohydrate ont pu être identifiées. Nous avons également proposé **une interprétation de diagrammes van Krevelen** à l'aide de lignes de conjugaison comme un outil aidant à l'identification des structures de molécules inconnues.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre consistait à **évaluer l'intérêt et la fiabilité des structures proposées par des plateformes telles que MetFrag ou CFM-ID**. Ces dernières comparent le spectre de fragmentation expérimental à des spectres *in silico* ou expérimentaux. Il s'est avéré que ces approches étaient relativement fiables pour des molécules très décrites dans la littérature et dans les bases de données spectrales. **Ces outils pourraient donc être pertinents pour la déréplication de mélange complexe**. Cependant, **ces approches sont limitées pour des composés moins étudiés** comme c'est le cas des composés présents dans nos échantillons, et plus particulièrement dans la fraction aqueuse 1. Les structures des analytes présents dans l'échantillon et proposées par traitement manuel semblaient plus cohérentes que celles proposées par les plateformes. En effet, bien que très consommateur de temps, lors d'un traitement manuel, **des critères supplémentaires peuvent être pris en compte et croisés comme la rétention du composé, son spectre UV, son appartenance à une fraction LLE donnée** ou encore la connaissance de l'échantillon.

L'association du protocole de fractionnement et du couplage de la RPLC à la HRMS montre toutefois **une limite pour les composés les plus polaires**. En effet, ces derniers qui se retrouvent dans la fraction AQ1, co-éluent en RPLC dans le palier isocratique avec 1% de méthanol. Une méthode séparative bidimensionnelle couplée à la HRMS a donc été développée pour ces analytes. Cette dernière est présentée dans le Chapitre 5.





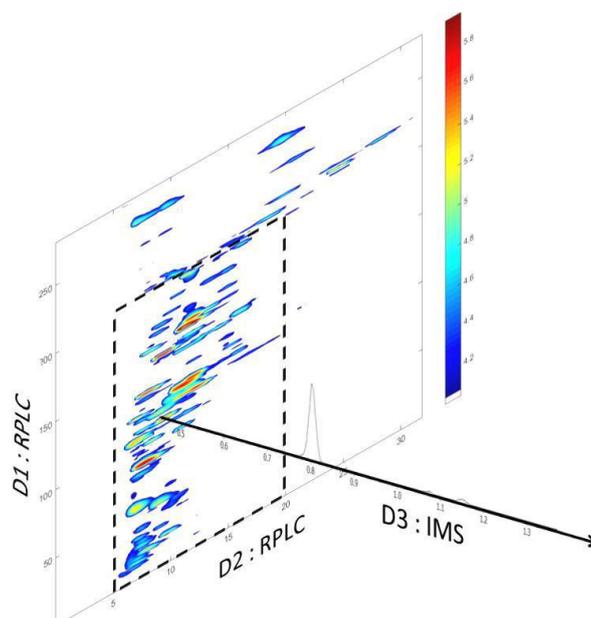
# Chapitre 5 – Couplage RPLC×RPLC/HRMS en ligne et mobilité ionique pour l’analyse des oligomères de sucres

Ce chapitre fait l’objet d’une publication :

« *On-line two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for the separation of carbohydrates from lignocellulosic biomass* »

Carole Reymond, Agnès Le Masle, Cyril Colas, Nadège Charon

*Journal of Chromatography A* (2021) 461716, DOI 10.1016/j.chroma.2020.461716



<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 137 -</b>
<b>2. NATURE DES SUCRES D'INTERET .....</b>	<b>- 138 -</b>
<b>3. DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE EN LIGNE RPLC×RPLC/HRMS.....</b>	<b>- 139 -</b>
3.1. CHOIX DES PHASES STATIONNAIRE ET MOBILE EN PREMIERE DIMENSION (D1) .....	- 140 -
3.2. CHOIX DE LA PHASE STATIONNAIRE EN SECONDE DIMENSION (D2) .....	- 143 -
3.3. DIMENSIONNEMENT DE LA METHODE LCxLC .....	- 144 -
3.3.1. <i>Dimensionnement de D1</i> .....	- 145 -
3.3.2. <i>Dimensionnement de l'interface : fréquence d'échantillonnage</i> .....	- 145 -
3.3.3. <i>Dimensionnement de D2</i> .....	- 148 -
3.4. APPLICATION DE LA METHODE OPTIMISEE .....	- 149 -
<b>4. GAIN APPORTE PAR LE COUPLAGE RPLC×RPLC/HRMS EN COMPARAISON A LA RPLC/HRMS .....</b>	<b>- 151 -</b>
<b>5. INTERET DE LA MOBILITE IONIQUE EN TANT QUE 3EME OU 4EME DIMENSION.....</b>	<b>- 153 -</b>
5.1. COUPLAGE RPLC/IMS/HRMS ET COMPARAISON A LA RPLC×RPLC/HRMS .....	- 153 -
5.2. POUR ALLER PLUS LOIN, LA RPLC×RPLC/IMS/HRMS .....	- 159 -
<b>6. CONCLUSION .....</b>	<b>- 161 -</b>

## 1. Introduction

Dans le Chapitre 4 traitant de la caractérisation par RPLC/HRMS<sup>n</sup> des fractions issues d'extractions liquide-liquide de l'échantillon B1, il apparaît que **89% de l'échantillon est regroupé dans la fraction aqueuse 1** contenant les composés hydrophiles, à savoir les sucres et les complexes lignine-carbohydrate. Or, les sucres ne sont pas ou très peu retenus sur la phase stationnaire employée (colonne de silice greffée avec des groupements C18). Ainsi de **nombreuses co-élutions** sont présentes au début du chromatogramme, ce qui peut entraîner des effets de matrice au sein de la source d'ionisation mais aussi un traitement des données plus complexe.

Dans la littérature, **les travaux relatant de la caractérisation des mélanges issus de la conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique se sont majoritairement concentrés sur les composés phénoliques ainsi que les furanes** [17,29,33,34,38,72,211,212]. En effet, bien que minoritaires, ces classes de molécules sont connues comme étant inhibitrices de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation alcoolique. Toutefois, malgré l'identification d'une quarantaine de ces molécules incluant les petits acides carboxyliques (acide acétique, acide formique, acide fumarique, etc.), la réactivité des mélanges n'est à ce jour pas entièrement expliquée [14,33,211,212].

Concernant les composés les plus hydrophiles, seuls les sucres monomères classiques, c'est-à-dire sans groupement additionnel (glucose, xylose, etc.) sont fréquemment identifiés et quantifiés. Coulier *et al.* ont proposé une méthode d'analyse des oligosaccharides dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique en utilisant la chromatographie d'échange d'anions (HPAEC) couplée à la spectrométrie de masse [53]. Bien que la HPAEC seule n'ait pas atteint une séparation complète des sucres, la spectrométrie de masse a permis de détecter des oligosaccharides avec un degré de polymérisation allant jusqu'à 4. Plus généralement, les sucres provenant des matières végétales ou des aliments sont couramment analysés par HPAEC [56,213], chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) [214–217] et RPLC avec phase stationnaire en carbone graphite poreux (PGC) [67]. La GC pourrait aussi bien être employée mais elle nécessite des méthodes de dérivation [46,47]. Quelques études ont également mis en évidence la présence de groupements O-acétyl, O-méthyle, acide carboxylique sur certains sucres grâce à des expériences de fragmentation par spectrométrie de masse [64,67,218,219].

Plus récemment, le couplage de la mobilité ionique et de la spectrométrie de masse (IMS/MS) a connu un regain d'intérêt au sein de la communauté scientifique, notamment grâce au développement de dispositifs plus puissants tels que la mobilité à trappe ionique (TIMS). La séparation en mobilité ionique est basée sur la taille, la forme et la charge des composés. À partir des mobilités mesurées, la **section efficace de collision (CCS)** peut être calculée et utilisée notamment pour **améliorer la confiance dans les identifications** des composés. En effet, la CCS étant une grandeur physique, il est possible de calculer théoriquement sa valeur pour une structure donnée via des méthodes de chimie théorique. **La comparaison des CCS expérimentale et théorique**, permet d'appuyer ou alors d'exclure des structures dont la CCS théorique correspond ou ne correspond pas aux valeurs mesurées. De plus, la mobilité ionique est une dimension analytique supplémentaire et permet donc d'**augmenter la résolution et la capacité de pics globale d'un couplage** [220–223]. Néanmoins, dans les couplages IMS/MS, l'IMS et la MS n'étant pas totalement orthogonales, une augmentation limitée de la résolution pourra être observée. Enfin, la mobilité ionique permet un **pré-filtrage des ions** en amont de l'analyseur de masse. Ainsi, lors d'expériences de fragmentation,

des **spectres MS/MS de meilleure qualité** (moins de bruit et séparation de spectres chimériques) sont obtenus. Les fragments formés peuvent également être plus facilement associés à l'ion précurseur en tenant compte de l'alignement des mobilités (un ion précurseur et ses fragments ont le même temps de mobilité). Dans la littérature, Hofmann *et al.* ainsi que d'autres équipes ont démontré, en utilisant des sucres synthétiques, que l'IMS/MS permettait de séparer les isomères [224–227]. De plus, les **échelles de temps de mesure de chaque dimension** (de l'ordre de quelques secondes en LC, de 10 à 100 ms pour l'IMS et de 100  $\mu$ s pour la MS dans le cas d'un TOF) rendent le couplage **LC/IMS/MS** tout à fait envisageable. Bien que moins couramment retrouvé dans la littérature que le couplage IMS/MS en introduction directe en raison du volume des données, ce type de méthode tridimensionnelle a déjà été réalisée pour l'analyse de métabolites végétaux [228], de lipides [220] ou encore d'échantillons biologiques [229,230]. Deux publications relatent également du couplage **LC $\times$ LC/IMS/MS** [223,231]. Elles démontrent notamment que ce type de couplage offre une résolution inégalée, mais le traitement des données reste une limite pour la visualisation et l'interprétation des données à cinq dimensions (deux temps de rétention LC, la mobilité, le rapport  $m/z$ , l'abondance) [231]. Zhang *et al.* ont choisi une approche chimométrique afin d'exploiter de telles données et mettre en évidence les variables permettant de différencier deux types de plantes [223].

**Dans ce chapitre, le premier objectif est de développer un couplage RPLC $\times$ RPLC/HRMS pour l'analyse non ciblée des sucres contenus dans les échantillons issus du prétraitement biochimique de la biomasse lignocellulosique. Pour cela, les sucres d'intérêt présents dans les échantillons ont été ciblés en utilisant la méthode RPLC/HRMS et la méthode chromatographique bidimensionnelle compréhensive en ligne a ensuite été optimisée pour les séparer au mieux. Les conditions finales de cette méthode ont été appliquées à l'échantillon A1 qui correspond à un jus de cuisson acide (acide sulfurique) de paille de blé. L'apport de la RPLC $\times$ RPLC/HRMS en comparaison avec la RPLC/HRMS est démontré via quelques illustrations. Pour terminer, les avantages et inconvénients de la mobilité ionique au sein du couplage RPLC/IMS/HRMS sont comparés à la RPLC $\times$ RPLC/HRMS. L'intérêt de la mobilité ionique dans la méthode à quatre dimensions RPLC $\times$ RPLC/IMS/HRMS est également discuté. À noter que dans ce chapitre, l'ensemble des expériences ont été réalisées sur le timsTOF afin d'avoir une fréquence d'acquisition suffisante pour décrire les pics en sortie de la seconde dimension. Les paramètres expérimentaux sont détaillés dans le Chapitre 2.**

## 2. Nature des sucres d'intérêt

Dans un premier temps, l'échantillon A1 a été analysé en RPLC/HRMS avec une phase stationnaire à polarité de phase inversée de type silice greffée avec des groupements C18 en ESI négatif et positif afin de cibler quels étaient les sucres majoritaires non retenus. **Ces composés nous serviront par la suite de molécules de référence pour le développement de la méthode chromatographique bidimensionnelle.** La Figure 77 présente les chromatogrammes obtenus en electrospray dans les modes positif et négatif, ainsi que le chromatogramme UV à 210 nm. Bien qu'un grand nombre de composés aient été retenus et élués lors du gradient (temps de rétention compris entre 5 et 25 min), des pics intenses ont été détectés en ESI durant le palier isocratique (temps de rétention < 5 min). Malgré l'enregistrement du chromatogramme UV à une longueur d'onde relativement faible, le signal UV entre 0 et 5 min est peu intense. Dans le Chapitre 4, un échantillon similaire a été caractérisé et il a été démontré à l'aide d'expériences de fragmentation que ces composés non retenus appartenaient à la famille des sucres et contenaient également des groupements comme des

acides carboxyliques et des méthoxyles. De plus, cette famille de composés peut être définie par un ratio H/C élevé compris entre 1,3 et 2,3, et un ratio O/C compris entre 0,7 et 1,2.

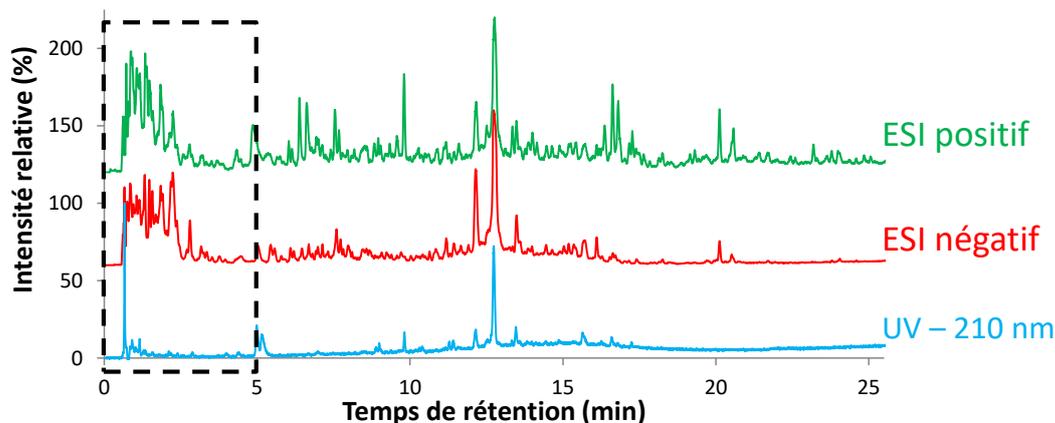


Figure 77 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse RPLC/HRMS de l'échantillon A1 en ESI positif, ESI négatif et UV à 210 nm

Les huit ions les plus intenses détectés dans cet échantillon entre 0 et 5 min en ESI négatif sont présentés dans le Tableau 25. De la même manière que lors de la caractérisation de l'échantillon B1 dans le Chapitre 4, il apparaît que **les sucres présents dans l'échantillon A1 diffèrent des oligomères «classiques»** constitués de sucres simples (glucose, xylose, etc.). Ils diffèrent, par exemple, du cellobiose qui est un disaccharide de glucose obtenu par hydrolyse de la cellulose avec un DBE de 2 et la formule brute suivante :  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Dans le Tableau 25, deux ions ont douze atomes de carbone, mais leur DBE est de 3 et 4. Ces valeurs de DBE plus élevées pourraient être liées à la présence de fonctions chimiques supplémentaires autres que des sucres tels que des fonctions acides carboxyliques (acide glucuronique) et/ou à des réactions de déshydratation lors de la conversion de la biomasse.

Tableau 25 : Principaux ions détectés dans l'échantillon A1 en ESI négatif entre 0 et 5 min en RPLC/HRMS

ID	m/z	Formule brute	Erreur (ppm)	H/C	O/C	DBE
1	513,1458	$C_{19}H_{30}O_{16}$	0,6	1,58	0,84	5
2	499,1305	$C_{18}H_{28}O_{16}$	0,0	1,56	0,89	5
3	471,1355	$C_{17}H_{28}O_{15}$	0,2	1,65	0,88	4
4	381,1089	$C_{14}H_{22}O_{12}$	0,0	1,57	0,86	4
5	321,0831	$C_{12}H_{18}O_{10}$	0,9	1,50	0,83	4
6	339,0934	$C_{12}H_{20}O_{11}$	-0,4	1,67	0,92	3
7	325,0780	$C_{11}H_{18}O_{11}$	-1,1	1,64	1,00	3
8	191,0196	$C_6H_8O_7$	0,5	1,33	1,17	3

L'objectif de la suite de ce chapitre est de développer une méthode permettant de séparer ces composés.

### 3. Développement du couplage en ligne RPLC×RPLC/HRMS

Afin de réaliser la séparation des sucres présents dans les échantillons de biomasse lignocellulosique, une méthode de chromatographie en phase liquide bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de

masse haute résolution a été développée. Le couplage en ligne de deux méthodes RPLC a été sélectionné, à savoir **une colonne à base de silice et une colonne conçue avec un autre matériau**. Ce choix est basé sur une étude antérieure qui avait mis en évidence le potentiel d'un tel couplage pour une analyse LCxLC en ligne d'un échantillon de biomasse. En effet, il a été démontré que le couplage de deux phases stationnaires de type RPLC mais couplant une base silice avec une base non-silice permettait d'accéder à des capacités de pics élevées pour la séparation de mélanges de composés oxygénés [30].

### 3.1. Choix des phases stationnaire et mobile en première dimension (D1)

Deux colonnes ont été considérées pour la première dimension : la première avec une phase stationnaire en carbone graphite poreux (Hypercarb) et la seconde avec une phase stationnaire en polystyrène/divinylbenzène (PLRPS). Le manque de connaissances approfondies sur les échantillons de biomasse, et plus spécifiquement sur les oligomères de sucre produits suite au prétraitement acide, limite grandement l'optimisation de la méthode au moyen de molécules modèles. Ainsi, les composés les plus intenses présentés dans le Tableau 25 ont été utilisés pour comparer la séparation obtenue sur les deux colonnes sélectionnées.

Les BPC (*Base Peak Chromatogram*) en ESI négatif obtenus lors de l'analyse de l'échantillon en utilisant les colonnes Hypercarb et PLRP-S sont présentés sur la Figure 78. De manière similaire à la rétention sur la colonne C18, les sucres n'ont que très peu d'affinité avec la phase stationnaire PLRPS. En effet, tous les ions du Tableau 25 marqués de 1 à 8 ont été élués dans le palier isocratique avec 99% d'eau. À l'opposé, **la colonne Hypercarb montre une séparation prometteuse des sucres**. Les huit molécules semblent être éluées en fonction du nombre d'atomes d'oxygène et plus probablement du nombre de groupes hydroxyles. Plusieurs études tendent à expliquer la rétention de tels composés polaires sur des colonnes en carbone graphite, toutefois ce comportement unique n'est pas encore complètement bien compris [66].

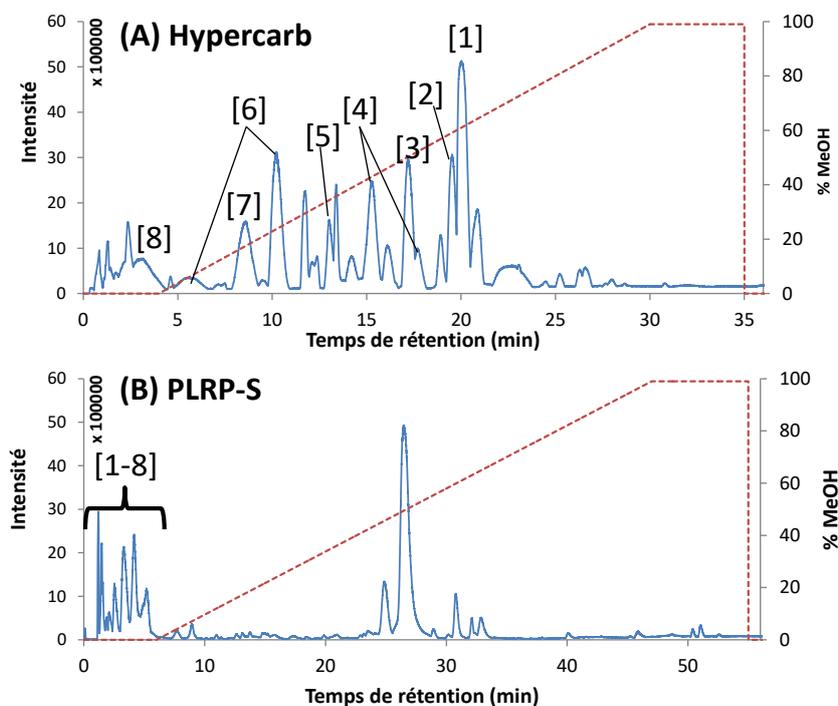


Figure 78 : BPC entre  $m/z$  100-1000 en ESI négatif avec la colonne (A) Hypercarb et (B) PLRP-S (se référer au Tableau 25 pour l'identité des pics labélisés de 1 à 8)

Au vu de ces résultats, nous avons donc **sélectionné la colonne Hypercarb**. Toutefois, dans les conditions précédentes mettant en œuvre un gradient d'éluion variant de 1 à 99% de méthanol avec 0,01% (v/v) d'acide formique (FA), **deux problèmes principaux ont été mis en évidence**. Le premier concerne **l'éluion de l'acide sulfurique utilisé lors du prétraitement de la biomasse tout au long du chromatogramme**. Une forte compétition entre les analytes et l'acide sulfurique a donc lieu au cours du processus d'ionisation, ce qui peut potentiellement engendrer une suppression d'ionisation des composés d'intérêt. Les conditions chromatographiques ont donc été modifiées en augmentant la quantité de FA dans les phases mobiles (eau et méthanol). La Figure 79 présente les chromatogrammes d'ions extraits (EIC) pour l'acide sulfurique ( $m/z$  96) avec trois proportions de FA. Avec 0,01% de FA (v/v), l'intensité de l'acide sulfurique en ESI négatif est d'environ 3 500 000, ce qui est bien supérieur aux intensités de la plupart des pics sur la Figure 78(A). **En augmentant le pourcentage de FA de 0,01 à 0,5%, l'éluion de l'acide sulfurique s'est restreinte au début de l'analyse entre 1 et 4 min.**

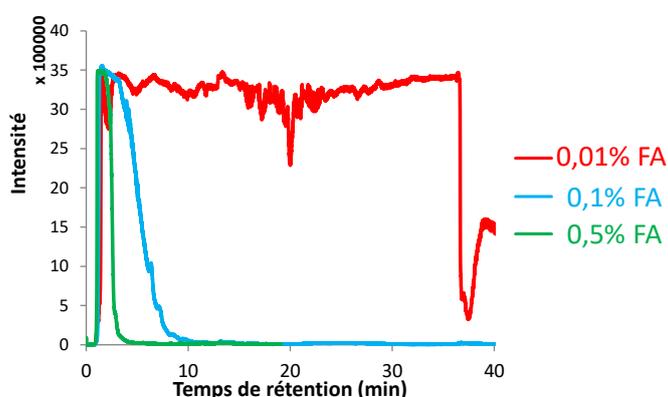


Figure 79 : EIC de l'acide sulfurique ( $\pm 0,005$ ) avec la colonne Hypercarb pour trois proportions de FA dans l'eau et le méthanol

Par ailleurs, une légère diminution de la rétention des analytes d'intérêt a été observée lors de l'augmentation du pourcentage de FA dans la phase mobile (Figure 80). Des inversions dans l'ordre d'éluion des huit sucres du Tableau 25 ont également été observées. Compte tenu de l'impact de FA présent dans les phases mobiles, **la proportion de 0,5% a été sélectionnée**. Bien qu'une quantité élevée d'acide dans les phases mobiles puisse être problématique pour le couplage avec la spectrométrie de masse, il s'agit ici de la première dimension chromatographique et l'acide formique sera par la suite dilué dans la phase mobile de la seconde dimension avant d'entrer dans la source d'ionisation.

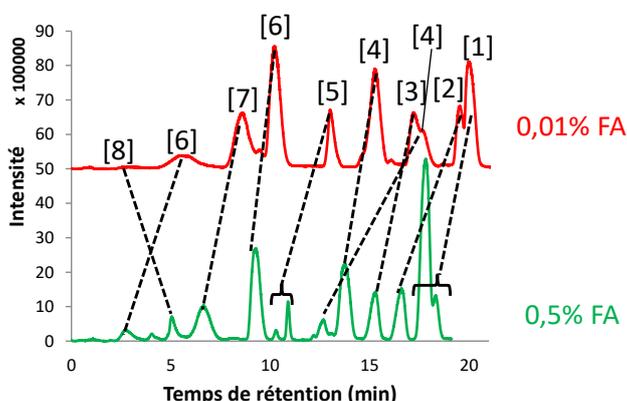


Figure 80 : EIC des huit composés du Tableau 25 obtenus avec 0,01 et 0,5% de FA

La seconde problématique rencontrée avec le gradient d'éluion utilisé concerne la non-éluion de certains composés présents dans l'échantillon, malgré une composition de phase mobile finale de 99% de méthanol. Lors du développement d'une méthode chromatographique utilisant directement un échantillon, il est nécessaire de **porter une attention particulière à l'éluion de l'ensemble des analytes**. En RPLC/HRMS, l'ion le plus intense détecté en ESI négatif dans cet échantillon est le complexe acide férulique-pentose ( $C_{15}H_{18}O_8$ ) éluant à 12,7 min (Figure 77). **Or, ce composé n'a pas été détecté, probablement non élué de la colonne Hypercarb lors de l'utilisation de méthanol** (MeOH) comme phase mobile organique, malgré l'utilisation de 25 volumes de colonne de méthanol. Il a donc été nécessaire d'augmenter la force éluante de la phase mobile organique. Pour cela, **le MeOH a été remplacé par de l'acétonitrile (ACN) ou de l'isopropanol (IPA)**. La Figure 81 illustre la séparation de l'échantillon A1 en fonction du solvant organique. Les BPC ont été tracés entre  $m/z$  50 et 1000 et incluent donc le signal de l'acide sulfurique. Lors du remplacement du méthanol par l'acétonitrile, des analytes supplémentaires ont été élués tels que le composé phénolique avec un temps de rétention de 30 min ( $C_9H_8O_3$ , DBE 6, probablement l'acide coumarique). Cependant, **pour éluer les complexes lignine-carbohydrate, l'isopropanol était nécessaire**. Le composé  $C_{15}H_{18}O_8$  a été élué vers 28 min soit avec 75% d'IPA. Globalement, l'ordre d'éluion selon la famille chimique était le suivant : sucres < composés phénoliques < complexes lignine-carbohydrate. La forte rétention de ces derniers peut être liée à l'ajout de mécanismes de rétention des sucres et des composés phénoliques. L'utilisation d'IPA semble incontournable pour éluer l'intégralité de l'échantillon de la colonne Hypercarb, mais cela engendre également une perte de rétention de nos composés d'intérêt. Les temps de rétention des sucres [2] et [1] sont passés respectivement de 19 et 20 min avec le méthanol à 10 et 11 min avec l'IPA et les autres sucres ont été élués près du volume mort, en même temps que l'acide sulfurique.

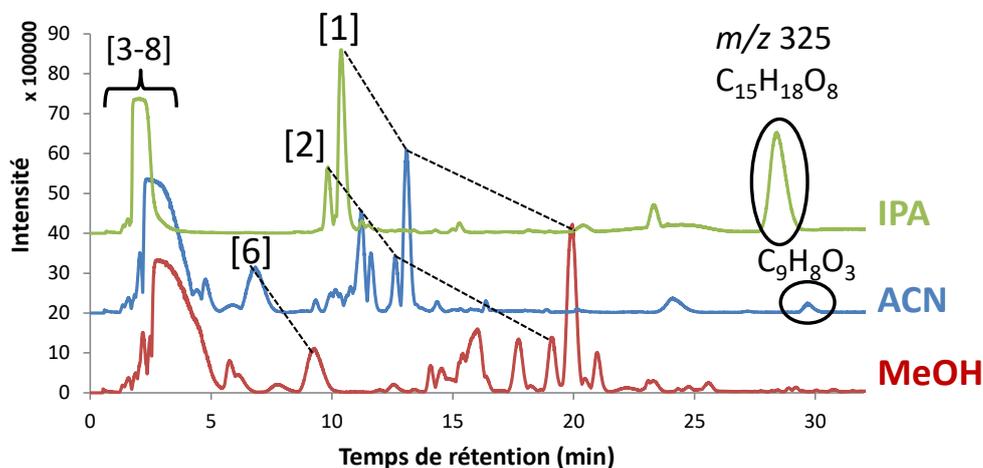


Figure 81 : BPC entre  $m/z$  50-1000 en ESI négatif avec MeOH, ACN ou IPA + 0,5% de FA (v/v) comme phase mobile organique pour l'éluion des analytes de l'échantillon A1 sur la colonne Hypercarb

Les conditions utilisées lors de l'obtention des chromatogrammes de la Figure 81 consistaient en une étape isocratique de 4 min avec 1% d'IPA additivé de 0,5% de FA. Afin d'améliorer la séparation des sucres, **la composition de la phase mobile lors de l'étape isocratique a été remplacée par 100% d'eau + 0,5% FA**. Comme illustré sur la Figure 82, la modification de la composition de la phase mobile sur le palier isocratique a permis d'augmenter la rétention des composés d'intérêt, notamment les sucres [3] à [8] qui étaient préalablement élués avec de l'acide sulfurique.

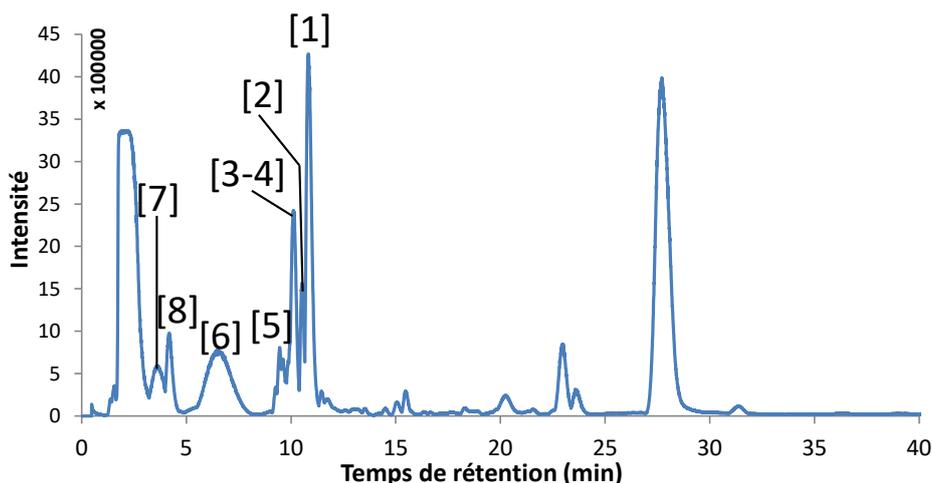


Figure 82 : BPC entre  $m/z$  50-1000 obtenu en ESI négatif lors de la séparation de l'échantillon A1 via la colonne Hypercarb avec un gradient de 0 à 99% d'IPA + 0,5% FA (v/v) de 4 à 30 min

Certaines co-élutions demeurent, cependant en ajustant la pente du gradient d'élution, la séparation entre les sucres devrait être améliorée. **Afin de sélectionner un gradient adapté, la composition à l'élution ( $C_e$ ) du composé [1] a été calculée** comme suit :

$$C_e = C_i + \frac{C_f - C_i}{t_G} \times (t_R - t_0 - t_D - t_{iso}) \quad (\text{Éq. 16})$$

Où  $C_i$  et  $C_f$  sont respectivement les compositions initiale et finale du gradient,  $t_G$  le temps de gradient,  $t_R$  le temps de rétention,  $t_0$  le temps mort de la colonne,  $t_D$  le temps de délai et  $t_{iso}$  le temps de l'étape isocratique avec 100% d'eau. Tous les temps sont exprimés en minutes.

$t_0$  (min) a été calculé selon l'équation 17 :

$$t_0 = \frac{V_0}{F} \quad (\text{Éq. 17})$$

Où  $F$  (mL/min) est le débit de la phase mobile, et  $V_0$  (mL) le volume mort de la colonne estimé par l'équation 18 :

$$V_0 = \frac{\pi \times d^2 \times L}{4} \times \epsilon \quad (\text{Éq. 18})$$

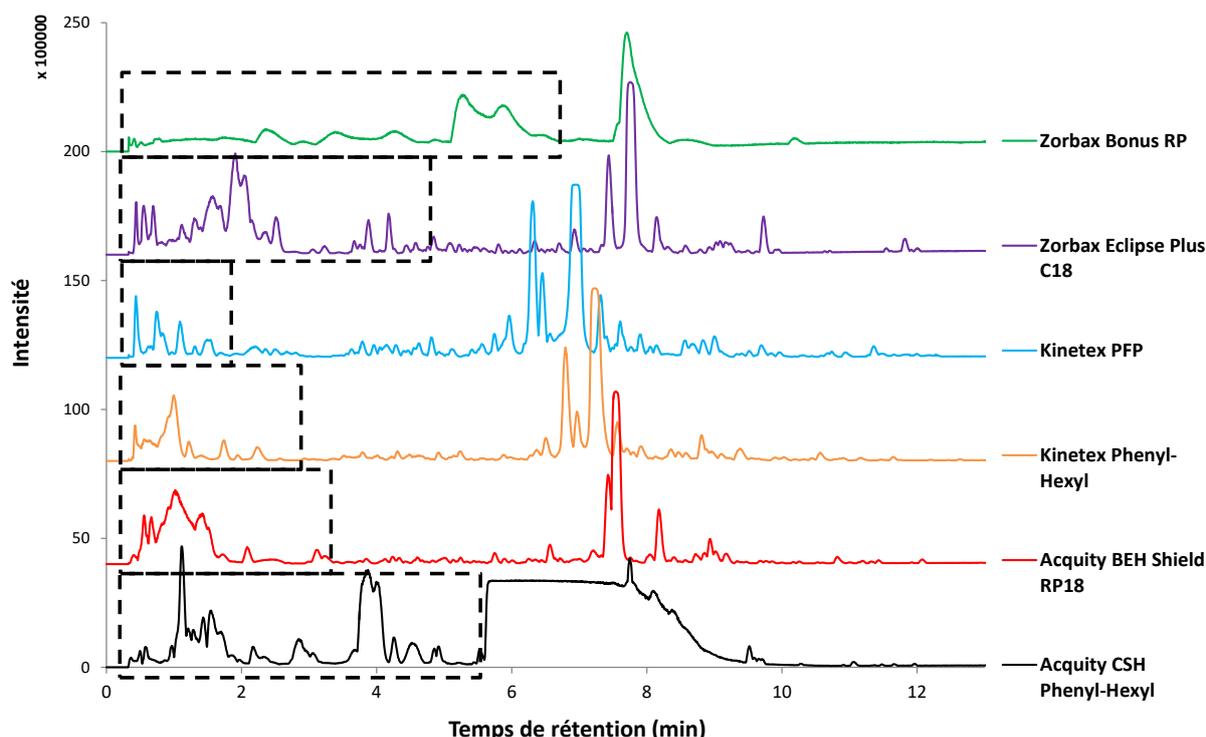
Avec  $d$  le diamètre de la colonne (cm),  $L$  la longueur de la colonne (cm) et  $\epsilon$  la porosité de la colonne estimée à 0,7.

La composition à l'élution du composé [1] élu à 10,8 min est de 10% d'IPA. Sur la base de cette mesure, le gradient de la première dimension est donc le suivant : un palier **isocratique avec 100% d'eau**, suivi **d'un gradient d'élution de 0 à 10% d'IPA avec une pente lente** (0,083% d'IPA/min), puis un **deuxième gradient rapide de 10 à 99% d'IPA** (2,225% d'IPA/min). Enfin, pour assurer l'élution complète de tous les analytes, une étape isocratique avec 99% d'IPA est ajoutée à la fin du gradient. Les phases mobiles (eau et IPA) contiennent 0,5% de FA.

### 3.2. Choix de la phase stationnaire en seconde dimension (D2)

Six phases stationnaires à base de silice ont été considérées pour la deuxième dimension. Toutes avaient les mêmes dimensions de 50 x 2,1 mm. Les BPC entre  $m/z$  50-1000 de l'échantillon A1 avec les six colonnes sont présentés sur la Figure 83. La comparaison directe des chromatogrammes en termes de fenêtre de rétention est possible car les mêmes conditions et la même géométrie de

colonne (longueur et diamètre interne) sont utilisées. **Deux critères principaux sont pris en compte pour sélectionner la phase stationnaire de deuxième dimension.** Le premier concerne **la forme des pics**. La colonne Zorbax Bonus RP montre une forte distorsion des pics et n'a donc pas été sélectionnée. Le deuxième critère est la **taille de la fenêtre d'élution pour les sucres d'intérêt** (mis en évidence avec des rectangles noirs sur la Figure 83). Bien que la colonne Acquity CSH Phenyl-Hexyl réponde aux deux critères, cette dernière possède des charges en surface qui induisent des interactions avec l'acide sulfurique. En effet, l'acide sulfurique est élué au milieu du gradient (entre 5,5 et 9,2 min). **La colonne Zorbax Eclipse Plus C18 a donc été préférée.**



**Figure 83 : BPC entre  $m/z$  50-1000 en ESI négatif obtenus lors de l'analyse de l'échantillon A1 avec six colonnes chromatographiques différentes (gradient Eau/MeOH + 0,01% FA). Les rectangles en pointillés noirs indiquent la zone d'élution des composés d'intérêt.**

### 3.3. Dimensionnement de la méthode LCxLC

Une fois la nature des phases stationnaires et mobiles sélectionnée dans les deux dimensions de séparation, l'étape suivante consiste au dimensionnement du système LCxLC c'est-à-dire principalement au choix des diamètres internes, longueurs et tailles des particules des colonnes ainsi que le volume des boucles et la fréquence d'échantillonnage. Le dimensionnement de l'analyse LCxLC en ligne doit être réalisé afin de maximiser la capacité de pics en un temps d'analyse donné.

Dans la littérature, plusieurs approches sont proposées et certaines équipes développent des modèles permettant d'optimiser les différents paramètres [100,232–235]. Aujourd'hui aucune interface commerciale n'est disponible pour parvenir à cette mise au point. Une approche assez pragmatique, utilisant les conclusions des différentes études décrites dans la littérature permet néanmoins de proposer des conditions satisfaisantes. Ainsi, les principes suivants ont été suivis pour réaliser le dimensionnement de l'analyse :

-(1) Le débit de l'analyse de première dimension doit permettre d'envisager un temps de remplissage de boucle d'échantillonnage entre la première et la seconde dimension compatible avec le temps

d'analyse en seconde dimension. Il est très fréquent d'utiliser un débit bien en dessous de l'optimum de la colonne.

-(2) Il est nécessaire que chaque pic de première dimension soit échantillonné au moins 3 à 4 fois vers la seconde dimension. Un sous-échantillonnage conduira à une perte en capacité de pics [236].

-(3) Une attention particulière doit être portée au volume injecté en seconde dimension. Des effets à l'injection peuvent être rencontrés lorsque le solvant de première dimension, qui devient le solvant d'injection de seconde dimension, présente une force éluante importante par rapport aux conditions initiales d'élution de seconde dimension.

-(4) Il est nécessaire de disposer d'une analyse très rapide en seconde dimension. Le meilleur compromis doit être trouvé pour maximiser la fréquence d'échantillonnage tout en conservant une durée d'analyse de seconde dimension suffisante. Un temps d'analyse trop long en seconde dimension diminuera nécessairement la fréquence d'échantillonnage, tandis qu'un temps d'analyse trop rapide diminuera la capacité de pics en seconde dimension. Il est très fréquent d'utiliser un débit se situant au-delà du débit optimum de la colonne.

### 3.3.1. Dimensionnement de D1

Compte tenu des principes listés ci-dessus, une colonne de 1 mm de diamètre interne est choisie en première dimension avec des particules de 5  $\mu\text{m}$  et une température de 60°C, ce qui permet d'envisager un débit relativement lent de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Une longueur de 100 mm est sélectionnée comme étant le bon compromis entre la capacité de pics en première dimension et le temps d'analyse.

### 3.3.2. Dimensionnement de l'interface : fréquence d'échantillonnage

Comme précisé ci-dessus, l'objectif est d'échantillonner suffisamment le flux sortant de première dimension, en maîtrisant les effets à l'injection en seconde dimension et en trouvant le bon compromis avec le temps d'analyse en seconde dimension.

Afin d'évaluer les effets à l'injection directement visibles sur la forme des pics de seconde dimension en fonction du volume et de la composition à l'injection, des mélanges de vanilline et de salicine ont été préparés dans 25, 50 et 90% d'IPA. La Figure 84 présente les EIC des deux étalons préparés dans 50% d'IPA pour des volumes d'injection de 1, 2, 5, 8, 10 et 20  $\mu\text{L}$ , ce qui permet de mimer des temps d'échantillonnage de 6, 12, 30, 48, 60 et 120 secondes respectivement lors d'une analyse LCxLC avec un débit de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  en première dimension. Pour la vanilline, une distorsion est visible à partir d'un volume d'injection de 8  $\mu\text{L}$ , alors qu'un dédoublement de pic apparaît pour la salicine avec un volume d'injection de 5  $\mu\text{L}$ . Ainsi, **la distorsion et le dédoublement de pic semblent dépendre fortement de l'analyte.**

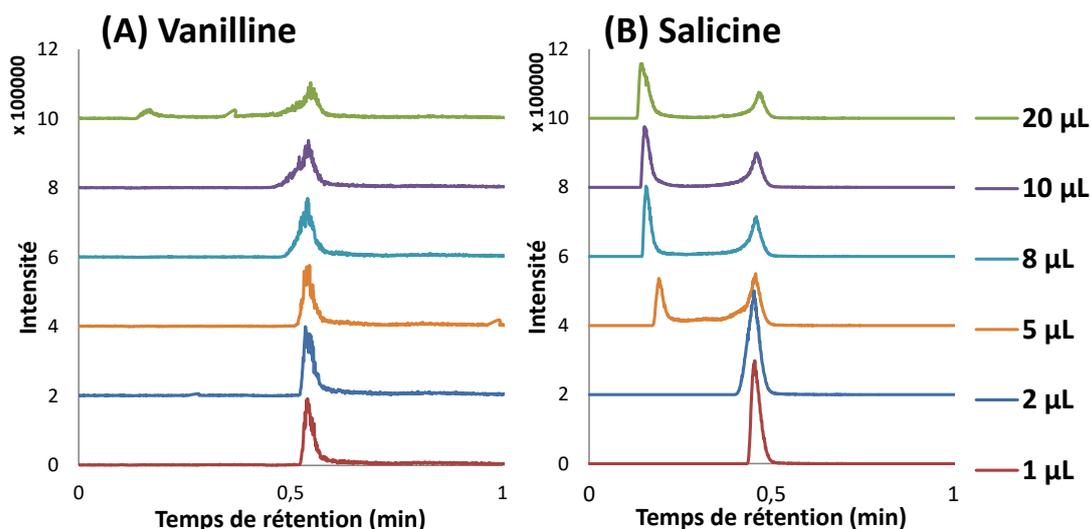


Figure 84 : EIC de (A) la vanilline et (B) la salicine préparées dans 50/50 Eau/IPA (v/v) pour différents volumes d'injection (conditions : gradient de 0 à 100% de MeOH en 1 min avec un débit de 1,25 mL/min)

Des expériences similaires ont été menées avec des étalons préparés dans 25 et 90% d'IPA. Le Tableau 26 résume les résultats : les cases rouges correspondent à un dédoublement de pic et les cases vertes à une forme de pic correcte ou avec une légère déformation. Comme déjà constaté, la salicine est plus sujette à de fortes distorsions que la vanilline. Par exemple, un dédoublement de pic apparaît déjà avec un volume d'injection de 2 µL avec 90% d'IPA alors que quatre fois ce volume est nécessaire pour observer ce phénomène avec la vanilline. Les chromatogrammes présentés précédemment montrent que le dernier sucre d'intérêt est élué avec environ 10% d'IPA. Ainsi, en limitant le volume d'injection, aucun phénomène de dédoublement de pic ne devrait être observé.

Tableau 26 : Évaluation des effets à l'injection : occurrence du phénomène de dédoublement de pic (indiqué en rouge) selon le volume d'injection ( $V_{inj}$ ) et le pourcentage d'IPA pour (A) la vanilline et (B) la salicine

(A) Vanilline				(B) Salicine			
$V_{inj}$ (µL)	Mélange préparé dans X% IPA			$V_{inj}$ (µL)	Mélange préparé dans X% IPA		
	25%	50%	90%		25%	50%	90%
1	Green	Green	Green	1	Green	Green	Green
2	Green	Green	Green	2	Green	Green	Red
5	Green	Green	Green	5	Green	Red	Red
8	Green	Green	Red	8	Red	Red	Red
10	Green	Green	Red	10	Red	Red	Red
20	Green	Red	Red	20	Red	Red	Red

Afin de diminuer les effets à l'injection plusieurs gradients de seconde dimension ont été comparés, commençant par 0, 20 et 40% de MeOH et finissant à 100% de MeOH (Figure 85). L'idée était d'augmenter la force éluante du solvant de seconde dimension pour se rapprocher de celle provenant de la première dimension. Cependant, la tendance inverse a été étonnamment observée pour les deux étalons. Ainsi, **100% d'eau a été sélectionné pour la composition initiale du gradient en seconde dimension.**

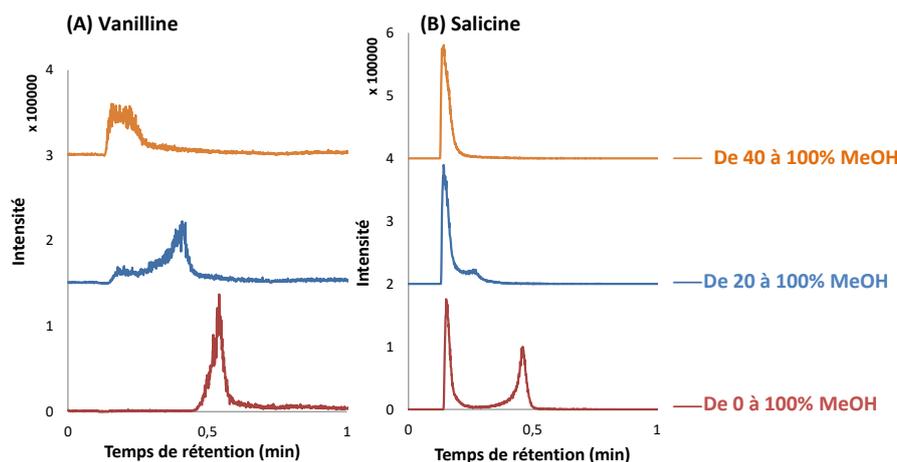


Figure 85 : EIC de (A) la vanilline et (B) la salicine préparées dans 50/50 Eau/IPA (v/v) et injectées en seconde dimension avec plusieurs gradients Eau/MeOH (conditions : gradient en 1 min avec un débit de 1,25 mL/min,  $V_{inj}$  10  $\mu$ L)

Lors de l'étude présentée ci-dessus, l'injection a été réalisée via le passeur automatique pour mimer ce qu'il pourrait se passer en seconde dimension de séparation. Cependant, au cours d'une analyse bidimensionnelle, les fractions sont collectées dans **des boucles d'échantillonnage**. Afin d'éviter la perte d'échantillon, ces boucles sont remplies à 80% maximum par le flux provenant de la première dimension. Le volume restant de la boucle se trouve rempli par la phase mobile de seconde dimension aux conditions de départ du gradient, ici de l'eau. Cette présence d'eau peut jouer un rôle sur les phénomènes subis à l'injection. Ce point a été étudié **en comparant une injection de 10  $\mu$ L via le passeur automatique ou via des boucles d'échantillonnage de 20  $\mu$ L**. Les boucles d'échantillonnage ont donc été remplies à 50% seulement, le reste étant de l'eau. Ces expériences ont été menées avec trois compositions d'IPA à l'injection : 25, 50 et 90% (Figure 86). Avec 25% d'IPA, les largeurs de pic sont semblables pour les deux types d'injection. Cependant, **à partir de 50% d'IPA dans le solvant d'injection, la largeur du pic obtenue est nettement moins importante avec l'injection au moyen de boucles d'échantillonnage**. La présence d'eau au sein de la boucle permet très certainement une diffusion du train d'échantillon dans l'eau. L'injection de l'échantillon dans une quantité d'eau pourrait permettre de favoriser la préconcentration en tête de colonne et ainsi améliorer la forme des pics. Enfin, des boucles d'échantillonnage de 40  $\mu$ L ont également été évaluées. Cependant, l'augmentation du volume des boucles n'a pas accentué le phénomène du fait d'une cinétique lente de la diffusion du train d'échantillon dans l'eau au sein de la boucle. À l'inverse, l'augmentation du volume des boucles entraîne une augmentation du volume d'injection ce qui a eu pour effet un élargissement des pics.

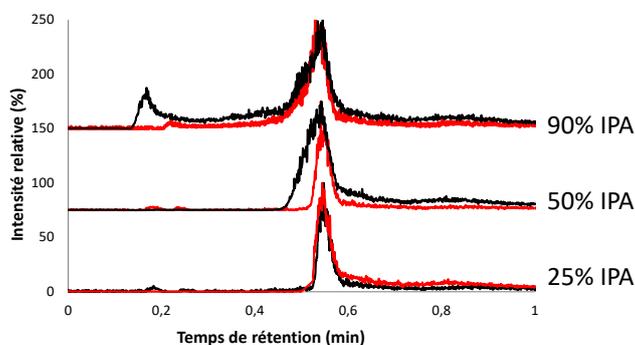


Figure 86 : EIC de la vanilline en ESI négatif avec trois compositions de solvant (25, 50 et 90% d'IPA) injectées via le passeur automatique (noir) ou des boucles d'échantillonnage de 20  $\mu$ L (rouge) (conditions : gradient de 0 à 100% MeOH en 1 min avec un débit de 1,25 mL/min,  $V_{inj}$  10  $\mu$ L)

L'étude sur les effets à l'injection permet d'apporter un certain nombre d'éléments pour se placer dans les meilleures conditions. Ainsi, il apparaît judicieux d'injecter en seconde dimension, un volume situé entre 5 et 10  $\mu\text{L}$  compte-tenu du fait que les sucres d'intérêt sont élués avec des teneurs en IPA maximales de 10% et que la présence d'eau dans les boucles d'échantillonnage joue un rôle positif sur la forme des pics.

Des boucles de 20  $\mu\text{L}$  seront donc utilisées et remplies à 40% afin d'injecter en seconde dimension un volume de 8  $\mu\text{L}$ . Si le débit de première dimension est fixé à 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , la fréquence d'échantillonnage ou temps de modulation sera donc de 48 s.

Il faut également vérifier que la fréquence d'échantillonnage fixée à 48 s permet bien 3 à 4 modulations par pic de première dimension. La Figure 87 présente une partie du BPC issu de l'analyse de l'échantillon A1 dans les conditions optimisées de première dimension. Les largeurs des pics chromatographiques varient de 2,5 à 3,5 min selon l'abondance des composés, ce qui permet entre 3 et 5 modulations par pics.

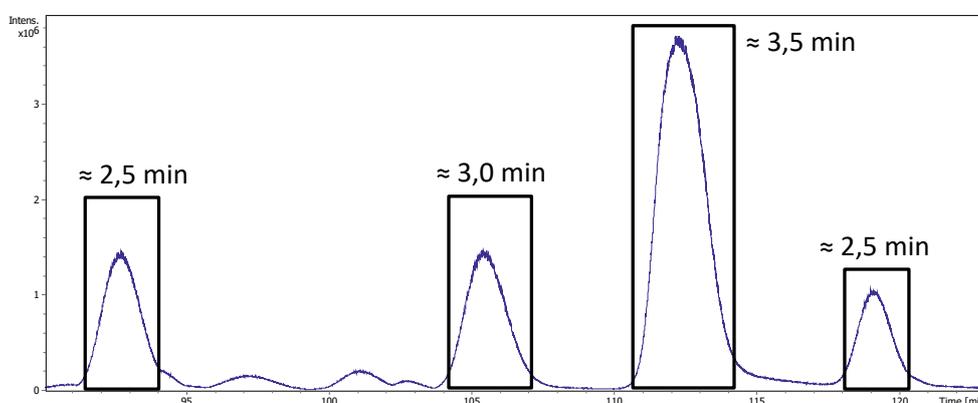


Figure 87 : BPC de  $m/z$  50 à 1000 de l'échantillon A1 analysé dans les conditions optimisées de première dimension

### 3.3.3. Dimensionnement de D2

En seconde dimension, en vue d'une analyse très rapide, une colonne de 2,1 mm de diamètre interne est sélectionnée avec une longueur de 5 cm et des particules de 1,8  $\mu\text{m}$  ; une température de 50°C et un débit de 2 mL/min sont appliqués. Il s'agit du débit maximal autorisé pour ne pas atteindre les limites de pression de l'appareillage. La température de colonne choisie permet également de favoriser une analyse rapide tout en limitant la pression générée. L'acétonitrile a également été préféré au méthanol afin de limiter la pression.

La fréquence d'échantillonnage fixe la durée de l'analyse en seconde dimension à 48 s. En considérant le temps d'équilibration comme étant égal à 4 fois le volume mort et un temps de délai, et en prenant en considération la géométrie de la colonne, 18 s sont nécessaires pour l'équilibration. Il restera donc 30 s pour réaliser le gradient d'éluion de la seconde dimension. À noter que ces conditions nous ont permis d'obtenir des temps de rétention répétables.

L'EIC de la vanilline dans les conditions optimisées de seconde dimension est présenté Figure 88. La largeur de pic mesurée à mi-hauteur en ESI négatif est de 0,023 min, ce qui équivaut à une largeur de pic d'environ 2,3 s à 13,5% de hauteur. Pour décrire correctement les pics de seconde dimension, **la fréquence d'acquisition du TOF a été fixée à 20 Hz** (les autres conditions HRMS sont détaillées dans le Chapitre 2).

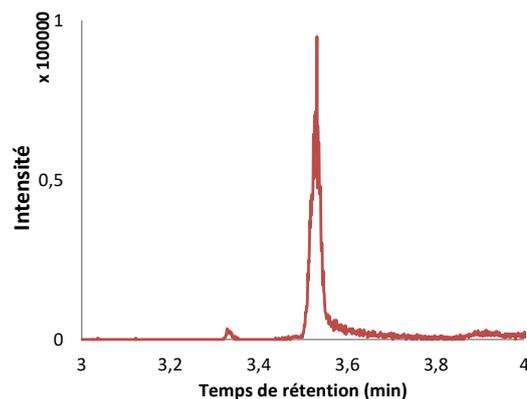


Figure 88 : EIC de la vanilline en ESI négatif dans les conditions optimisées de la seconde dimension (solvant d'injection : 50% IPA)

### 3.4. Application de la méthode optimisée

Les conditions optimisées de la méthode chromatographique bidimensionnelle sont résumées dans le Tableau 27. Le débit de solvant de première dimension a été augmenté pendant l'étape isocratique à 99% d'IPA car aucun sucre d'intérêt n'y est élué.

Tableau 27 : Résumé des conditions chromatographiques bidimensionnelles

	D1	D2
Phase stationnaire	Hypercarb	Eclipse Plus C18
Géométrie des colonnes	100 × 1 mm, 5 µm	50 × 2,1 mm, 1,8 µm
Température	60°C	50°C
Phases mobiles	(A) Eau + 0,5% FA (B) IPA + 0,5% FA	(A) Eau + 0,01% FA (B) ACN + 0,01% FA
Gradients	100% de (A), 0-30 min* 0 à 10% de (B), 30-180 min* 10 à 99% de (B), 180-220 min* 99% (B), 220-270 min**	0 à 70% de (B) en 0,5 min
Débits	*10 µL/min **25 µL/min	2 mL/min
Temps de modulation		0,8 min
Volume d'injection	2 µL	8 µL
Boucles d'échantillonnage		20 µL

La méthode RPLC×RPLC/HRMS a été appliquée à l'échantillon A1. Le chromatogramme 2D obtenu en ESI négatif est présenté Figure 89. Les lignes en pointillés représentent la fenêtre d'éluion des sucres d'intérêt. Le dédoublement des pics dû aux effets à l'injection n'a pas été observé dans la fenêtre d'éluion et n'est apparu qu'après 220 min. Chaque pic dans la fenêtre de rétention a été labellisé (Figure S5) et l'ion majoritaire sous chaque pic chromatographique a été identifié (Tableau S3). Au total, 69 pics chromatographiques ont été détectés dans la zone d'éluion d'intérêt. De nombreuses co-élutions ont pu être levées grâce au couplage de ces deux dimensions de séparation.

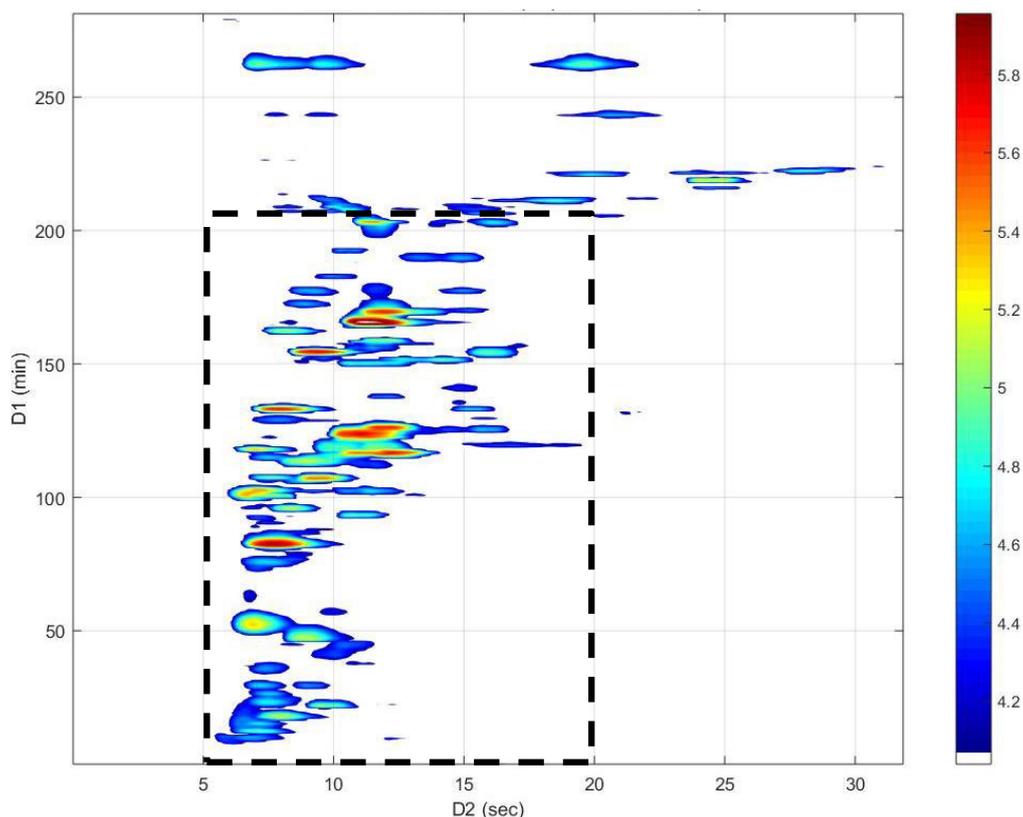


Figure 89 : Chromatogramme 2D obtenu lors de l'analyse RPLC×RPLC/HRMS en ESI négatif de l'échantillon A1. Le rectangle en pointillés représente la fenêtre d'éluion des composés d'intérêt

Afin d'estimer l'occupation de l'espace chromatographique ( $\gamma$ ), le rapport des aires de rétention effective et théorique a été calculé selon une méthodologie proposée dans la littérature [237]. La Figure 90 illustre cette méthodologie. Un rectangle qui englobe l'ensemble des pics chromatographiques est tracé. L'aire de ce dernier correspond à l'aire maximale potentiellement occupée. Cependant, toute la zone n'étant pas occupée, l'aire des triangles (hachurés sur la Figure 90) est soustraite à l'aire du rectangle afin d'estimer l'aire effective occupée. Le ratio entre l'aire effective et l'aire théorique permet de mesurer le pourcentage d'occupation de l'espace. **L'occupation de l'espace de la méthode développée ici a été mesurée à 75%, ce qui reflète une bonne orthogonalité entre les deux dimensions.** Cette mesure de l'occupation de l'espace sera utilisée dans le Chapitre 7 pour calculer la capacité de pics de la méthode.

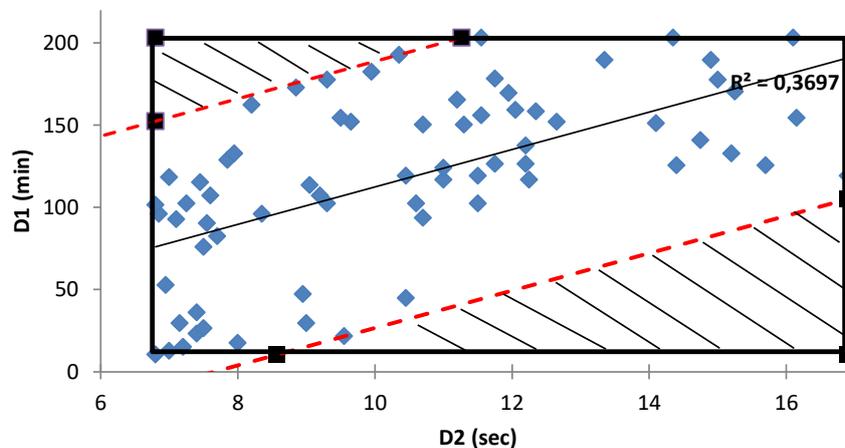


Figure 90 : Méthodologie de calcul de l'occupation de l'espace chromatographique

#### 4. Gain apporté par le couplage RPLC×RPLC/HRMS en comparaison à la RPLC/HRMS

L'ajout d'une dimension de séparation a permis de détecter 69 pics chromatographiques relativement bien séparés en RPLC×RPLC dans la zone d'intérêt, tandis que les nombreuses co-élutions en RPLC permettaient seulement de distinguer une vingtaine de pics (5 premières minutes d'une analyse RPLC). La Figure 91 représente les EIC de six sucres du Tableau 25 obtenus avec (A) la RPLC/HRMS et (B) la RPLC×RPLC/HRMS. Bien que tous les composés puissent être distingués avec une seule dimension séparative grâce à la HRMS, il n'est toutefois pas toujours évident de distinguer et déterminer le sommet des pics chromatographiques à cause des co-élutions pour un même rapport  $m/z$ . Par exemple, l'ion  $m/z$  381 présente un EIC avec de nombreux pics sans retour à la ligne de base entre 1,0 et 2,5 min en RPLC/HRMS. Classiquement, les ions ayant le même temps de rétention sont considérés comme provenant du même composé ionisé sous plusieurs formes (adduits, adduits ion-molécule, fragments, etc.). Dans le cas de la RPLC/HRMS, le trop grand nombre de co-élutions pendant le palier isocratique permet difficilement d'aborder le traitement des données sous cette approche. Par exemple, à 1,90 min, il semble que l'on se trouve au sommet d'un pic pour les EIC  $m/z$  513, 381 et 321. On peut alors supposer que l'ion  $m/z$  513 se fragmente pour former les ions  $m/z$  381 et 321. Lorsque l'on soumet l'ion  $m/z$  513 à la MS/MS, des fragments  $m/z$  381 et 321 sont en effet observés, toutefois la possibilité d'un second composé formant également ces ions ne peut pas être exclue au vu de l'allure des chromatogrammes. Il est donc crucial d'améliorer la séparation des sucres via la RPLC×RPLC/HRMS pour conforter ces hypothèses. En RPLC×RPLC/HRMS, les EIC sont représentés par des cartographies avec le temps de rétention de D1 en abscisse et le temps de rétention de D2 en ordonnée. Sur ces cartographies, l'EIC de l'ion  $m/z$  513 ne possède pas de pic chromatographique en commun avec les EIC des ions  $m/z$  381 et 321, ce qui indique qu'en RPLC×RPLC/HRMS, l'ion  $m/z$  513 n'est pas fragmenté en  $m/z$  381 et 321. De plus, un nombre de pics chromatographiques plus restreint pour l'ion  $m/z$  381, ainsi que pour  $m/z$  321, sont obtenus en RPLC×RPLC/HRMS en comparaison à la RPLC/HRMS. Ces deux observations laissent à penser qu'il est fort probable que le débit et la composition de phase mobile associés aux conditions d'ionisation utilisées en RPLC/HRMS tendent à former davantage de fragments qu'en RPLC×RPLC/HRMS. Par ailleurs, l'utilisation **de deux temps de rétention en RPLC×RPLC/HRMS comme filtre** permet de plus facilement mettre en évidence la fragmentation (*i.e.* en source) d'un ion. Sur la Figure 91(B), un rectangle noir a été tracé sur chaque EIC avec des coordonnées similaires. Il apparaît qu'à ces temps de rétention, seulement deux ions majoritaires éluent :  $m/z$  381 et  $m/z$  321. Ces deux ions correspondent très probablement à un seul composé, l'ion  $m/z$  321 provenant de la fragmentation de l'ion  $m/z$  381 (une perte de 60 u est classique pour les sucres).

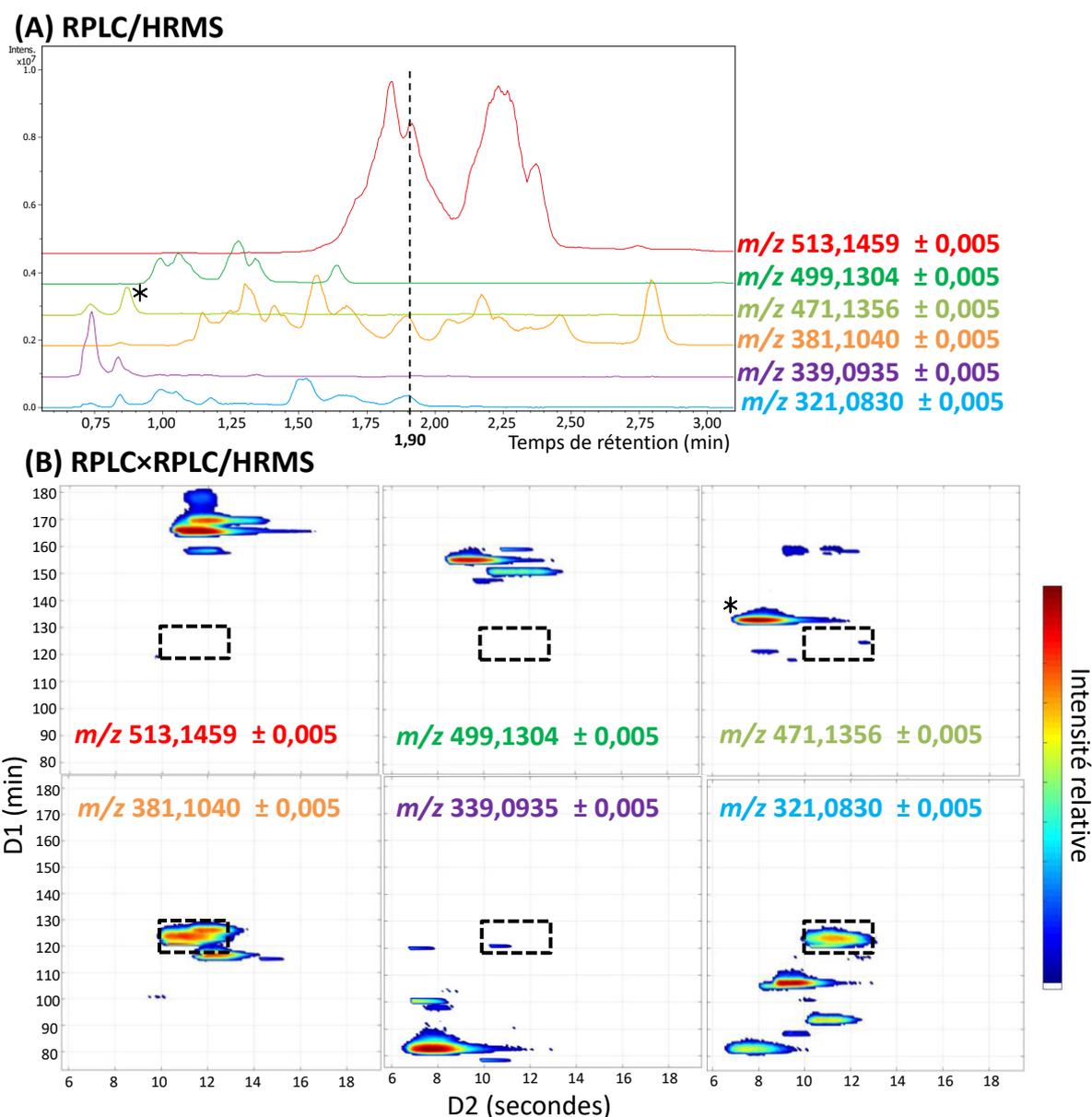


Figure 91 : EIC de six ions listés dans le Tableau 25 obtenus avec le couplage (A) RPLC/HRMS et (B) RPLC×RPLC/HRMS

Enfin, la diminution du nombre de co-élutions grâce aux deux dimensions séparatives en amont de la HRMS a permis d'obtenir **des spectres de masse plus faciles à interpréter et exploiter**. À titre d'exemple, la Figure 92 montre les spectres de masse du composé  $m/z$  471 mis en évidence par un astérisque sur les EIC pour les deux méthodes (Figure 91). Deux ions principaux  $[M-H]^-$  et  $[2M-H]^-$  ont été observés avec la RPLC×RPLC/HRMS, tandis qu'une multitude d'ions sont présents avec la méthode RPLC/HRMS en raison des co-élutions avec d'autres composés. L'annotation d'un tel spectre de masse est donc largement plus complexe et sujette à de fausses identifications en comparaison à celui obtenu avec la chromatographie bidimensionnelle.

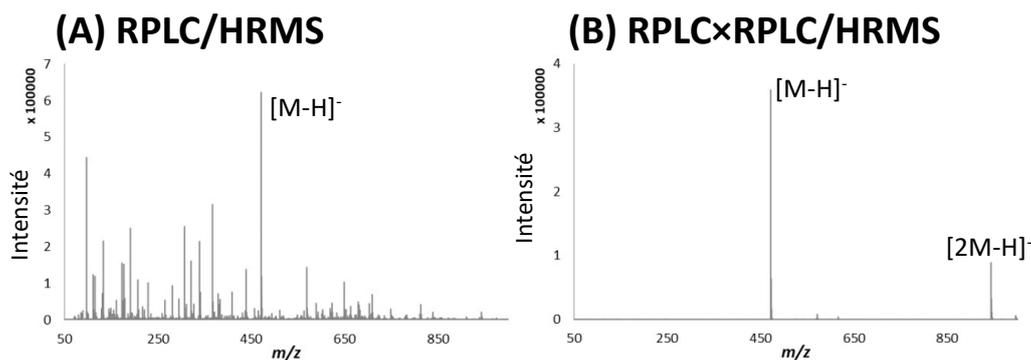


Figure 92 : Spectres de masse obtenus lors de l'éluion de l'ion  $m/z$  471 en (A) RPLC/HRMS à 0,85 min et (B) en RPLC×RPLC/HRMS à 133 min en D1 et 8 s en D2

## 5. Intérêt de la mobilité ionique en tant que 3ème ou 4ème dimension

La mobilité ionique a connu un regain d'intérêt depuis la dernière décennie avec le développement d'appareils plus puissants. **Le timsTOF est capable d'atteindre une résolution de 200 lorsqu'une analyse ciblée et une optimisation spécifique sont réalisées.** Son fonctionnement est détaillé dans le Chapitre 2. Lors de ces travaux, afin d'avoir accès à la mobilité de tous les analytes d'intérêt présents dans l'échantillon, **une large gamme de  $1/K_0$  ( $V.s/cm^2$ ) a été balayée avec un temps de rampe de 100 ms, la résolution s'en trouve donc amoindrie. Une résolution moyenne de 50 a été mesurée sur les mobilogrammes des sucres du Tableau 25.**

L'objectif de cette partie de chapitre est d'évaluer **la mobilité ionique en tant que dimension de séparation au sein du couplage RPLC/IMS/HRMS** et de comparer ce couplage à la RPLC×RPLC/HRMS développée. **L'intérêt de l'IMS en tant que 4<sup>ème</sup> dimension dans le couplage RPLC×RPLC/IMS/HRMS** est également discuté dans cette partie.

### 5.1. Couplage RPLC/IMS/HRMS et comparaison à la RPLC×RPLC/HRMS

De la même façon que pour le couplage de la RPLC×RPLC/HRMS, il est possible de réaliser **une cartographie représentant le temps de rétention en RPLC en fonction de  $1/K_0$**  (Figure 93). **Plus de 300 pics peuvent être dénombrés, occupant l'ensemble de l'espace chromatographique.** Ce nombre de pics inclut toutes les familles de composés pouvant être détectées en ESI négatif (sucres, composés phénoliques, complexes lignine-carbohydrate). Dans la zone correspondant à la fenêtre d'éluion des sucres d'intérêt (entre 0 et 5 min en RPLC), **on compte une soixantaine de pics**, pour certains encore co-élusés avec leurs voisins. **Une différence fondamentale entre les cartographies RPLC×RPLC et RPLC/IMS est qu'un point représente une molécule en RPLC×RPLC, tandis qu'un point correspond à un ion en RPLC/IMS.** Une molécule pouvant former plusieurs ions (adduits, fragments), il est donc logique d'obtenir une cartographie RPLC/IMS plus fournie.

**Les principaux avantages de la RPLC/IMS/HRMS par rapport à la RPLC×RPLC/HRMS sont :**

- (1) **un temps d'analyse plus rapide,**
- (2) **aucune déformation de pic** liée à des incompatibilités de solvants permettant ainsi d'obtenir des données sur l'ensemble des classes chimiques (sucres, phénols et complexes lignine-carbohydrate),
- (3) **une échelle de temps idéale permettant un bon échantillonnage des pics d'une dimension à une autre.**

Cependant, la RPLC/IMS/HRMS subit les effets de matrice au sein de la source d'ionisation de la même manière qu'en RPLC/HRMS. Par ailleurs, la compréhension des données peut s'avérer plus complexe lorsqu'une molécule forme plusieurs ions, en se fragmentant par exemple. Ce dernier point sera discuté dans la suite de cette partie.

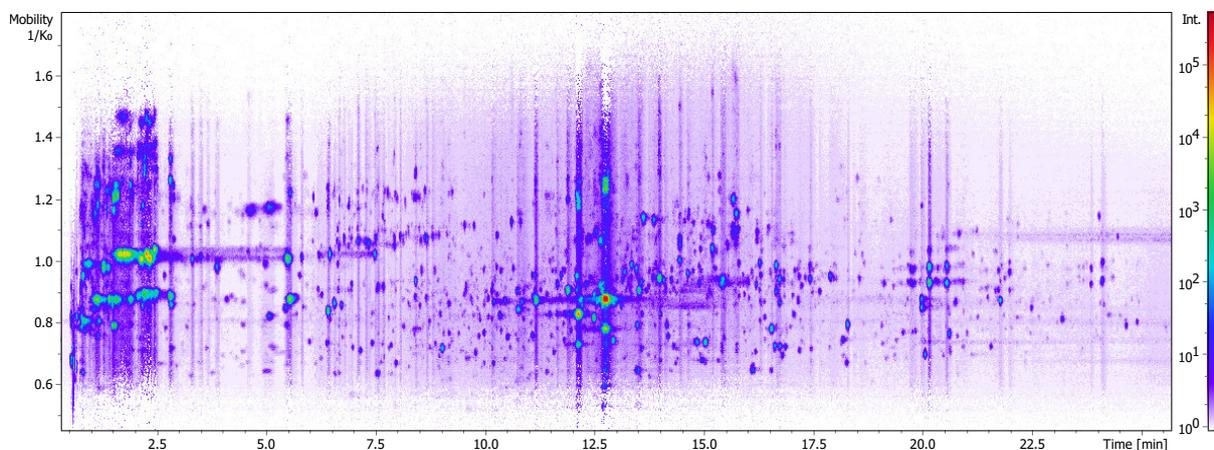


Figure 93 : Cartographie pour l'échantillon A1 obtenue lors du couplage RPLC/IMS/HRMS représentant l'inverse de la mobilité ionique ( $1/K_0$ ) en fonction du temps de rétention

En RPLC×RPLC, deux temps de rétention sont utilisés comme filtres. En RPLC/IMS/HRMS, il est possible de sélectionner un temps de rétention et un pic sur le mobilogramme afin d'obtenir un spectre de masse plus spécifique. La Figure 94 représente le spectre de masse obtenu à un temps de rétention de 0,90 min et un  $1/K_0$  de  $0,950 \text{ V.s/cm}^2$ . Un seul pic est présent sur ce spectre de masse contrairement à ce qui avait été présenté sur la Figure 91(A) pour le couplage RPLC/HRMS. Ainsi, comme peut le permettre l'ajout d'une dimension de séparation, la mobilité ionique peut permettre de simplifier les spectres de masse en ajoutant un filtre supplémentaire.

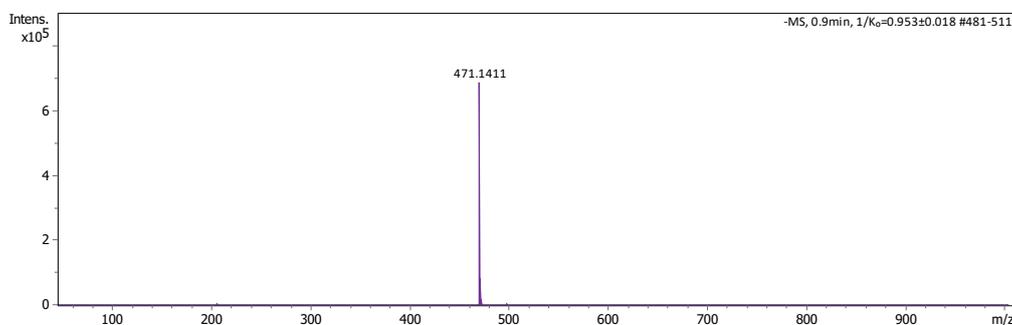


Figure 94 : Spectre de masse obtenu lors du couplage RPLC/IMS/HRMS à un temps de rétention de 0,9 min et un  $1/K_0$  de  $0,95 \pm 0,018 \text{ V.s/cm}^2$

Il est également possible de réaliser des cartographies spécifiques d'un rapport  $m/z$  (EIM : *Extracted Ion Mobilogram*) comme cela a été réalisé pour la RPLC×RPLC/HRMS. Ces cartographies ont été réalisées pour six sucres du Tableau 25 (Figure 95).

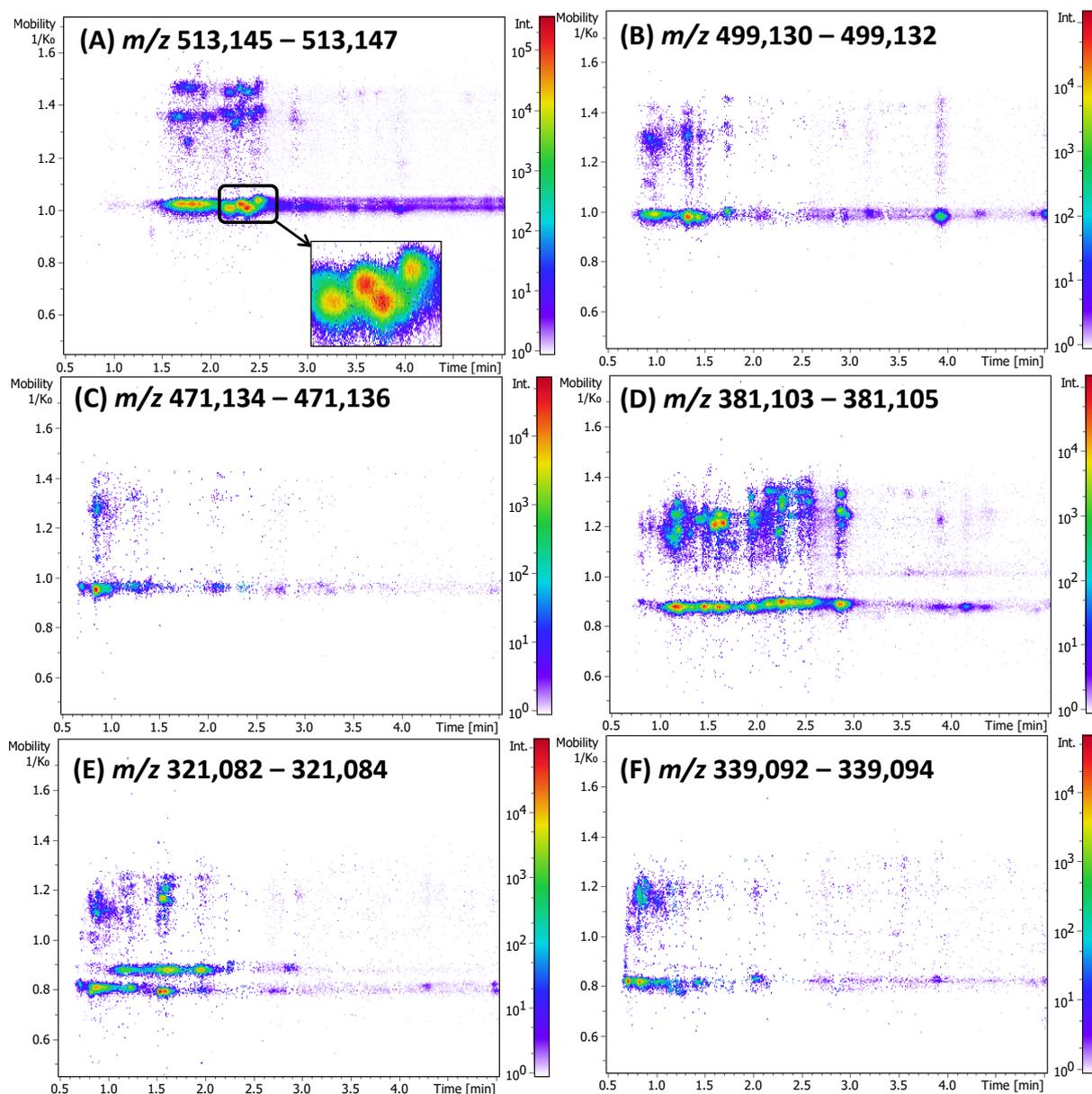


Figure 95 : Cartographies représentant  $1/K_0$  en fonction du temps de rétention pour 6 ions du Tableau 25 détectés lors du couplage RPLC/IMS/HRMS

Sur la Figure 95, on observe que la mobilité ionique permet de séparer des ions ayant le même rapport  $m/z$  et le même temps de rétention. Il peut s'agir de **la séparation d'isomères** comme le montre l'agrandissement sur la Figure 95(A) pour l'ion  $m/z$  513. En effet, en RPLC/HRMS, seulement deux pics pouvaient être distingués sur le BPC de l'ion  $m/z$  513 entre 2,1 et 2,6 min (Figure 91(A)) ; tandis que quatre pics sont séparés avec l'ajout de la mobilité.

En revanche, **la séparation d'ions ayant le même rapport  $m/z$  et le même temps de rétention ne correspond pas toujours à une séparation d'isomères**. En effet, un ion avec un rapport  $m/z$  donné peut être formé lors de l'ionisation d'une molécule sous forme  $[M-H]^-$  en ESI négatif, mais aussi lors de la fragmentation d'un composé avec un  $m/z$  plus élevé. Si **cette fragmentation a lieu en amont de la séparation en mobilité ionique, dans la source d'ionisation par exemple, alors l'ion pseudo-moléculaire et ses fragments auront des mobilités différentes**. En effet, ces derniers auront été séparés dans la cellule de mobilité ionique. En revanche, dans le cas où la fragmentation a lieu **après la cellule de mobilité** (lors du transfert des ions entre l'IMS et le TOF), **alors les fragments produits**

ne seront pas séparés par la cellule IMS et donc l'ion pseudo-moléculaire et ses fragments auront la même valeur de mobilité. La Figure 96 schématise les deux cas de fragmentation. Ainsi, lorsqu'on extrait un rapport  $m/z$  donné, en fonction de sa provenance, plusieurs pics pourront être observés sur le mobilogramme.

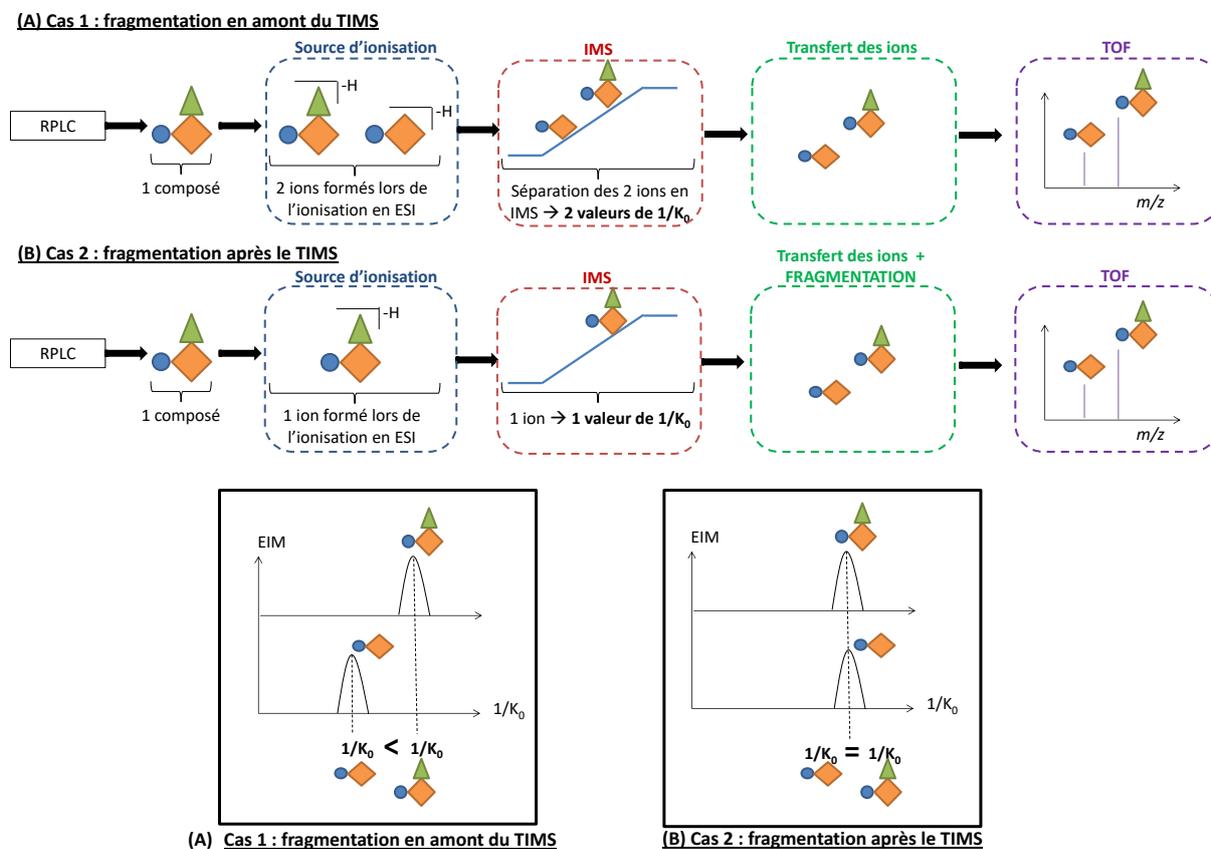
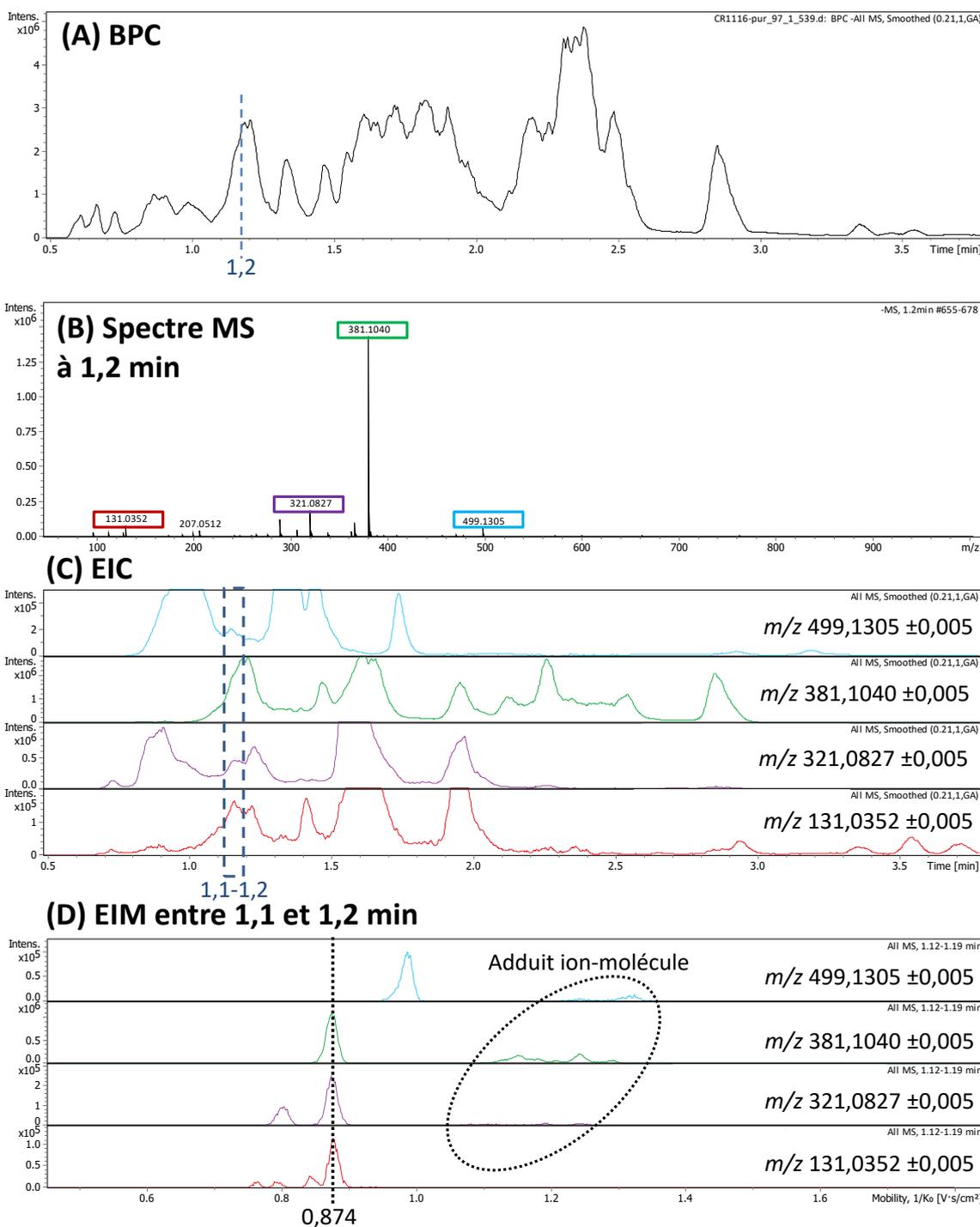


Figure 96 : Schéma représentant la fragmentation qui a lieu (A) en amont de l'IMS et (B) après l'IMS

Prenons l'exemple du pic chromatographique éluant à 1,2 min indiqué sur le BPC de la Figure 97. La Figure 97(B) présente le spectre de masse sous le pic chromatographique. Ensuite, pour les quatre ions encadrés, les EIC sont extraits Figure 97(C). Comme cela a été mentionné lors de la comparaison de la RPLC/HRMS avec la RPLC×RPLC/HRMS, il est relativement difficile de définir des pics chromatographiques au vu des co-élutions. Il semble néanmoins que les quatre ions aient un pic en commun sur leur EIC entre 1,1 et 1,2 min. Les EIM des quatre ions sont alors tracés (Figure 97(D)). L'ion  $m/z$  499 est le seul avec un  $1/K_0$  de 0,988 V.s/cm<sup>2</sup>. Tandis que les ions  $m/z$  381, 321 et 131 ont un pic en commun sur leur mobilogramme avec un  $1/K_0$  de 0,874 V.s/cm<sup>2</sup>. Cette valeur correspond en réalité uniquement à la mobilité de l'ion  $m/z$  381. L'ion  $m/z$  321 a été pour partie formé à partir de la fragmentation de l'ion  $m/z$  381 après la cellule de mobilité ionique (cas 2 sur la Figure 96), ce qui explique le pic commun sur le mobilogramme. Le deuxième pic sur le mobilogramme du  $m/z$  321 à 0,805 V.s/cm<sup>2</sup> peut quant à lui correspondre soit à de la fragmentation en source de l'ion  $m/z$  381 (cas 1 sur la Figure 96), ou alors à l'ion pseudo-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> du composé C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>. Ainsi, les deux pics sur le mobilogramme ne proviennent pas de la séparation d'isomères mais bien de la différence de provenance/formation de l'ion. La même observation peut être faite sur l'EIM de  $m/z$  131.



**Figure 97 : (A) BPC de l'échantillon A1 obtenu lors du couplage RPLC/IMS/HRMS en ESI négatif, (B) spectre de masse du pic chromatographique à 1,2 min, (C) EIC et (D) EIM des quatre ions**

Enfin, un second groupe de pics sur les mobilogrammes est observé avec des valeurs de  $1/K_0$  largement supérieures. Ces pics doivent probablement correspondre à des fragments issus des adduits ion-molécule  $[2M-H]^-$  qui auraient été fragmentés lors du transfert des ions entre l'IMS et le TOF. Si l'on extrait le mobilogramme de l'adduit ion-molécule correspondant à l'ion  $m/z$  381 ( $m/z$  763), on obtient un  $1/K_0$  de 1,243 V.s/cm $^2$  pour le pic le plus intense (Figure 98), ce qui correspond à une CCS de 253,4 Å $^2$  ; tandis que l'ion  $m/z$  381 a une CCS évaluée à 181,3 Å $^2$ .

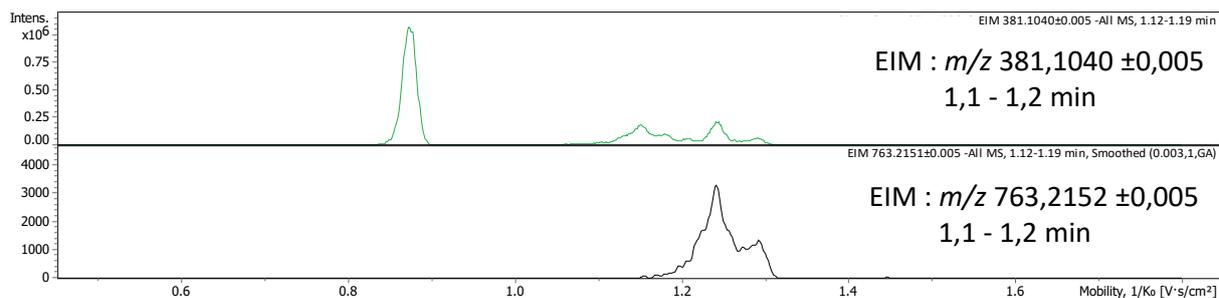


Figure 98 : EIM des ions  $m/z$  381 et 763 éluant entre 1,1 et 1,2 min en RPLC

Les exemples présentés précédemment mettent en évidence l'importance d'identifier et rassembler les ions fragments avec l'ion précurseur. L'utilisation de la RPLC/IMS/HRMS permet d'identifier les fragments formés lors du transfert des ions après l'IMS (précurseurs et fragments avec un  $1/K_0$  identique). Cependant les co-élutions ne permettent pas de distinguer aisément un fragment formé en source d'un ion pseudo-moléculaire. C'est pourquoi l'IMS est souvent associée à des expériences de MS/MS. La fragmentation des ions  $m/z$  499, 381 et 321 éluant entre 1,1 et 1,2 min est présentée sur la Figure 99. Il apparaît que la fragmentation de l'ion  $m/z$  499 ne forme pas les ions  $m/z$  381 et 321, en revanche l'ion  $m/z$  131 est formé. La fragmentation de l'ion  $m/z$  381 permet de former les fragments  $m/z$  321 et 131. Enfin la fragmentation de l'ion  $m/z$  321 forme une quantité moindre de l'ion  $m/z$  131 dans nos conditions expérimentales. On peut donc conclure à partir de ces expériences MS/MS, que l'ion  $m/z$  131 peut provenir de la fragmentation des ions  $m/z$  499, 381 et 321. L'ion  $m/z$  321 provient de la fragmentation de l'ion  $m/z$  381, ce qui est également confirmé par sa valeur de  $1/K_0$  identique à son précurseur. Il peut également provenir de la fragmentation en source de l'ion  $m/z$  381 ou de l'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  du composé  $C_{10}H_{18}O_{10}$ . La RPLC×RPLC va être nécessaire afin de déterminer s'il s'agit de fragmentation en source ou d'un ion pseudo-moléculaire. Enfin, l'ion  $m/z$  131 peut avoir des origines multiples, dont la fragmentation des ions  $m/z$  499, 381 et 321.

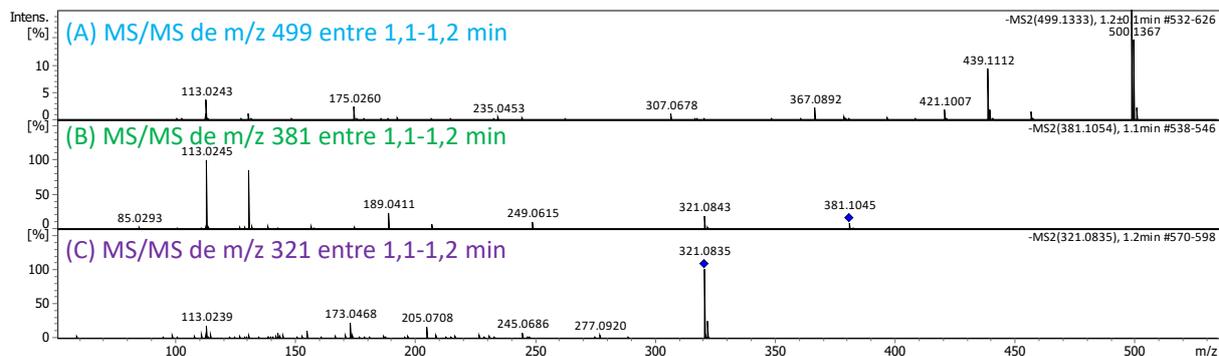


Figure 99 : Spectres MS/MS des ions (A)  $m/z$  499, (B)  $m/z$  381 et (C)  $m/z$  321 éluant entre 1,1 et 1,2 min en RPLC

Plus classiquement on représente les données obtenues en mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse sous forme de cartographie avec la mobilité en fonction du rapport  $m/z$ . La Figure 100 illustre ce type de représentation pour l'ensemble des composés éluant de 0 à 5 min en RPLC. On distingue deux zones : la première pour les ions  $[M-H]^-$  et une seconde que nous avons supposé être celle des adduits ion-molécule. De plus, la fragmentation qui a lieu après la mobilité ionique est indiquée par des flèches horizontales allant de la droite vers la gauche. Si l'on considère l'ensemble des ions, l'occupation de l'espace de séparation entre la mobilité ionique et la HRMS semble relativement importante (estimée à 70%). En revanche, en considérant uniquement les ions  $[M-H]^-$ , l'orthogonalité entre l'IMS et la HRMS amène à une occupation moindre de l'espace.

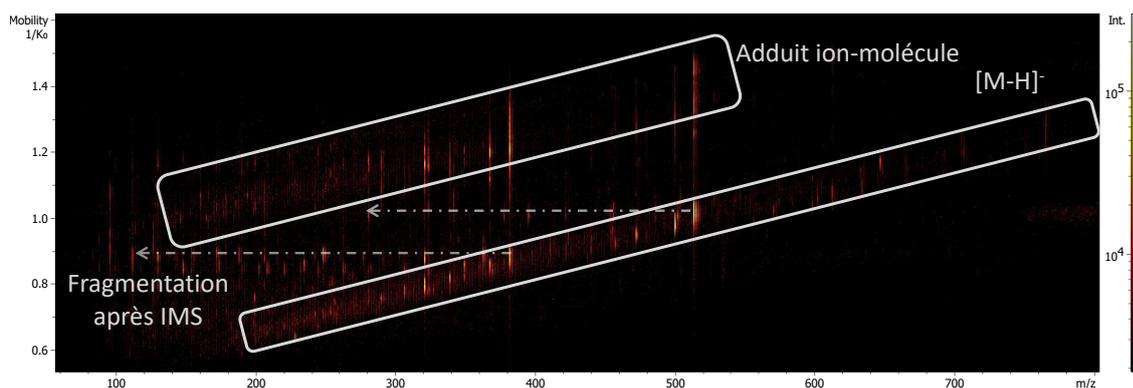


Figure 100 : Cartographie représentant  $1/K_0$  en fonction du rapport  $m/z$  pour les composés éluant entre 0 et 5 min en RPLC

Le Tableau 28 reprend les avantages et inconvénients des couplages RPLC×RPLC/HRMS et RPLC/IMS/HRMS discutés dans ce chapitre.

Tableau 28 : Avantages et inconvénients des méthodes RPLC/IMS/HRMS et RPLC×RPLC/HRMS

	RPLC/IMS/HRMS	RPLC×RPLC/HRMS
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spectres propres grâce aux filtres <math>t_R</math> et <math>1/K_0</math></li> <li>• Temps d'analyse</li> <li>• Echelle des temps adaptée entre les dimensions</li> <li>• Séparation de l'ensemble des composés (sucres, phénols, complexes lignine-carbohydrate)</li> <li>• Calcul des CCS possible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spectres propres grâce aux filtres <math>t_{R, D1}</math> et <math>t_{R, D2}</math></li> <li>• Effet de matrice limité</li> <li>• Interprétation des données plus directe</li> <li>• Bonne orthogonalité entre toutes les dimensions</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Effet de matrice similaire à la RPLC/HRMS</li> <li>▪ Interprétation des données parfois complexe</li> <li>▪ Faible orthogonalité entre IMS et HRMS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Temps d'analyse long</li> <li>▪ Parfois déformation des pics à cause des incompatibilités de solvants</li> </ul>

## 5.2. Pour aller plus loin, la RPLC×RPLC/IMS/HRMS

Afin de cumuler les avantages de la RPLC/IMS/HRMS et de la RPLC×RPLC/HRMS, le couplage à quatre dimensions RPLC×RPLC/IMS/HRMS a été réalisé. La RPLC×RPLC a pour objectif de séparer les composés d'intérêt en permettant notamment de distinguer les fragments des ions pseudo-moléculaires. Ainsi, l'interprétation des données d'IMS devrait être moins complexe.

La Figure 101 représente la cartographie  $1/K_0$  en fonction du rapport  $m/z$  pour la fenêtre d'éluion d'intérêt (entre 0 et 205 min en D1). Étant donné que les mêmes paramètres expérimentaux de mobilité ionique ont été employés, la cartographie est similaire à celle obtenue en RPLC/IMS/HRMS. Il semble toutefois que moins de dimères se soient formés avec le débit de solvant et les conditions d'ionisation utilisées en RPLC×RPLC/IMS/HRMS.

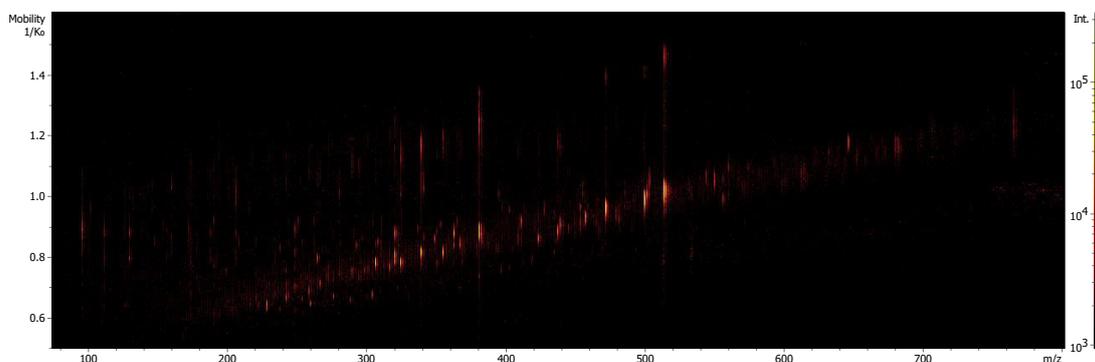


Figure 101 : Cartographie représentant  $1/K_0$  en fonction du rapport  $m/z$  pour les composés éluant entre 0 et 205 min en RPLC×RPLC

L'avantage majeur de ce couplage est la séparation des sucres d'intérêt grâce aux deux dimensions chromatographiques, ce qui permet une interprétation plus facile des mobilogrammes. En effet, la diminution des co-élutions permet de distinguer les ions pseudo-moléculaires de ceux provenant de la fragmentation en source. La Figure 102 présente un exemple pour l'ion  $m/z$  321 éluant à 107,2 min en D1 et à 9,2 s en D2. L'intégration du pic chromatographique permet d'obtenir un spectre de masse avec un seul pic. L'EIM de cet ion donne lieu à un mobilogramme plus simple d'interprétation en comparaison à ce qui a été présenté Figure 97.

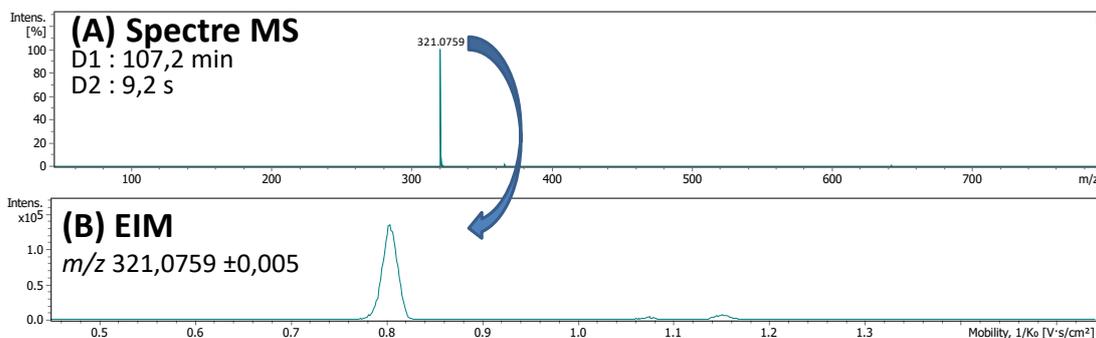


Figure 102 : (A) Spectre de masse d'un pic chromatographique en RPLC×RPLC et (B) EIM de l'ion  $m/z$  321

Enfin, la mobilité permet d'améliorer la séparation de certains composés encore co-élus dans les deux dimensions chromatographiques. La Figure 103 présente la cartographie  $1/K_0$  en fonction du temps de rétention en seconde dimension pour une modulation. La RPLC×RPLC permet une amorce de séparation entre les deux pics. Grâce à la différence de mobilité ionique des deux espèces,  $1/K_0$  de 0,876 et 0,892 V.s/cm<sup>2</sup> soit des CCS de 181,7 et 185,1 Å<sup>2</sup> respectivement, l'association des deux dimensions chromatographiques et de l'IMS améliore la résolution entre les deux pics. Cette séparation tridimensionnelle a permis de distinguer les spectres MS des deux isomères. On remarque par exemple que les fragments produits sont différents pour les deux composés.

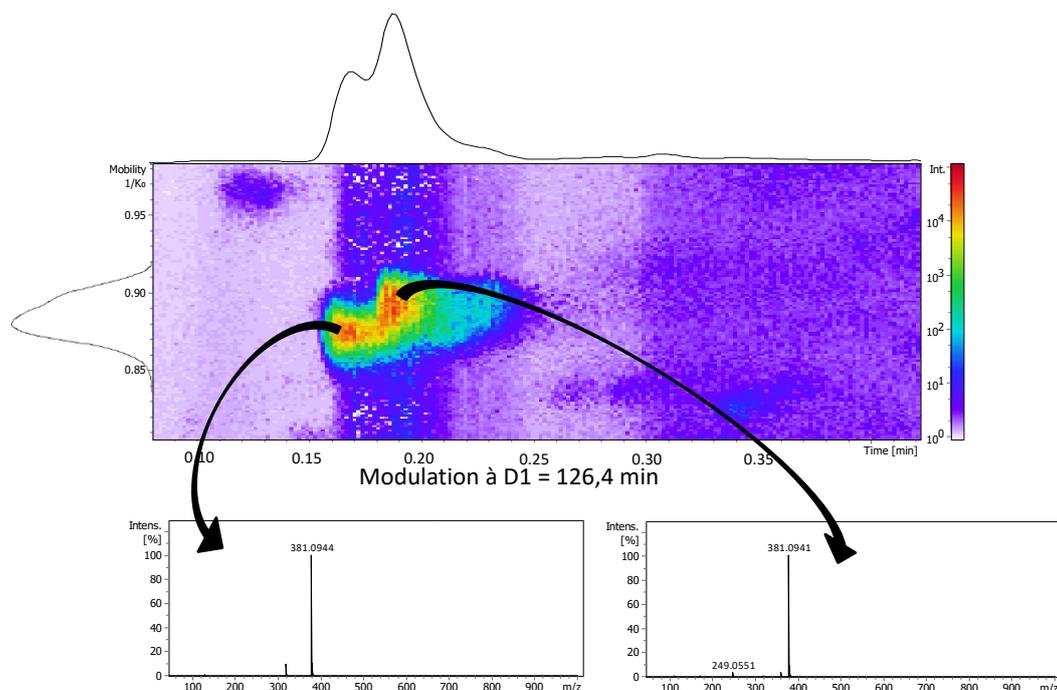


Figure 103 : Cartographie  $1/K_0$  en fonction du temps de rétention en D2 (D1 = 126,4 min) obtenue lors du couplage RPLC×RPLC/IMS/HRMS associée aux spectres MS sous les pics

## 6. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était dans un premier temps de développer une méthode de chromatographie bidimensionnelle compréhensive en ligne pour la séparation des sucres issus de la conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique non retenus en RPLC classique. En effet, nous avons pu voir dans le Chapitre 4, que près de 89% des composés présents dans un échantillon étaient regroupés dans une seule fraction lors des extractions liquide-liquide. Afin d'aboutir à une méthode bidimensionnelle pertinente pour nos composés d'intérêt, l'optimisation de la première dimension ainsi que la sélection de la colonne de seconde dimension ont été réalisées directement à partir de l'analyse de l'échantillon et non de molécules modèles risquant d'être peu représentatives des composés d'intérêt. **La méthode optimisée consiste au couplage d'une colonne à base de carbone graphite et d'une colonne à base de silice.** La complémentarité de ces deux phases stationnaires a permis **une occupation de l'espace chromatographique de 75%**. L'application du couplage RPLC×RPLC/HRMS en ESI négatif à l'échantillon A1 a permis de dénombrer **70 pics chromatographiques dans la zone d'intérêt des sucres**. La diminution des co-élutions a également été un atout pour **l'obtention de spectres de masse plus facilement interprétables**.

La seconde partie de cette étude visait à évaluer l'intérêt de la mobilité ionique en tant que dimension de séparation. Nous avons tout d'abord comparé **les avantages et inconvénients des méthodes tridimensionnelles RPLC×RPLC/HRMS et RPLC/IMS/HRMS**. La mobilité ionique présente des avantages certains. En effet, cette dimension de séparation possède **une échelle de temps intermédiaire entre la LC et l'analyseur TOF, ce qui permet un échantillonnage idéal entre les dimensions**. De plus, **l'ajout de la mobilité ionique à la RPLC/HRMS n'augmente pas le temps d'analyse et elle peut tout comme une dimension de séparation permettre de simplifier les spectres de masse**. En revanche, **l'interprétation des données peut être complexe**. Dans nos conditions, des fragments ont été formés lors de la transmission des ions entre la mobilité ionique et l'analyseur TOF, ce qui a eu pour conséquence d'obtenir plusieurs pics sur les mobilogrammes qui ne correspondaient pas à la séparation d'isomères. Enfin, le **couplage RPLC×RPLC/IMS/HRMS a été réalisé**. Nous avons démontré qu'une telle méthode permettait de **faciliter l'interprétation des mobilogrammes grâce aux dimensions chromatographiques**. Par ailleurs, **la mobilité ionique a permis d'améliorer la séparation de composés encore co-élus en RPLC×RPLC**. À l'issue d'une analyse RPLC×RPLC/IMS/HRMS, chaque composé sera décrit par **deux temps de rétention, une CCS**, un rapport  $m/z$  permettant de calculer une **formule brute** et éventuellement un spectre MS/MS. L'ensemble de ces descripteurs peut être utilisé simultanément pour conforter une identification. **Une difficulté majeure de ce type de couplage à ce jour est la représentation et le traitement des données obtenues**.

Dans le Chapitre 7, les capacités de pics de l'ensemble des méthodes développées dans cette thèse seront évaluées afin de positionner la résolution des couplages les uns par rapport aux autres.



# Chapitre 6 – Couplage CPC, SFC et HRMS pour la quantification des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les coupes pétrolières lourdes

Ce chapitre a fait l'objet de deux publications :

- ❖ « Input of an Off-Line, Comprehensive, Three-Dimensional Method (CPC×SFC/HRMS) to Quantify Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vacuum Gas Oil »

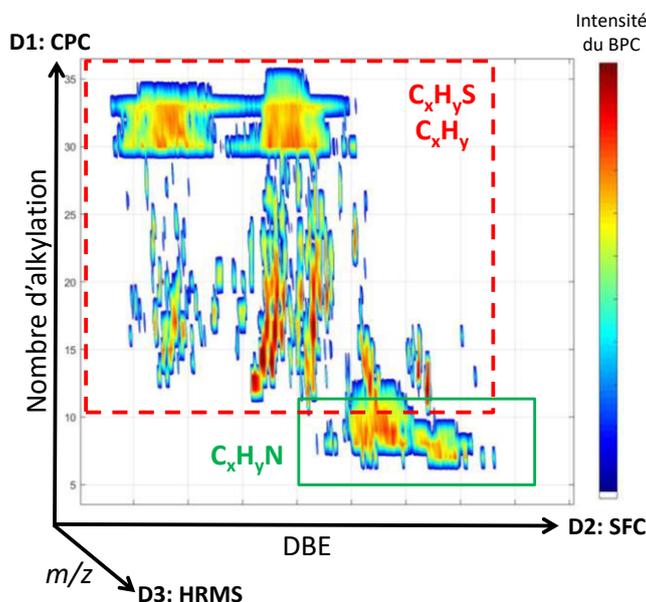
Carole Reymond, Agnès Le Masle, Cyril Colas, Nadège Charon

*Analytical Chemistry* (2020), DOI : 10.1021/acs.analchem.0c00605

- ❖ « A three-dimensional semi-quantitative method to monitor the evolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from vacuum gas oil feedstocks to lighter products »

Carole Reymond, Agnès Le Masle, Cyril Colas, Nadège Charon

*Fuel* (2021)



<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 165 -</b>
<b>2. DEVELOPPEMENT DU COUPLAGE CPC×SFC/HRMS .....</b>	<b>- 167 -</b>
2.1. OPTIMISATION DE LA SEPARATION SFC/HRMS.....	- 167 -
2.1.1. Conditions de séparation SFC-UV.....	- 167 -
2.1.2. Couplage avec la HRMS.....	- 170 -
2.2. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE EN TANT QUE PREMIERE DIMENSION .....	- 172 -
<b>3. DES CARTOGRAPHIES 2D ORGANISEES.....</b>	<b>- 175 -</b>
<b>4. LA CPC×SFC/HRMS, UNE METHODE QUANTITATIVE .....</b>	<b>- 180 -</b>
4.1. ÉVALUATION DES EFFETS DE MATRICE .....	- 180 -
4.2. TAUX DE RECUPERATION DES ECHANTILLONS .....	- 181 -
4.3. METHODOLOGIE POUR QUANTIFIER LES HYDROCARBURES AROMATIQUES ALKYLES .....	- 182 -
<b>5. APPLICATION DE LA METHODE CPC×SFC/HRMS A PLUSIEURS DSV .....</b>	<b>- 185 -</b>
5.1. DESCRIPTION DES CARTOGRAPHIES .....	- 185 -
5.2. QUANTIFICATION DES HAP DANS LES DSV .....	- 187 -
5.3. COMPOSES SOUFRES ET AZOTES .....	- 191 -
<b>6. SUIVI DE LA CONCENTRATION DES HAP AU COURS DES PROCEDES DE CONVERSION .....</b>	<b>- 192 -</b>
6.1. SUIVI DE L'UNITE AVEC UN DEBIT DE RECYCLE NUL.....	- 193 -
6.2. SUIVI DE L'UNITE AVEC UN DEBIT DE RECYCLE NON NUL .....	- 194 -
<b>7. CONCLUSION .....</b>	<b>- 196 -</b>

## 1. Introduction

La diversification des charges pétrolières à traiter et notamment l'augmentation de la proportion de composés à haut point d'ébullition (fraction lourde) dans ces charges ainsi que le durcissement des spécifications des produits finis, amènent les industriels à améliorer constamment les performances des procédés de conversion existants [9]. Parmi les procédés de conversion, l'hydrotraitement (HDT) et l'hydrocraquage (HCK) sont l'une des principales voies de transformation des distillats sous vide (DSV) en produits plus légers, hautement valorisables, avec de faibles teneurs en soufre et en azote. Ces distillats à hauts points d'ébullition (350-650°C) sont des mélanges ultra-complexes qui sont composés de plusieurs milliers de molécules diversifiées comprenant des hydrocarbures saturés et aromatiques plus ou moins alkylés ainsi que des composés contenant des hétéroatomes (composés soufrés, azotés et oxygénés) [115,238,239]. Parmi ces constituants, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) avec 2 à 6 cycles aromatiques initialement présents dans les DSV sont connus pour être des précurseurs de la formation de HAP plus lourds lors du procédé HCK [85,240]. Ces derniers sont responsables d'effets néfastes sur l'activité des catalyseurs et ont tendance à s'accumuler puis précipiter dans les échangeurs de l'unité. Afin de mieux comprendre et prévoir leur formation, des données quantitatives sur les teneurs de l'ensemble des HAP présents dans les DSV ainsi que dans la fraction non convertie (UCO) en sortie du procédé sont nécessaires.

L'un des principaux outils analytiques historiques utilisés pour la caractérisation des produits pétroliers est la **chromatographie en phase gazeuse (GC)** et la **GC bidimensionnelle (GC×GC)** [86,89,90,129,241,242]. Cependant, ces techniques sont généralement **limitées à la séparation détaillée des hydrocarbures aromatiques polycycliques comportant moins de cinq cycles aromatiques** (jusqu'aux tétra-aromatiques) en raison de leur faible volatilité [87,88,91]. À l'opposé, **la chromatographie en phase liquide (LC)** est une technique **adaptée à l'analyse de produits à plus haut point d'ébullition**. Dans la littérature, Panda *et al.* ont proposé une méthode pour analyser les HAP dans des échantillons hydrocraqués en utilisant la chromatographie à polarité de phase inversée en milieu non-aqueux (NARP) [96]. Cependant, la méthode développée est limitée aux échantillons à faible teneur en soufre et donc non applicable à la plupart des DSV. En raison de la complexité chimique des DSV, aucune méthode n'a permis d'obtenir un chromatogramme avec des pics résolus, permettant de déterminer la quantité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, malgré le développement de méthodes LC bidimensionnelles (LC×LC) impliquant une première dimension en chromatographie à polarité de phase normale et une seconde dimension en chromatographie à polarité de phase inversée (NPLC×RPLC) [100], ou encore en employant la RPLC dans les deux dimensions (RPLC×RPLC) [92]. À la frontière de la GC et de la LC, la **chromatographie en phase supercritique (SFC)** utilisant le dioxyde de carbone comme phase mobile est **un outil prometteur pour la séparation des composés non volatils dans les échantillons pétroliers**. À ses débuts, cette technique était principalement employée à l'aide de colonnes capillaires [243]. Aujourd'hui, la SFC est pratiquée avec des colonnes remplies en utilisant un modificateur organique pour augmenter la force éluante [160,162]. Bien qu'aucune étude n'ait été développée à notre connaissance pour caractériser les DSV à l'aide de colonnes remplies en SFC, quelques publications ont fait état de la séparation des HAP ayant entre 2 et 6 cycles aromatiques pour d'autres applications [101,102,104–106]. Parmi ces études, certaines ont choisi des phases stationnaires apolaires [104,106], tandis que les autres ont choisi des phases stationnaires avec des groupements polaires [101,102,105]. Zhang *et al.* ont comparé la séparation de 16 HAP avec deux à six cycles aromatiques sur trois types de phase

stationnaire : BEH 2-EP, HSS C18 SB et CSH Fluoro-Phenyl. Bien que quelques différences de sélectivité aient été observées, l'ordre d'élution était en fonction du nombre de cycles pour les trois colonnes. Finalement, les auteurs ont choisi la colonne BEH 2-EP en raison d'une meilleure résolution [105]. Après un screening de colonnes, deux autres équipes ont sélectionné la colonne Torus 2-PIC qui correspond à la nouvelle génération de colonnes BEH 2-EP [101,102]. Concernant la phase mobile, une élution par gradient utilisant le méthanol ou l'acétonitrile comme co-solvant a été préférée dans toutes les études. Zhang *et al.* ont remarqué que parmi les co-solvants étudiés (acétonitrile, isopropanol, méthanol et hexane), seul le méthanol a permis une élution complète des 16 HAP sur une colonne BEH 2-EP.

De nombreuses études consacrées à la pétroléomique ont choisi **la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR/MS)** qui est l'une des techniques les plus puissantes pour approfondir la caractérisation des pétroles lourds grâce à sa très haute résolution [107–111]. Parmi les sources d'ionisation disponibles, la **source de photo-ionisation à pression atmosphérique en mode positif (APPI(+))** semble être la plus efficace pour l'ionisation des HAP [117,122,244]. De plus, des dopants sont généralement employés pour augmenter l'efficacité de l'ionisation, comme le toluène [112,123,124], le chlorobenzène [245,246], l'anisole ou un mélange de plusieurs composés [119,120]. Cependant, la spectrométrie de masse ne peut à elle seule répondre à la complexité des échantillons pétroliers, principalement en raison (1) de la suppression d'ionisation qui conduit à l'obtention de données seulement qualitatives et (2) de la présence d'espèces isomères qui ne peuvent être différenciées. Un fractionnement des matrices peut être effectué en amont de l'analyse par spectrométrie de masse, comme la méthode de fractionnement SARA qui sépare les échantillons en quatre grandes classes de composés (saturés, aromatiques, résines et asphaltènes) [99,113,247,248]. Bien que de nombreuses méthodes de sous-fractionnement puissent être trouvées dans la littérature, comme le fractionnement par chromatographie par perméation de gel (GPC) [112], **la quantification reste l'une des principales limites de la spectrométrie de masse lors de l'introduction directe de l'échantillon.** Une solution pour obtenir une caractérisation qualitative et quantitative des HAP dans les DSV pourrait être **le couplage de techniques séparatives avec la spectrométrie de masse haute résolution.**

**Dans ce chapitre, en réponse à la complexité chimique des DSV et à la nécessité de quantifier les HAP, une approche séparative bidimensionnelle couplée à l'APPI(+)/FT-ICR/MS a été développée. Les NARP, SFC et chromatographie de partage centrifuge (CPC) ont été étudiées ainsi que le couplage de ces dernières. La sélection des dimensions s'est basée sur les mécanismes régissant la rétention des analytes dans l'objectif d'obtenir des cartographies organisées. La quantification des HAP dans les DSV via la méthode tridimensionnelle développée, a été démontrée en utilisant du pyrène deutéré pour évaluer les effets de matrice se produisant en APPI(+). Une fois la méthodologie pour quantifier l'ensemble des HAP achevée, cette dernière a été déployée sur plusieurs distillats sous vide. Enfin, le suivi de la concentration des HAP au cours des procédés d'hydrotraitement et d'hydrocraquage a permis de mettre en avant l'intérêt que peut avoir une telle méthode analytique.**

## 2. Développement du couplage CPC×SFC/HRMS

### 2.1. Optimisation de la séparation SFC/HRMS

#### 2.1.1. Conditions de séparation SFC-UV

**La première étape consiste à développer la séparation des HAP en SFC-UV.** Outre les avantages bien connus de cette technique analytique par rapport à la LC (efficacité, temps d'analyse, impact environnemental), la **SFC est particulièrement adaptée aux échantillons pétroliers** qui sont des matrices plutôt apolaires contenant des hydrocarbures aromatiques parfois fortement alkylés. En effet, le dioxyde de carbone qui constitue la phase mobile de la SFC est parfois assimilé à l'heptane en matière de pouvoir solvant ce qui permet d'envisager sans contrainte l'injection d'échantillons pétroliers de type DSV **sans préparation d'échantillon** [162]. Il s'agit d'un avantage notable par rapport à la chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée qui nécessite souvent l'emploi de quelques pourcents d'eau dans la phase mobile pour conserver la rétention des HAP avec peu de cycles tels que le pyrène, alors que la moindre trace d'eau engendrera la précipitation des espèces saturées ou des hydrocarbures très alkylés présents dans certains DSV. Cette limitation nécessite souvent la mise en place d'une étape préliminaire de préparation d'échantillon en amont de l'analyse LC [96].

**Sur la base d'une étude précédente, le méthanol a été sélectionné comme co-solvant** [105]. En effet, Zhang *et al.* ont montré qu'avec la colonne BEH 2-EP, parmi les co-solvants étudiés (acétonitrile, méthanol, isopropanol et hexane), seul le méthanol était capable d'éluer les 16 HAP allant du naphthalène (le moins retenu) au benzo[ghi]pérylène (le plus retenu avec six cycles aromatiques). Dans notre cas, certains DSV pourraient contenir des HAP ayant davantage de cycles que le benzo[ghi]pérylène et pourraient donc être fortement retenus sur la phase stationnaire. Le méthanol a également l'avantage d'avoir une énergie d'ionisation de 10,84 eV et est donc invisible en APPI lorsqu'une lampe krypton est utilisée.

Pour optimiser la séparation des HAP, **cinq colonnes chromatographiques** (Acquity UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP, Acquity UPC<sup>2</sup> BEH, Acquity UPC<sup>2</sup> CSH Fluoro-Phenyl, Acquity UPC<sup>2</sup> HSS C18 SB et Acquity UPC<sup>2</sup> Torus 2-PIC), **cinq pressions** (10,5, 12,0, 13,0, 15,0 et 16,4 MPa) et **trois températures** (25, 40 et 55°C) ont été prises en compte. Toutes les colonnes chromatographiques ont les mêmes dimensions (3,0 x 100 mm) avec une taille de particules de 1,7 µm, à l'exception de la colonne HSS C18 SB (1,8 µm). Ainsi, l'efficacité de l'ensemble des colonnes sélectionnées a été considérée comme similaire et les chromatogrammes ont pu être directement comparés pour une même méthode.

Au total, **75 conditions ont été appliquées à un mélange modèle** (MM6). Les meilleures conditions ont été choisies en fonction de **deux critères**. Le premier concernait **le temps de rétention du pyrène** qui devait être élué après le palier isocratique à 100% de CO<sub>2</sub> afin que les mono, di et tri-aromatiques ne soient pas co-élus avec le pyrène. Le second critère était **le temps de rétention du coronène**, le composé comportant le plus de cycles dans le mélange modèle considéré (avec 8 cycles aromatiques), qui devait être élué avec un maximum de 25% de MeOH étant donné qu'il est possible que des composés avec davantage de cycles soient présents dans les échantillons industriels. Compte tenu de ces contraintes, une seule condition restait possible : **la colonne Torus 2-PIC à 55°C avec une contre-pression de 10,5 MPa** (Figure 104).

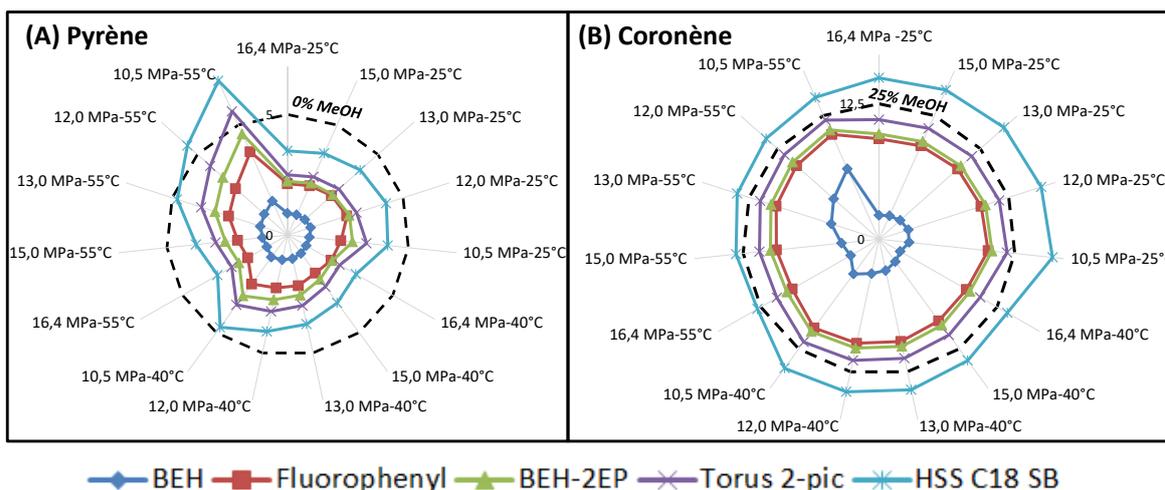


Figure 104 : Temps de rétention (A) du pyrène et (B) du coronène dans les différentes conditions SFC

L'évolution des temps de rétention du pyrène et du coronène sur la colonne Torus 2-PIC en fonction de la température et de la pression est représentée sur la Figure 105. La température a plus d'influence sur le temps de rétention du pyrène à basse pression qu'à haute pression. De même, la pression a influencé le temps de rétention de manière plus significative à 55 qu'à 25°C. Le pyrène est élué majoritairement avec du CO<sub>2</sub> au début du gradient (avec 1% de MeOH), ainsi les variations de temps de rétention selon les conditions peuvent être expliquées par les changements de densité de la phase mobile variant approximativement de 0,4 g/cm<sup>3</sup> (55°C et 10,5 MPa) à 0,95 g/cm<sup>3</sup> (25°C et 16,4 MPa) [153]. À l'opposé, le coronène est élué avec un mélange de CO<sub>2</sub> et de MeOH (21% de MeOH dans les conditions finales), ce qui entraîne un impact plus faible de la pression et de la température sur son temps de rétention en raison de la compressibilité plus faible de la phase mobile avec une teneur plus élevée en méthanol dans le dioxyde de carbone. La Figure 106 présente à titre d'exemple les chromatogrammes obtenus (A) à 55°C pour différentes températures et (B) à 55°C avec plusieurs pressions.

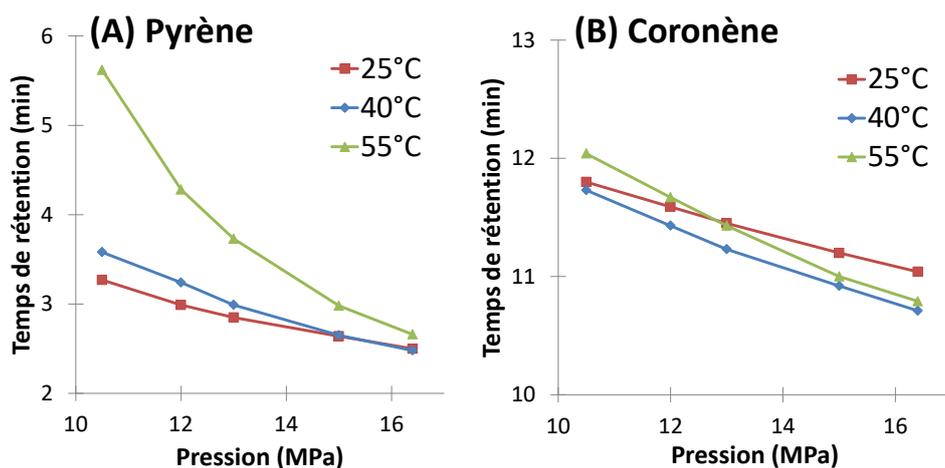


Figure 105 : Temps de rétention (A) du pyrène et (B) du coronène avec la colonne Torus 2-PIC en fonction de la température et de la pression de l'ABPR.

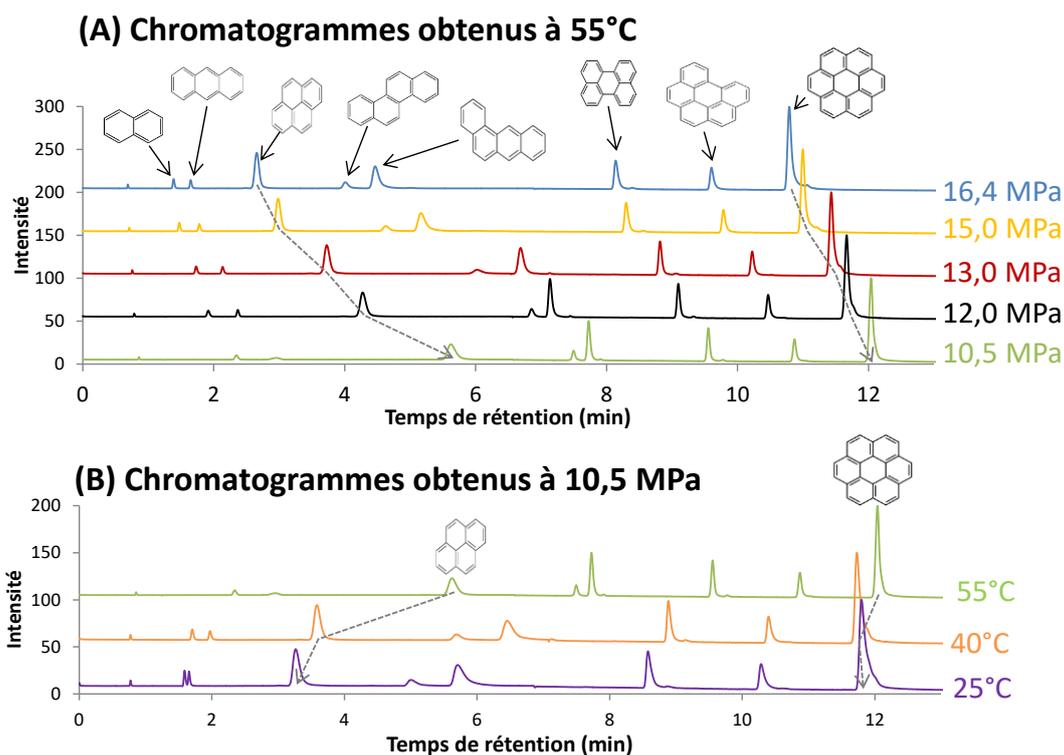


Figure 106 : Chromatogrammes UV à 302 nm obtenus avec une séparation sur la colonne Torus 2-PIC à (A) 55°C et plusieurs pressions et (B) à 10,5 MPa et plusieurs températures

Enfin, la répétabilité des temps de rétention dans les conditions optimisées (55°C, 10,5 MPa) a été évaluée. En effet, dans les conditions optimisées, un léger changement de température ou de pression pourrait entraîner une modification de la densité de la phase mobile et donc une modification du temps de rétention. La variabilité intra-journalière a été évaluée sur 5 injections effectuées le même jour. La variabilité inter-journalière a été mesurée à l'aide de 5 injections effectuées des jours différents. Les écarts-types relatifs du temps de rétention du pyrène étaient de 2,9 et 0,3% pour les variabilités intra-journalières et inter-journalières respectivement. Les écarts-types relatifs du temps de rétention du coronène étaient de 0,2 et < 0,1% pour les variabilités intra-journalières et inter-journalières respectivement ce que nous avons jugé satisfaisant.

La méthode SFC-UV a été appliquée à deux échantillons industriels : un DSV (DSV 4) et une charge non convertie (UCO<sub>1</sub>) tous deux dilués six fois en poids dans le toluène (Figure 107).

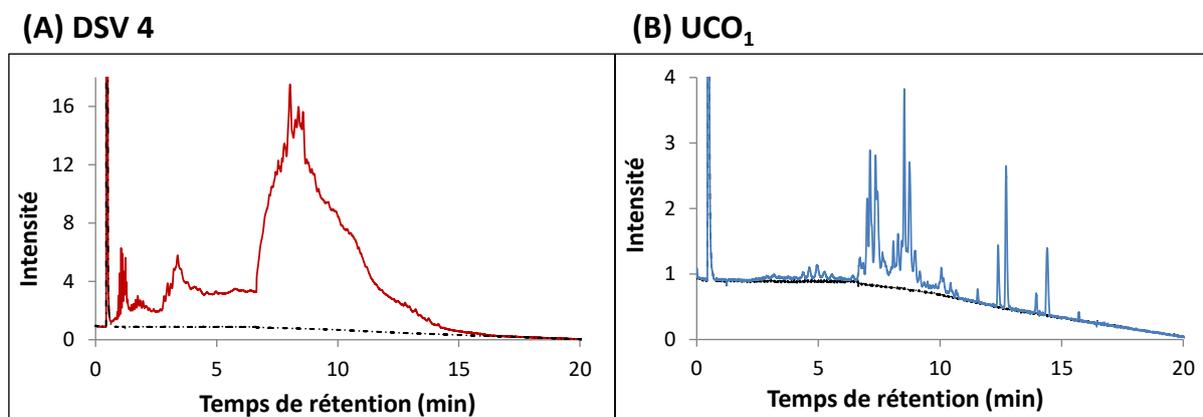


Figure 107 : Chromatogrammes SFC (max plot entre 250 et 400 nm) de (A) DSV 4 et (B) UCO<sub>1</sub>. Le blanc (injection de toluène) est représenté en pointillé noir.

Comme le montre la Figure 107, notre méthode **SFC-UV permet de séparer les hydrocarbures aromatiques contenus dans UCO<sub>1</sub>** alors que **la résolution n'est pas suffisante pour obtenir un chromatogramme résolu dans le cas de DSV 4**. En effet, une forte dérive de la ligne de base est visible entre le pic de l'injection et 15 min. Par conséquent, la méthode SFC-UV ne peut pas être utilisée seule pour quantifier les HAP dans les DSV.

### 2.1.2. Couplage avec la HRMS

**La méthode SFC développée a été couplée à la HRMS afin d'ajouter une dimension de séparation en fonction du rapport  $m/z$  des analytes.**

Dans ce travail, la **SFC a été couplée à la HRMS via la source APPI(+)**. Comme les HAP ont une énergie d'ionisation (IE) inférieure à 10 eV (7,43 eV pour le pyrène par exemple [119]), leur ionisation directe grâce aux photons fournis par la lampe krypton est possible ; cependant, un dopant est généralement employé pour augmenter l'efficacité de l'ionisation. Parmi les dopants étudiés (acétone, toluène, anisole et un mélange anisole/toluène 50/50 (v/v)), **l'anisole avec un débit de 100  $\mu$ L/min offre la meilleure sensibilité**, ce qui est en accord avec la littérature [119,120]. Par exemple, les intensités du pyrène et du coronène étaient respectivement 50 et 25 fois plus élevées avec l'anisole qu'avec le toluène comme dopant (Figure 108).

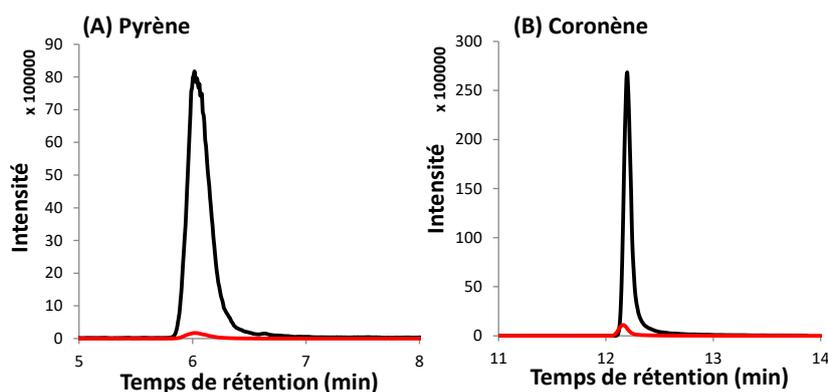


Figure 108 : EIC des ions  $[M]^+\bullet$  du (A) pyrène et (B) coronène en utilisant du toluène (rouge) ou de l'anisole (noir) comme dopants.

Les paramètres de désolvatation et d'ionisation ont été **optimisés grâce à un plan d'expériences selon la méthodologie du Chapitre 3**. Les gammes des paramètres expérimentaux optimisés sont présentées dans le Tableau 29 ainsi que les valeurs après optimisation.

Tableau 29 : Gammes des paramètres expérimentaux étudiées et valeurs dans les conditions optimisées

Paramètres	Gammes étudiées	Conditions optimisées
Débit du gaz nébulisant (U.A.)	10-60	10
Débit du gaz séchant (U.A.)	5-45	34
Débit du gaz rideau (U.A.)	/	0
Température du four tubulaire (°C)	200-450	348
Température du capillaire de transfert (°C)	200-400	200
Tension du capillaire de transfert (V)	0-100	48
Tension de la première lentille (V)	/	100

Au vu de la configuration du montage SFC-UV/HRMS décrit dans le Chapitre 2, le débit d'entrée dans la source d'ionisation va dépendre de la viscosité du fluide supercritique. En effet, d'après de

précédents travaux, le débit total entrant dans la source,  $F_{MS}$ , peut être calculé suivant l'équation ci-dessous [32] :

$$F_{MS} = \frac{\frac{\Delta P_{ABPR} \times \pi}{128 \eta} + R_W \times F_T}{R_W + R_{MS}} \quad (\text{Éq. 19})$$

Avec  $\Delta P_{ABPR}$  la perte de charge générée par l'ABPR,  $\eta$  la viscosité,  $R_W$  et  $R_{MS}$  des termes prenant en compte la géométrie des tubings allant à la poubelle et au spectromètre de masse respectivement ( $R = \text{longueur}/\text{diamètre}^4$ ) et  $F_T$  le débit total.

L'ensemble de ces paramètres sont fixes, à l'exception de la viscosité qui dépend de la composition du fluide. Ainsi, plus cette viscosité sera importante, et plus  $F_{MS}$  sera faible. En début d'analyse, le fluide est composé uniquement de  $\text{CO}_2$  auquel vient s'ajouter le débit de  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  de dopant (anisole). Ensuite, au cours du gradient, la proportion de  $\text{CO}_2$  va diminuer et celle de MeOH augmenter. La viscosité du fluide augmente donc lors du gradient. En estimant grossièrement la viscosité du fluide comme étant une moyenne des viscosités du méthanol, de l'anisole et du  $\text{CO}_2$  pondérées par leur fraction volumique, on peut résoudre l'équation 19 et estimer la variation de  $F_{MS}$  au cours de l'analyse SFC. Cette estimation a été réalisée pour un débit d'anisole de  $100$  et  $500 \mu\text{L}/\text{min}$ . La Figure 109 représente  $F_{MS}$  ainsi que les débits de MeOH,  $\text{CO}_2$  et anisole entrant dans la source d'ionisation ( $F_{MS, \text{MeOH}}$ ,  $F_{MS, \text{CO}_2}$  et  $F_{MS, \text{Anisole}}$  respectivement). Au cours du gradient, le débit de MeOH augmentant et celui de  $\text{CO}_2$  diminuant, le débit de MeOH entrant dans la source d'ionisation augmente et celui de  $\text{CO}_2$  diminue. En revanche, bien que le débit d'anisole et le débit total des fluides soient inchangés,  $F_{MS, \text{Anisole}}$  et  $F_{MS}$  diminuent avec l'augmentation du pourcentage de MeOH. Cette diminution est liée à l'augmentation de la viscosité du fluide. Ainsi, pour garder une pression constante, une plus grande part du fluide est dirigée vers l'ABPR. Une solution pour garder un débit relativement constant serait d'augmenter le débit d'anisole. En effet, en augmentant ce dernier, on augmente considérablement la viscosité du fluide et ainsi l'impact de l'augmentation du pourcentage de MeOH au cours du gradient devient moindre. Cependant, la proportion de dopant deviendrait trop importante pour une ionisation optimale en APPI(+) et on observerait une suppression du signal. On pourrait alors utiliser comme dopant un mélange de MeOH et d'anisole. Toutefois, l'ionisation des composés éluant avec un faible pourcentage de MeOH serait grandement impactée par un débit de dopant aussi élevé.

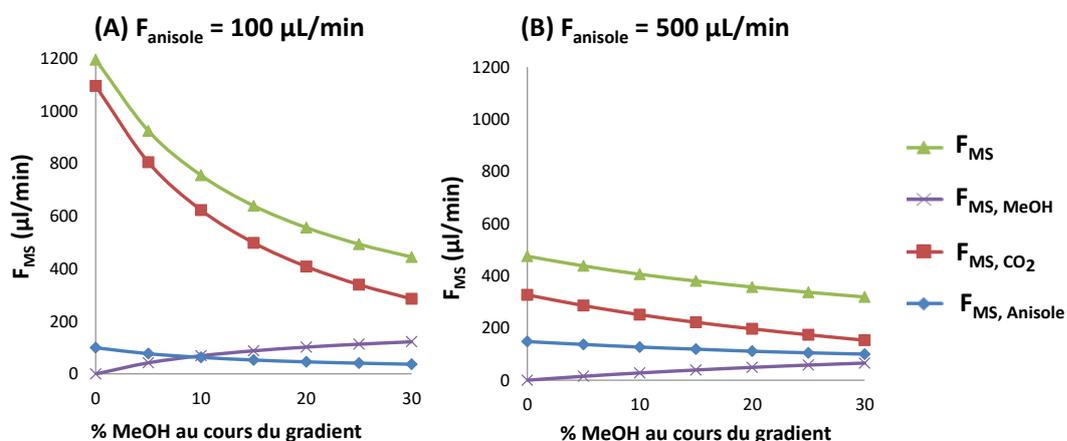


Figure 109 : Simulation des débits entrant dans la source d'ionisation pour (A) un débit d'anisole de  $100 \mu\text{L}/\text{min}$  et (B)  $500 \mu\text{L}/\text{min}$ .

Ensuite, afin d'évaluer la capacité de la méthode SFC/HRMS à quantifier les HAP dans les DSV et les UCO, des échantillons ont été dopés avec du pyrène deutéré (d-pyrène) à plusieurs concentrations. Pour estimer l'effet de matrice qui pourrait se produire dans la source d'ionisation, une courbe d'étalonnage du d-pyrène préparé dans du THF a été tracée comme référence. Comme le montre la Figure 110, une courbe d'étalonnage linéaire en HRMS a été obtenue entre 10 et 350 mg/L (carrés noirs). Les points correspondant à l'UCO<sub>1</sub> dopé (étoiles vertes) sont correctement situés à proximité de la courbe d'étalonnage, ce qui signifie qu'aucun effet de matrice n'a lieu ou qu'il est négligeable. La méthode SFC/HRMS pourra donc être employée pour quantifier les HAP dans les UCO. À l'inverse, les DSV dopés ont souffert d'une forte suppression d'ionisation. Par exemple, le DSV 4 dopé à 200 mg/L avec le d-pyrène a une aire dix fois plus faible que l'aire obtenue avec la solution étalon. Ce phénomène de suppression d'ionisation est causé par les nombreux composés co-élus en SFC qui entrent simultanément dans la source d'ionisation et entraînent ainsi une compétition lors de l'ionisation entre les analytes (Figure S6). Les DSV sont des matrices nettement plus complexes que les UCO car ils sont constitués de composés soufrés, azotés ainsi que de composés fortement alkylés. Ainsi, une dimension de séparation supplémentaire a été nécessaire pour augmenter la résolution globale de la méthode et diminuer le nombre de composés co-élus.

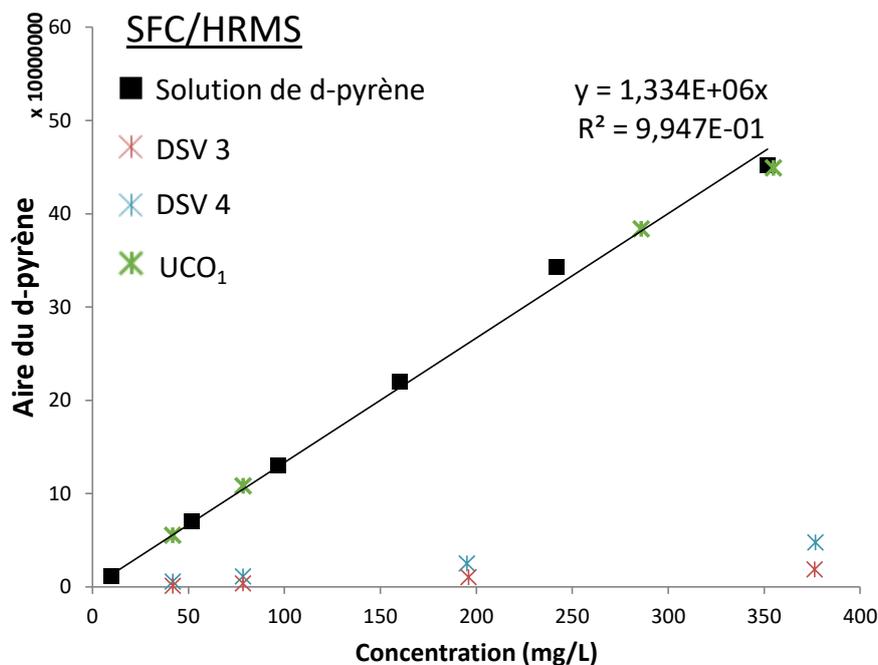


Figure 110 : Aire en SFC/HRMS du d-pyrène dans une solution étalon (carrés noirs), dans les DSV 3 et 4 et l'UCO<sub>1</sub> dopés

## 2.2. La chromatographie de partage centrifuge en tant que première dimension

La CPC est une technique de séparation liquide-liquide basée sur le coefficient de partage (K) des analytes dans un système biphasique. Cette méthode présente deux avantages principaux. Le premier est que **la perte d'échantillon dans le système CPC est limitée** grâce (1) à l'absence d'adsorption irréversible sur une phase stationnaire solide et (2) à l'extrusion de la phase stationnaire à fin de l'élution qui permet de récupérer la totalité de l'échantillon. Le deuxième avantage **est la polyvalence de la CPC avec un large choix de systèmes solvants biphasiques**. Bien que cette technique d'analyse ait une efficacité de séparation inférieure à la SFC ou la LC, on peut s'attendre à un mécanisme de séparation différent et complémentaire à la SFC.

La sélection du système solvant le plus approprié est une étape critique. Lorsque l'on souhaite **occuper au maximum l'espace de séparation en CPC**, l'échantillon doit se partager assez équitablement entre les phases mobile et stationnaire ( $0,5 < K < 3$ ) une fois introduit dans le système solvant. Par ailleurs, **le temps de démixtion** ( $t_d$ ) correspondant au temps nécessaire pour une séparation complète de la phase mobile et la phase stationnaire, doit être inférieur à 30 s. Il existe principalement deux façons d'optimiser la composition du système solvant : (1) à partir de l'approche dite du « bon solvant » qui consiste à sélectionner un solvant permettant de solubiliser les échantillons puis à construire le système solvant autour de ce dernier et (2) à partir de tables disponibles dans la littérature proposant des systèmes solvants de polarités différentes. Il existe plusieurs gammes proposant des combinaisons de solvants selon une échelle de polarité, la plus connue étant la gamme ARIZONA. Dans cette gamme, le système solvant le plus apolaire correspond à un mélange 1/1 d'heptane (HEPT) et de méthanol (système Z).

Etant donné le caractère apolaire de nos échantillons, nous avons donc construit notre système solvant en le basant sur ce système Z. Le méthanol a été remplacé par de l'acétonitrile (ACN) légèrement plus apolaire. Afin d'estimer le partage des DSV dans ce système solvant, 1 g du DSV 4 a été introduit dans 10 mL de HEPT-ACN (1/1 v/v). Bien que la coloration des deux phases démontre bien le partage des analytes, le temps de démixtion de ce système solvant avec l'échantillon est supérieur à 30 s comme l'illustre la photo prise 30 s après le mélange des phases (Figure 111). Afin d'améliorer la stabilité du système solvant en diminuant le temps de démixtion, quatre tiers solvants connus pour être capables de solubiliser les HAP ont été ajoutés au système HEPT/ACN : le toluène (TOL), le dichlorométhane (DCM), le tétrahydrofurane (THF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Quatre pourcentages de tiers solvant allant de 2 à 17% ont été testés. Comme l'illustre la Figure 111, l'augmentation du pourcentage du tiers solvant permet d'améliorer l'interface entre les deux phases. De plus, en fonction du tiers solvant employé, le temps de démixtion n'est pas le même. En effet, avec l'ajout de 7% de DCM, le déphasage est complet après 30 s, tandis que l'interface reste trouble avec le DMSO, le toluène et dans une moindre mesure avec le THF. Avec 16,7% de tiers solvant, la démixtion est convenable avec les quatre tiers solvants. Ainsi, l'utilisation de l'un d'entre eux pourrait convenir pour la séparation des DSV en CPC, toutefois d'autres critères sont à prendre en compte. En effet, la CPC est envisagée à ce stade de l'étude comme la première dimension de notre méthode séparative. Ainsi, les fractions collectées en sortie de CPC seront injectées en SFC/HRMS. En amont de l'analyse, ces dernières seront évaporées puis solubilisées dans un moindre volume de solvant afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse SFC/HRMS. Les solvants constituant la phase mobile doivent donc être facilement évaporables. Le DMSO a une température d'ébullition d'environ 190°C, des conditions sévères (température et pression) seront donc nécessaires pour l'évaporer, ce qui augmenterait le risque de perte d'échantillon. À l'inverse, le dichlorométhane étant le solvant ayant la plus basse température d'ébullition (40°C) parmi les quatre tiers solvants, nous l'avons donc sélectionné. Concernant la proportion de ce dernier au sein du système solvant, nous avons choisi de minimiser au maximum son pourcentage. En effet, le DCM étant soluble à la fois dans l'heptane et l'acétonitrile, un trop grand pourcentage de ce dernier conduirait à l'obtention d'une seule phase. **En conclusion, le système solvant sélectionné est HEPT/ACN/DCM (45/45/10 v/v/v)**. Afin que la phase stationnaire soit la phase riche en heptane et la phase mobile celle riche en acétonitrile, **le mode ascendant** a été appliqué lors de la séparation CPC.

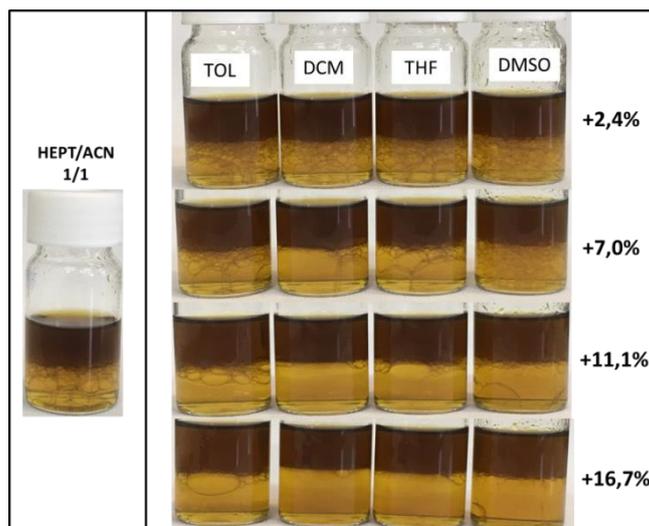


Figure 111 : Photos des systèmes solvants avec et sans tiers solvant 30 s après l'agitation de ces derniers.

Idéalement, afin d'injecter l'échantillon en CPC celui-ci doit être dilué ; il est préférable d'effectuer la dilution dans la phase mobile pour ne pas perturber l'équilibre au sein de la colonne. Cependant, les DSV ne sont pas complètement solubles dans la phase enrichie en acétonitrile. Les échantillons peuvent également être mis en solution dans un mélange phase mobile/phase stationnaire. Mais, un inconvénient de diluer les échantillons dans un mélange biphasique est l'aspect quantitatif lors du remplissage de la boucle d'injection. Habituellement, pour s'assurer que la boucle soit correctement remplie et que le volume d'injection corresponde bien au volume de la boucle, le remplissage de ces boucles se fait par débordement. Cependant, lorsque l'échantillon est divisé entre deux phases, un débordement de la boucle pourrait conduire à une injection non représentative de l'échantillon initial. Pour cette raison, **nous avons choisi de diluer les DSV dans 100% de phase stationnaire**. Afin d'augmenter la capacité de chargement de l'échantillon dans la colonne CPC, des diagrammes ternaires peuvent être construits. À titre d'exemple, le diagramme ternaire pour le système solvant HEPT/ACN/DMSO (45/45/10 v/v/v) a été construit avec comme axes les ratios massiques de l'échantillon, de la phase stationnaire et de la phase mobile (Figure S7). 1 g d'échantillon dilué dans 5 mL de phase stationnaire ont ainsi pu être injectés sans perturber le système solvant en équilibre. Seule la première fraction collectée contenait de la phase stationnaire qui a été poussée pendant l'injection.

Les chromatogrammes CPC pour le DSV 4 et un mélange modèle contenant de l'antracène, du pyrène, du pérylène, du benzo[ghi]pérylène et du coronène à 50 mg/L sont présentés Figure 112. Les cinq étalons du mélange modèle sont des composés non alkylés, également **appelés « têtes de famille », éluant entre 10 et 15 min** avec une intensité maximale du signal UV observée à environ 12 min. Pour le DSV, les analytes ont été élués tout au long de la séparation :

- du volume mort à 6 min pour les composés qui se sont très peu partagés et donc principalement restés dans la phase mobile,
- durant toute l'élution (de 6 à 30 min) pour les composés qui ont été répartis entre les phases mobile et stationnaire,
- jusqu'à l'extrusion de la phase stationnaire (de 30 à 40 min) pour les composés qui ont une affinité plus élevée pour la phase enrichie en heptane que pour la phase enrichie en acétonitrile. Ces derniers pourraient correspondre à des composés fortement alkylés.

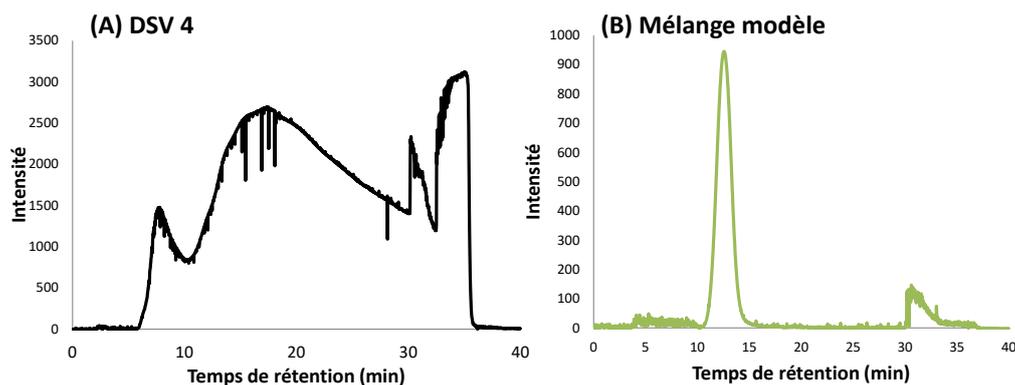


Figure 112 : Chromatogrammes CPC à 254 nm (A) du DSV 4 et (B) d'un mélange modèle.

Le choix du système solvants a finalement été validé par la totale occupation de l'espace chromatographique.

Une fraction par minute a été collectée. Les fractions sont ensuite évaporées sous vide à 40°C puis reprises dans 300  $\mu$ L de toluène. Les 40 fractions sont enfin analysées avec la méthode SFC-UV/HRMS.

### 3. Des cartographies 2D organisées

Une fois que l'analyse SFC-UV/HRMS a été effectuée pour chaque fraction CPC, **des cartographies 2D peuvent être construites soit avec le signal UV, soit avec le signal HRMS** à l'aide d'un logiciel développé en interne à IFPEN. Les Figure 113 et Figure 114 présentent les cartographies en UV et HRMS obtenues pour le DSV 4 et l'UCO<sub>1</sub> respectivement. **Les pics sur les cartographies du DSV 4, et plus particulièrement sur la cartographie en UV, ne sont pas résolus.** À l'inverse, pour l'UCO<sub>1</sub> qui est un échantillon moins complexe que les DSV (absence de composés azotés et soufrés notamment), la cartographie UV montre des pics résolus. Au vu de ces cartographies, **il semble difficile d'envisager une quantification des HAP dans les DSV par UV** du fait des nombreuses co-élutions qui persistent malgré les deux dimensions de séparation. En revanche, **la HRMS permet de sélectionner des composés d'intérêt et pourrait donc, malgré des co-élutions persistantes, permettre la quantification des HAP, sous condition qu'aucun effet de matrice ne se produise.**

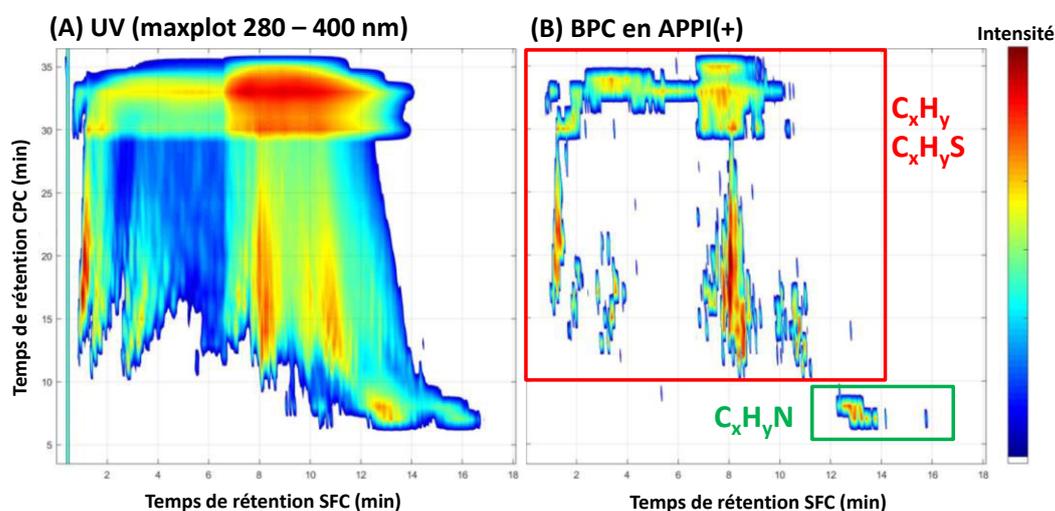


Figure 113 : Cartographies CPCxSFC du DSV 4 en (A) UV et (B) en HRMS.

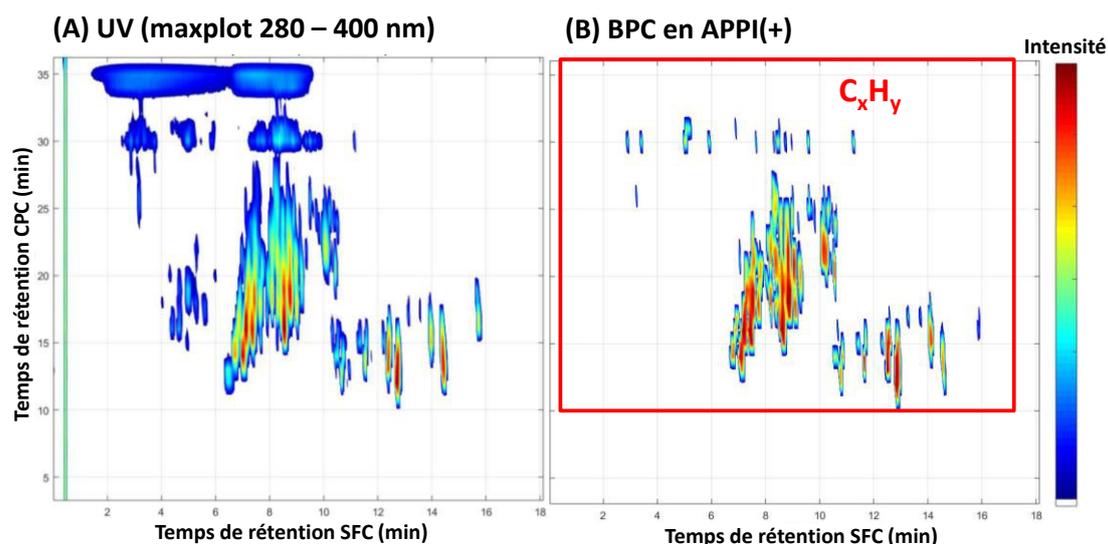


Figure 114 : Cartographies CPC x SFC de l'UCO<sub>1</sub> en (A) UV et (B) en HRMS.

Afin de comprendre l'organisation de ces cartographies, les données de HRMS ont été traitées afin d'obtenir une liste de formules brutes associées aux temps de rétention SFC et CPC. Pour l'UCO<sub>1</sub>, seuls des composés de type C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> ont été détectés alors que, pour le DSV 4, des molécules de type C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>S, C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>N ainsi que quelques analytes C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>O ont été détectés. En effet, l'UCO<sub>1</sub> a été hydrotraité, ce qui a permis d'éliminer les composés azotés, soufrés et oxygénés. À l'aide de la liste de formules brutes, le nombre d'insaturations (DBE) pour chaque molécule de type C<sub>c</sub>H<sub>y</sub>N<sub>n</sub>S<sub>s</sub>O<sub>o</sub> peut être calculé selon l'équation suivante :

$$DBE = \frac{2+2c-h+n}{2} \quad (\text{Éq. 20})$$

L'évolution du DBE en fonction du nombre d'atomes de carbone (nC) a été tracée pour la famille C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> avec des échelles de couleurs pour les temps de rétention CPC et SFC (Figure 115).

**La première dimension, la CPC, permet de séparer les composés en fonction du nombre d'atomes de carbone au sein des chaînes alkylées.** En effet, pour un DBE donné, les composés sans alkylation ont été élués en premier, puis ceux avec un CH<sub>2</sub>, deux CH<sub>2</sub>, etc. Ce mécanisme de rétention provient du coefficient de partage des analytes entre les phases mobile et stationnaire de la CPC. **Plus un composé sera alkylé, plus son coefficient de partage sera en faveur de la phase stationnaire, phase enrichie en heptane.** Les hydrocarbures et les composés soufrés ont été élués entre 10 et 35 min, tandis que les composés azotés, plus polaires, ont été élués entre 5 et 10 min. Ainsi, **la CPC permet d'isoler les composés azotés** et d'éclater les HAP et les composés soufrés. Bien que non exploité au cours de thèse, l'isolement des composés azotés, certains connus pour être très réfractaires à l'hydrotraitement, a un réel intérêt pour leur caractérisation.

À l'opposé du mécanisme de séparation en CPC, **les temps de rétention en SFC sont principalement corrélés au DBE** pour la famille C<sub>x</sub>H<sub>y</sub>. Ainsi, plus une molécule comportera de cycles aromatiques et plus cette dernière aura de la rétention. Ce mécanisme de rétention est similaire à celui de la chromatographie en phase normale [93]. Pour les composés azotés, ils éluent entre 8 et 18 min en SFC.

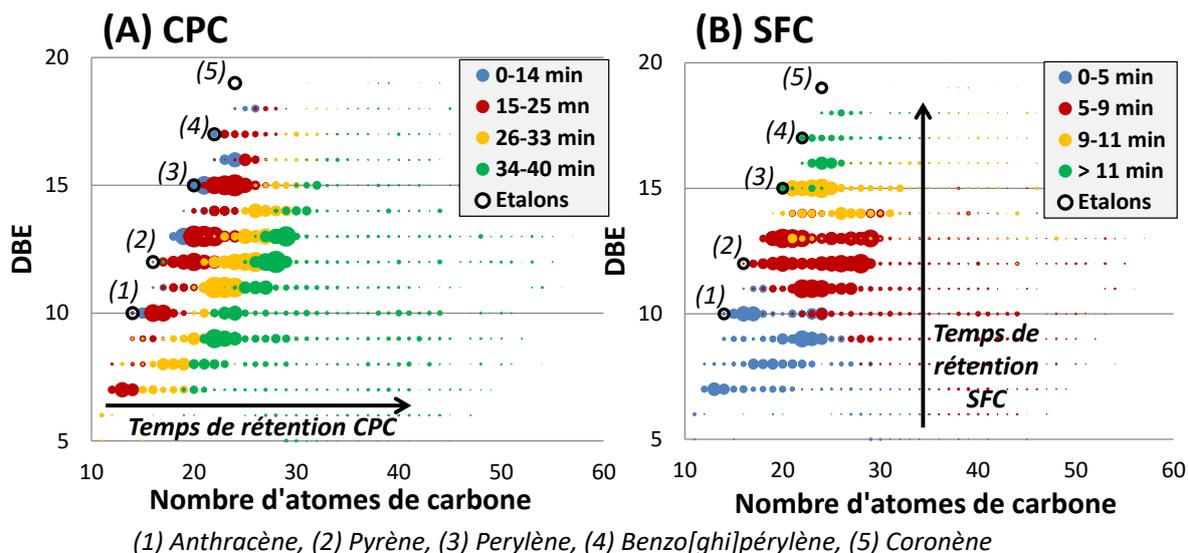


Figure 115 : DBE en fonction du nombre d'atomes de carbone pour les composés de type  $C_xH_y$  détectés dans le DSV 4. Les échelles de couleur représentent les temps de rétention en (A) CPC et (B) SFC ; la taille des points correspond à l'aire des ions extraits en APPI(+).

Les mécanismes de rétention, décrits ci-dessus pour les composés hydrocarbonés, sont similaires pour les composés azotés et sulfurés. Les graphiques représentant le DBE en fonction du nC pour les familles  $C_xH_yS$  et  $C_xH_yN$  sont présentés Figure S8.

Au cours de ces travaux, la NARP avait également été envisagée comme méthode séparative en deuxième dimension. Toutefois, la SFC a été préférée à cette dernière pour trois raisons :

- (1) les composés saturés ou très alkylés peuvent précipiter en début de gradient avec 100% de méthanol,
- (2) les HAP avec 1 à 4 cycles aromatiques (DBE de 4 à 12) ne sont pas retenus et donc co-éluent avec du méthanol comme solvant faible,
- (3) les mécanismes de rétention en NARP ne permettent pas d'obtenir une cartographie organisée lors du couplage CPC×NARP/HRMS.

Pour illustrer ce dernier propos, le graphique représentant le DBE en fonction du nC a été représenté avec une échelle de couleurs pour le temps de rétention en NARP des composés de type  $C_xH_y$  (Figure 116). L'analyse des fractions CPC a été réalisée sur une colonne Nucleodur®  $C_{18}$  PAH avec un gradient allant de 100% de méthanol à 100% de dichlorométhane. De plus, afin de limiter le risque de précipitation, les fractions ont été évaporées puis reprises dans du DMSO permettant de ne pas solubiliser les composés saturés ou très alkylés. La méthode a été couplée à la HRMS afin d'étudier les mécanismes de rétention. Comme le démontre la Figure 116, le temps de rétention en NARP semble être affecté à la fois par le DBE et le nombre d'atomes de carbone pour les molécules de type  $C_xH_y$  et très probablement par d'autres propriétés. Ainsi, le couplage de la CPC et la NARP n'aurait pas permis d'obtenir des cartographies organisées.

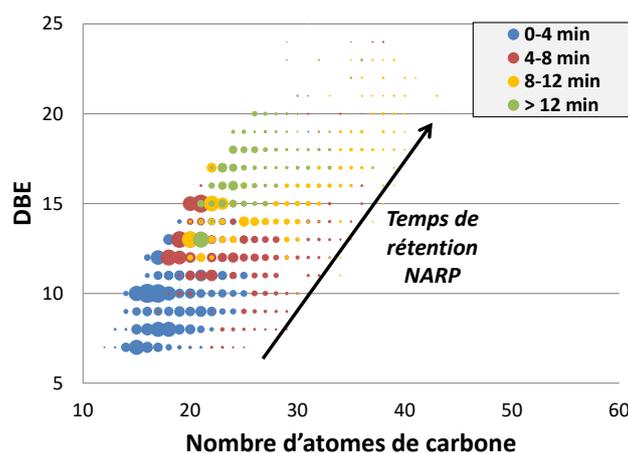


Figure 116 : DBE en fonction du nombre d'atomes de carbone pour les composés de type  $C_xH_y$  détectés dans le DSV 4. L'échelle de couleur représente le temps de rétention en NARP ; la taille des points correspond à l'aire des ions extraits en APPI(+).

Ainsi, la complémentarité des mécanismes de séparation en CPC et SFC a permis d'obtenir des cartographies organisées, empreintes des échantillons analysés. Le couplage hors-ligne de ces deux dimensions permet de fractionner les échantillons, d'une part en fonction de leur degré d'alkylation et d'autre part en fonction de leur nombre de cycles aromatiques. Les composés azotés ont été isolés des autres analytes en éluant au début de la séparation CPC. Enfin, pour les composés encore co-élus en CPC×SFC, l'utilisation de la HRMS est nécessaire pour distinguer ces molécules en fonction de leur rapport  $m/z$ .

Il convient de noter que la résolution en masse a été réduite à 12 500 afin d'avoir une vitesse de scan suffisante pour décrire correctement les pics chromatographiques. Généralement, l'utilisation de la haute résolution en spectrométrie de masse est une caractéristique clé pour pouvoir distinguer de très petites différences en masse entre les isobares. Parmi les composés que l'on trouve habituellement dans les produits pétroliers de type  $C_xH_yN_rO_sS_s$ , la plus petite différence de masse se situe entre  $C_3$  et  $SH_4$  (0,0034 Da). Pour distinguer cette différence et atteindre une séparation à mi-hauteur, une résolution de 89 000 est nécessaire pour un  $m/z$  de 300. En introduction directe, la séparation entre deux composés ne peut provenir que de la spectrométrie de masse. Cependant, en couplage avec des techniques séparatives, et plus particulièrement en couplage SFC/HRMS dans le cas présent, la résolution de la technique SFC a permis de travailler avec une résolution en masse plus faible. En effet, deux isobares peuvent être différenciés s'ils éluent à des temps de rétention différents. Par exemple,  $C_{20}H_{28}S$  ( $m/z$  mesuré à 300,1907) a été élué à 2,7 min alors que  $C_{23}H_{24}$  ( $m/z$  mesuré à 300,1874) a été élué à 10,1 min. De plus, la précision de masse de 2 ppm a permis l'identification correcte avec une seule formule brute possible en utilisant les critères suivants : entre 1 et 100 atomes de carbone et d'hydrogène, entre 0 et 1 atome de soufre, azote et oxygène. À titre d'exemple, la différence en masse entre les deux composés utilisés dans l'exemple précédent ( $C_{20}H_{28}S$  et  $C_{23}H_{24}$ ) représente 10 ppm.

A l'aide de la HRMS, des cartographies spécifiques des composés de type  $C_xH_y$  peuvent être tracées. La Figure 117 illustre la cartographie spécifique des HAP dans le DSV 4. Des plages de DBE ont été délimitées et mises en évidence grâce à des rectangles de couleur. L'emplacement des analytes dans ces rectangles, à savoir plus au moins retenus en CPC, indique le degré d'alkylation : dans la partie inférieure, les composés sont non ou légèrement alkylés tandis que dans la partie supérieure, les composés sont fortement alkylés. Cette organisation permet de comparer

visuellement les échantillons. Par exemple, dans l'UCO<sub>1</sub>, des HAP ont été détectés avec un temps de rétention en SFC supérieure à 14 min correspondant à des composés avec un DBE de 18 et 19 (Figure 114). À l'inverse, sur la cartographie du DSV 4, le plus haut DBE visible est 17 (Figure 117). En effet, comme il a été mentionné dans l'introduction, les HAP présents dans la charge sont des précurseurs de la formation de HAP plus gros pendant le processus d'hydrocraquage, c'est pourquoi des DBE plus importants sont détectés dans l'UCO<sub>1</sub> par rapport au DSV 4. L'évolution de la concentration des HAP au cours des procédés de conversion sera détaillée dans la suite du chapitre. Par ailleurs, le temps de rétention en CPC des analytes avec un DBE de 13 (entre 8 et 10 min en SFC), est différent pour l'UCO<sub>1</sub> et le DSV 4. Pour l'UCO<sub>1</sub>, cette famille a été éluée entre 15 et 30 min en CPC, ce qui indique la présence de composés alkylés. À l'inverse, pour le DSV 4, cette famille a été éluée entre 10 et 17 min.

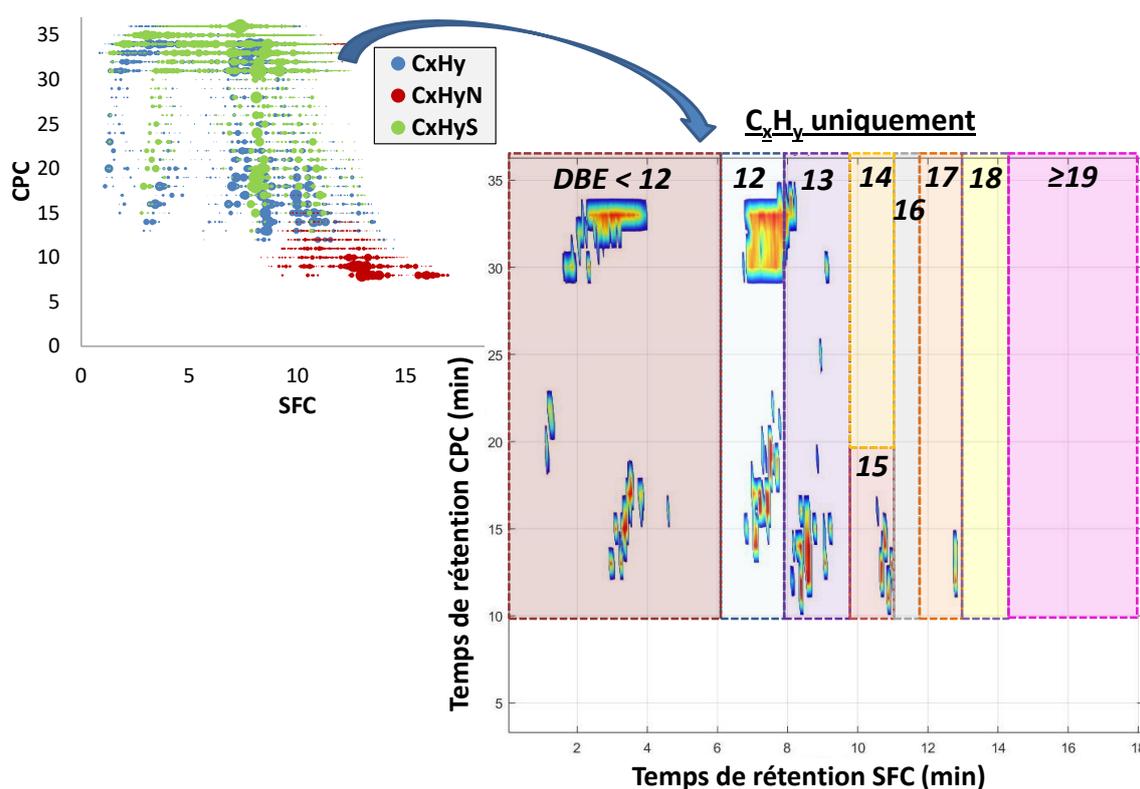


Figure 117 : Cartographie spécifique des composés C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> détectés dans le DSV 4 en APPI(+). Les aires colorées correspondent à des zones avec des DBE distincts indiqués en haut de chaque rectangle.

Pour apporter des informations supplémentaires, les spectres UV des composés provenant de l'UCO<sub>1</sub> et du DSV 4 ont été comparés à des étalons (Figure S9). Il est apparu que les composés ayant un DBE de 13 dans l'UCO<sub>1</sub> présentaient un spectre similaire à celui du pyrène. Cette observation est également vraie pour la famille avec un DBE de 14. En revanche, la majorité des composés avec un DBE de 13 dans le DSV 4 a un spectre similaire à celui du chrysène. L'hypothèse qui a pu être faite sur la base de toutes ces informations est que les composés avec un DBE de 13 et 14 dans l'UCO<sub>1</sub> appartiennent à la famille du pyrène mais avec des cycles naphthéniques supplémentaires qui pourraient expliquer la différence de DBE. Inversement, dans le DSV 4, ces composés pourraient correspondre à la famille du chrysène avec plus ou moins d'alkylations.

Ces conclusions ne peuvent être faites que grâce à la **combinaison des trois dimensions de séparation** développées dans cette étude. En effet, la spectrométrie de masse seule n'aurait pas pu faire la différence entre les composés avec un DBE de 13 par exemple.

La Figure 118 reprend l'ensemble de la méthode analytique développée avec les principaux mécanismes de rétention pour chaque dimension.

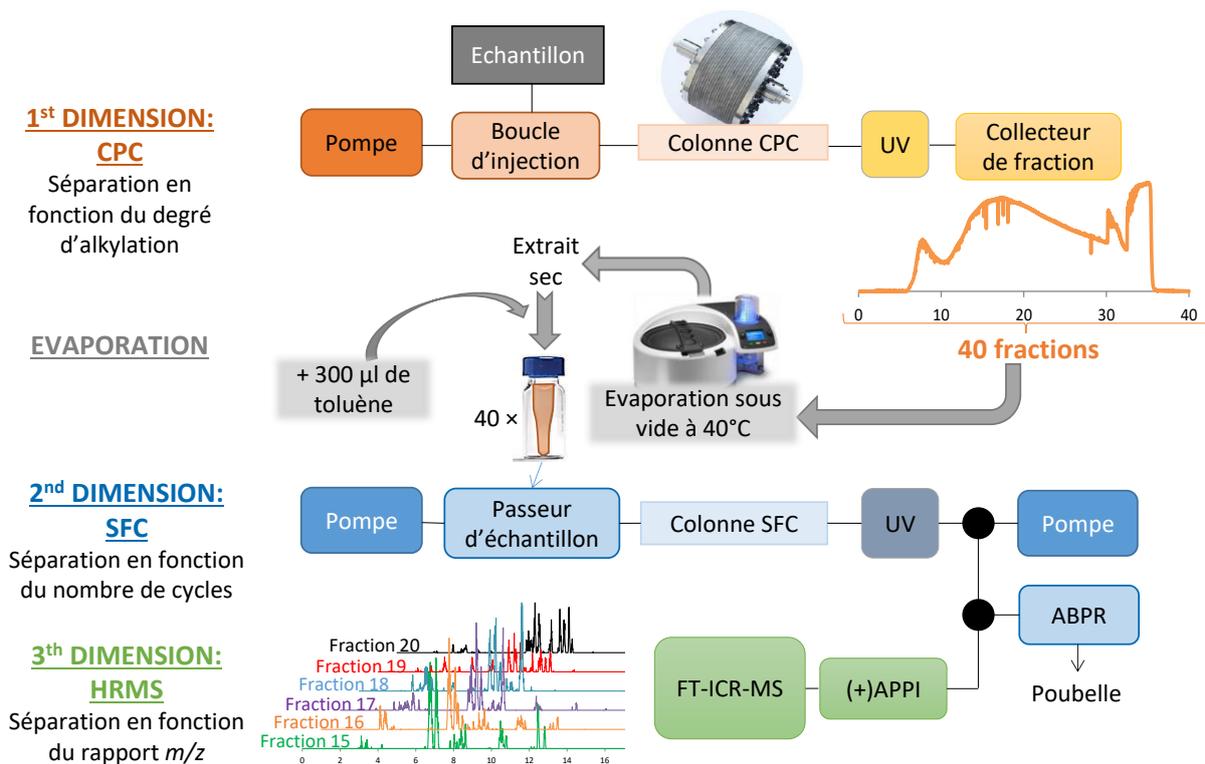


Figure 118 : Schéma de la méthode CPCxSFC/HRMS.

## 4. La CPCxSFC/HRMS, une méthode quantitative

### 4.1. Évaluation des effets de matrice

Afin d'évaluer l'aspect quantitatif de la méthode CPCxSFC/HRMS, les fractions CPC n°12, éluant entre 11 et 12 min, résultant de la séparation CPC du DSV 3 et 4 ont été dopées individuellement avec du **d-pyrène** à plusieurs concentrations comme cela a déjà été fait dans la partie précédente. La fraction n° 12 a été sélectionnée étant donné que le pyrène élué dans cette fraction avec le signal le plus élevé. La Figure 119 représente les aires des pics détectés par SFC/HRMS correspondant au d-pyrène en fonction de sa concentration. À l'opposé des DSV dopés et analysés en SFC/HRMS, toutes les fractions obtenues avec l'approche multidimensionnelle et dopées ne montrent pas de suppression d'ionisation et sont correctement alignées sur la courbe d'étalonnage.

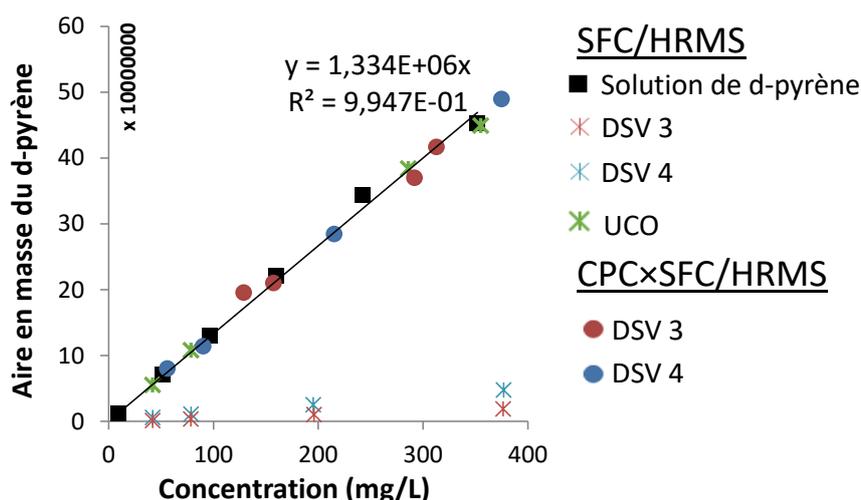


Figure 119 : Aire en HRMS du d-pyrène dans une solution étalon (carré noir) et dans les DSV 3 et 4 et UCO<sub>1</sub> dopés et analysés en SFC/HRMS (étoiles) et CPCxSFC/HRMS (ronds).

Ces résultats démontrent que l'utilisation de deux dimensions de séparation en amont de la spectrométrie de masse permet de limiter la compétition entre les analytes pendant l'étape d'ionisation et ainsi limiter les effets de matrice. Ainsi, ce couplage unique des trois dimensions, permet d'accéder à des données quantitatives des HAP dans les échantillons de type DSV ce qui est inédit à ce jour.

#### 4.2. Taux de récupération des échantillons

Afin d'appliquer notre méthode quantitative tridimensionnelle à un ensemble d'échantillons, certains points doivent être validés. Le premier concerne le taux de récupération des échantillons lors de l'analyse CPCxSFC/HRMS hors-ligne. En effet, l'étape d'évaporation se produisant entre le fractionnement CPC et l'analyse SFC, pourrait entraîner certaines pertes de l'échantillon.

Une solution d'anthracène, pyrène, pérylène, benzo(ghi)pérylène et coronène a été préparée à environ 50 mg/L. Cinq millilitres de cette solution ont été injectés en CPC. La méthode d'analyse complète a été appliquée, y compris l'étape d'évaporation. La cartographie 2D est présentée Figure S10. Les données obtenues ont été traitées comme détaillé dans le Chapitre 2. Les concentrations des étalons dans les 40 fractions ont été calculées grâce à un étalonnage externe. Sur la base de ces concentrations, les quantités d'étalons dans les fractions ont été calculées et additionnées. **Des taux de récupération supérieurs à 90 % pour tous les étalons de HAP, à l'exception de l'anthracène** (Tableau 30) ont été mesurés. Le taux de récupération plus faible de l'anthracène (82%), qui est le plus petit HAP du mélange avec trois cycles aromatiques, pourrait provenir d'une perte lors de l'évaporation des fractions CPC.

Tableau 30 : Taux de récupération des étalons analysés par la méthode hors-ligne CPCxSFC/HRMS

	Quantité d'étalon injectée en CPC (mg)	Quantité d'étalon mesurée avec la méthode CPCxSFC/HRMS (mg)	Taux de récupération (%)
<b>Anthracène</b>	0,231	0,189	82
<b>Pyrène</b>	0,224	0,219	98
<b>Pérylène</b>	0,233	0,210	90
<b>Benzo(ghi)pérylène</b>	0,238	0,220	93
<b>Coronène</b>	0,231	0,224	97

Sur la base de ces résultats, seuls les HAP ayant au moins 4 cycles aromatiques, soit à partir du pyrène, ont été quantifiés dans les DSV.

#### 4.3. Méthodologie pour quantifier les hydrocarbures aromatiques alkylés

Le deuxième point à discuter concerne la **quantification des HAP alkylés**. En effet, les DSV contiennent des hydrocarbures aromatiques qui peuvent avoir jusqu'à 50-60 atomes de carbone [110,112,116]. Pour quantifier ces composés plus ou moins alkylés, il est nécessaire de **comparer leurs facteurs de réponse aux composés homologues non alkylés, aussi nommés « têtes de famille »**.

Sept pyrènes alkylés, dont le méthylpyrène et le diméthylpyrène substitués en différentes positions, le 1-éthylpyrène, le 1-propylpyrène et le 1-butylpyrène ainsi que le 1-méthylcoronène, ont été sélectionnés pour étudier l'impact de l'alkylation sur la réponse de ces derniers en APPI(+) (Figure 120). 1 µL de chacun d'eux préparés à 200 mg/L a été injecté en SFC/HRMS.

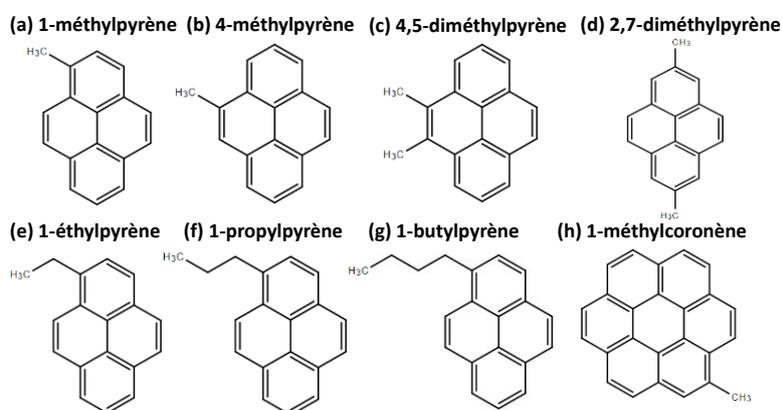


Figure 120 : Etalons de HAP alkylés étudiés pour la comparaison des facteurs de réponse.

Les spectres de masse du pyrène et des pyrènes alkylés sont présentés dans la Figure 119. Sur le spectre de masse du pyrène seul l'ion  $[M]^+•$  est formé, tandis que les pyrènes alkylés forment des ions supplémentaires provenant de la fragmentation en source des ions  $[M]^+•$ . En effet, les ions  $[M]^+•$  sont moins stables que les ions  $[M+H]^+$ , et fragmenteront donc plus facilement. La tendance des composés à s'ioniser sous forme  $[M]^+•$  ou  $[M+H]^+$  dépend de la nature de la molécule mais aussi des conditions expérimentales employées et notamment de la nature du dopant dans le cas de l'APPI. L'ionisation des analytes via un dopant peut avoir lieu soit par transfert de charge ou de proton. Si l'on souhaite privilégier le transfert de proton pour former majoritairement des ions  $[M+H]^+$ , il est nécessaire de sélectionner un dopant qui présente à la fois une faible énergie d'ionisation (IE) et une faible affinité protonique (PA). L'anisole, sélectionné ici, possède une énergie d'ionisation de 8,20 eV contre 8,83 eV pour le toluène [130]. Ces deux dopants possèdent une IE inférieure à l'énergie des photons de la lampe krypton et supérieure aux IE des HAP. Ainsi, ils peuvent ioniser par transfert de charge nos composés d'intérêt. Il a été démontré dans la partie consacrée à l'optimisation de la séparation SFC/HRMS que l'anisole permettait d'obtenir une meilleure sensibilité que le toluène. En revanche, l'affinité protonique de l'anisole est plus élevée que celle du toluène ou encore de l'acétone. Ainsi, ces deux derniers dopants seraient susceptibles de favoriser le transfert de proton. Cependant, l'utilisation de toluène comme dopant n'a pas permis de former des ions  $[M+H]^+$  lors du couplage SFC/HRMS. La très faible IE des HAP favorise le transfert de charge et il sera donc difficile de trouver des conditions permettant la formation des ions  $[M+H]^+$ . De plus, il est préférable de ne former qu'un type d'ions plutôt qu'un mélange d'ions radical et protonés. La fragmentation en

source des HAP alkylés formant des ions  $[M]^{+\bullet}$  instables est donc un phénomène difficilement évitable. Les conditions de désolvatation étant relativement douces (température du four tubulaire < 350°C et température du capillaire de transfert d'ions à 200°C), leur modification ne permettrait probablement pas de supprimer complètement la fragmentation.

Pour les méthylpyrènes et diméthylpyrènes, l'ion le plus intense reste  $[M]^{+\bullet}$ , à l'inverse, pour les pyrènes avec des chaînes alkylées plus longues (éthylpyrène, propylpyrène et butylpyrène),  $m/z$  215 qui correspond aux ions  $[M-CH_3]^+$ ,  $[M-C_2H_5]^+$  ou  $[M-C_3H_7]^+$  devient le plus intense. Cet ion à  $m/z$  215 est également visible sur les spectres de masse des méthylpyrènes et des diméthylpyrènes dans une moindre mesure, et correspondant respectivement aux ions  $[M-H]^+$  et  $[M-CH_3]^+$ . Enfin, les ions  $[M-H]^+$  sont également formés lors de l'ionisation des diméthylpyrènes. Tous les spectres de masse sont uniques, même pour deux isomères, et les intensités relatives de chaque ion sont différentes. Cette singularité est une grande source d'information qui peut permettre de distinguer le type d'alkylation (exemple : diméthylpyrène versus éthylpyrène). Cependant, elle conduit à une quantification plus complexe, en particulier pour le traitement des données.

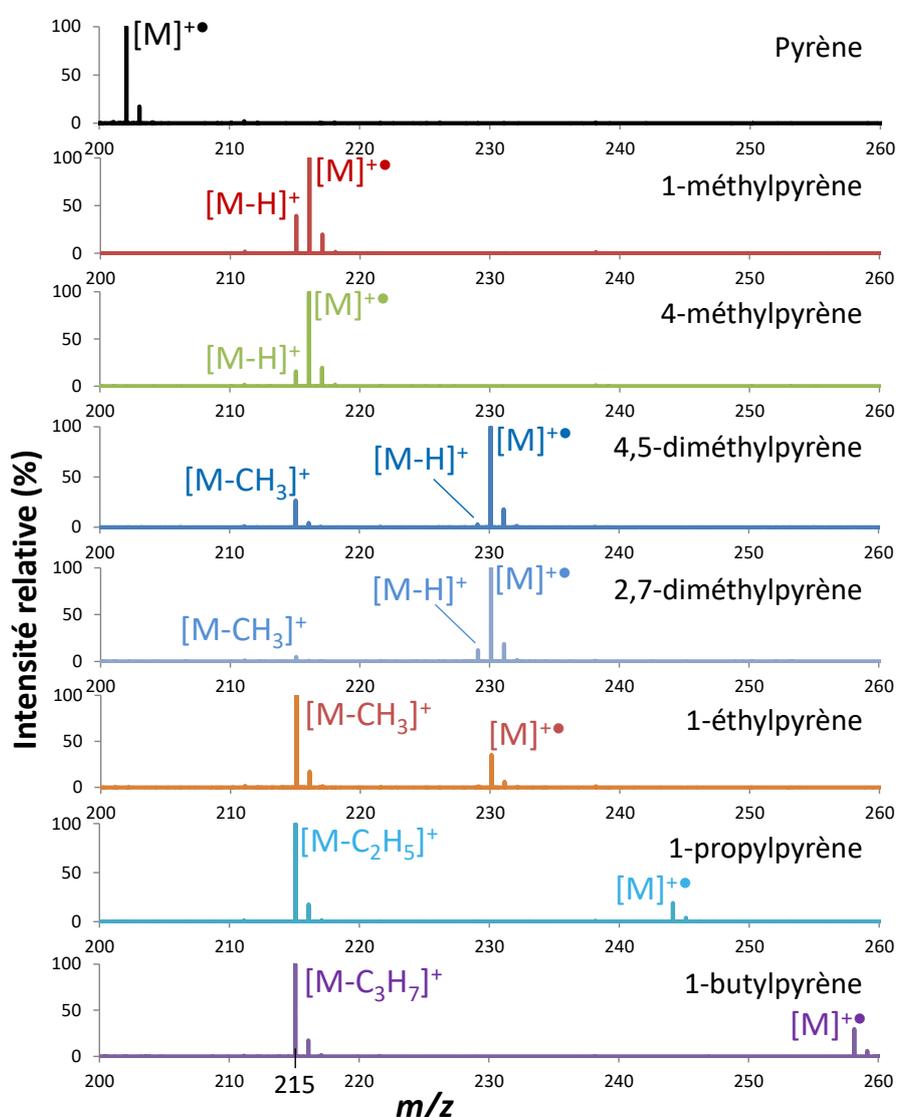


Figure 121 : Spectres de masse du pyrène et des pyrènes alkylés.

La quantification externe de l'ensemble des HAP alkylés présents dans les DSV avec des étalons n'est pas possible en raison de l'indisponibilité commerciale de tous les étalons et du fait que des milliers de composés sont présents dans les échantillons. C'est pourquoi, dans ce travail, nous avons décidé de réaliser **une quantification externe en utilisant la courbe d'étalonnage d'un seul étalon par DBE**. Par exemple, les composés ayant un DBE de 12 correspondent à la famille du pyrène, ces derniers seront donc quantifiés en utilisant la courbe d'étalonnage du pyrène. Cependant, pour appliquer cette méthodologie, **il est nécessaire de comparer les facteurs de réponse des HAP alkylés à ceux des têtes de famille**. Comme indiqué précédemment, les HAP alkylés forment plusieurs ions. Deux méthodes sont possibles pour prendre en compte tous les ions. La première (méthode #1) consiste à **quantifier individuellement chaque ion en utilisant la courbe d'étalonnage du pyrène, puis à additionner les concentrations calculées**. La seconde méthode (méthode #2) consiste d'abord à **additionner les aires des différents ions, puis à calculer la concentration globale du pyrène alkylé**. Les deux méthodes ont été appliquées et les résultats sont donnés dans le Tableau 31. Les deux méthodes ont donné des quantifications avec des erreurs relatives inférieures à 10%, sauf pour le 2,7-diméthylpyrène qui a été surestimé. Pour la majorité des cas, **la méthode #1 permet d'obtenir une quantification plus juste que la méthode #2**. Enfin, les pyrènes alkylés ont également été quantifiés en UV en utilisant la courbe d'étalonnage en UV du pyrène (Tableau 32). Malgré la sélection de la longueur d'onde permettant la réponse maximale pour chaque composé, des biais importants ont été observés en sous-estimant systématiquement les concentrations réelles.

Tableau 31 : Quantification des HAP alkylés en SFC/HRMS via la tête de famille selon les méthodes #1 et #2.

	Concentration (mg/L) des ions			Σ Concentrations (mg/L)	Erreur avec la methode#1 (%)	Concentration calculée avec la ΣAires (mg/L)	Erreur avec la methode#2 (%)
	[M] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>+</sup>	[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ou [M-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup> ou [M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>				
1-méthylpyrène	142	54	0	195	-2	211	5
4-méthylpyrène	179	25	0	203	2	212	6
4,5-diméthylpyrène	138	9	33	180	-10	193	-4
2,7-diméthylpyrène	231	23	9	263	31	278	39
1-éthylpyrène	50	0	152	201	1	216	8
1-propylpyrène	27	0	169	196	-1	205	3
1-butylpyrène	40	0	148	187	-6	199	-1
1-méthylcoronène	216	0	0	216	8	216	8

Tableau 32 : Quantification des pyrènes alkylés en SFC-UV via la courbe d'étalonnage du pyrène.

	Longueur d'onde (nm)	Concentration calculée en UV (mg/L)	Erreur (%)
1-méthylpyrène	336.6	153	-24
4-méthylpyrène	330.7	157	-22
4,5-diméthylpyrène	334.2	103	-48
2,7-diméthylpyrène	331.9	168	-16
1-éthylpyrène	335.4	147	-27
1-propylpyrène	336.6	140	-30
1-butylpyrène	336.6	138	-31

En conclusion, pour la suite, la méthode #1 utilisant la spectrométrie de masse a été employée pour quantifier les HAP dans les échantillons. **Tous les composés ayant un DBE de 12 ont été quantifiés à l'aide de la courbe d'étalonnage du pyrène. Le benz(a)anthracène a été utilisé pour quantifier les**

composés ayant un DBE de 13 et 14 ; le pérylène pour un DBE de 15 et 16 ; le benzo(ghi)pérylène pour un DBE de 17 et 18 et le coronène pour un DBE de 19 et 20. Une possible surestimation pourrait avoir lieu au vu de l'erreur faite sur le 2,7-diméthylpyrène. Toutefois, ces erreurs seront identiques entre les différents échantillons étant donné que les effets de matrices ont été limités par le couplage CPC×SFC. Ainsi, les comparaisons entre échantillons et le suivi de la concentration des HAP au cours d'un procédé d'hydrocraquage restent possibles.

## 5. Application de la méthode CPC×SFC/HRMS à plusieurs DSV

Six DSV dont certaines propriétés physico-chimiques sont décrites dans le Tableau 33 ont été analysés avec la méthode CPC×SFC/HRMS. Pour rappel, les DSV 1 à 4 sont des SRVGO (*Straight-Run Vacuum Gas Oil*) obtenus directement à partir de la distillation sous vide de pétroles bruts. Le DSV 5 a été obtenu suite à un procédé de conversion (DC-VGO pour *Deep Conversion Vacuum Gas Oil*). Enfin le DSV 6 est un mélange 50/50 (v/v) d'un SRVGO et d'un DC-VGO.

Tableau 33 : Propriétés des DSV étudiés

Echantillons	Type	Masse volumique à 15°C (g/cm <sup>3</sup> )	Température d'ébullition à 5 et 95% du poids distillé (°C)	Soufre (mg/kg)	Azote (mg/kg)
		ASTM D4052	ASTM D2887	ASTM D2622	ASTM D4629
DSV 1	SRVGO	0,9208	265 – 509	2974	1160
DSV 2	SRVGO	0,9211	342 – 561	15351	1404
DSV 3	SRVGO	0,9244	352 – 544	25792	982
DSV 4	SRVGO	0,9284	394 – 581	18921	1395
DSV 5	DC-VGO	0,9306	390 – 567	6702	3510
DSV 6	SRVGO + DC-VGO	0,9314	346 – 551	10777	2610

### 5.1. Description des cartographies

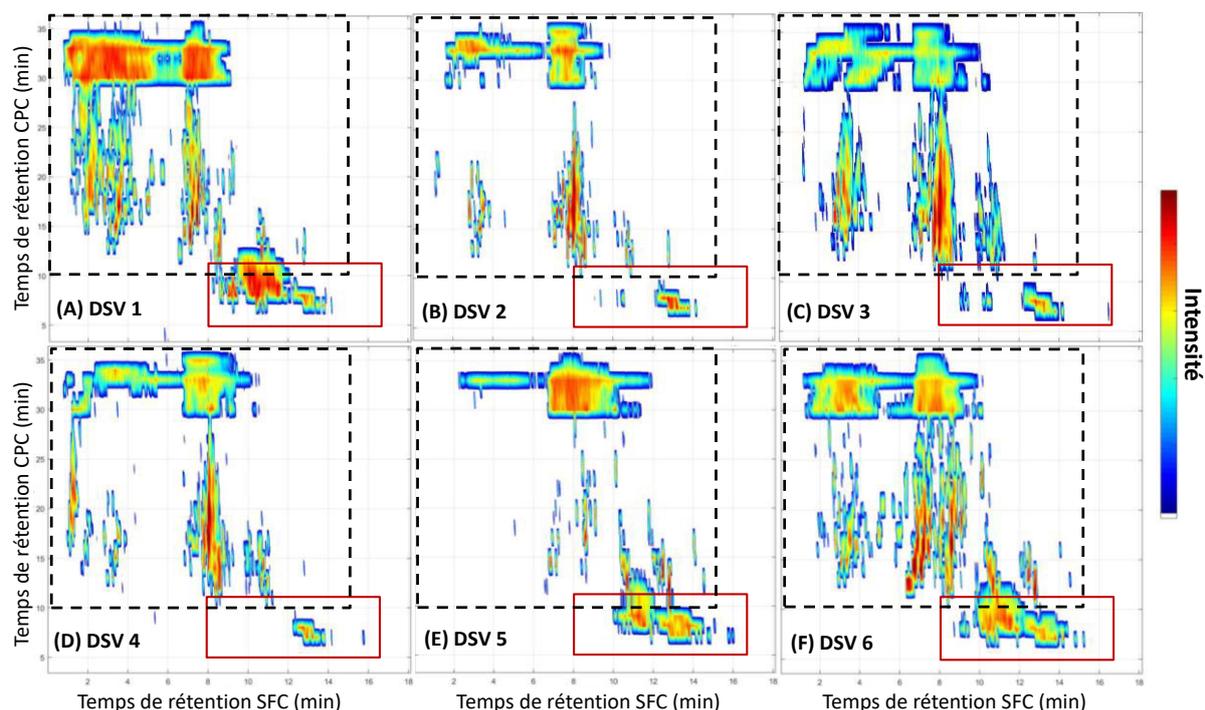
Les six VGO ont été analysées à l'aide de la méthode CPC×SFC/HRMS, ce qui a permis d'obtenir une **cartographie 2D spécifique à chaque échantillon** (Figure 122). Ces représentations sont des **empreintes uniques reflétant la composition des échantillons** et permettant de révéler des différences au sein d'un même type de DSV (*i.e.* SRVGO). L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution permet de déterminer une formule moléculaire pour chaque pic sur les cartographies CPC×SFC. Ainsi, les HAP peuvent être différenciés des espèces contenant des hétéroéléments.

La teneur en azote dans les échantillons étudiés varie de 0,10% à 0,35% en poids. Ces composés azotés correspondent à des molécules azotées "neutres" ou "basiques" dont les structures sont basées respectivement sur un noyau d'acridine ou de carbazole. Lorsqu'une approche analytique classique est utilisée, impliquant un détecteur non informatif tel qu'un détecteur à ionisation de flamme pour la chromatographie en phase gazeuse, les espèces azotées doivent être éliminées avant l'analyse quantitative car elles ont tendance à co-éluer avec les hydrocarbures. Selon les cartographies CPC×SFC illustrées sur la Figure 122, **les composés azotés des DSV ont été spécifiquement élués dans les premières fractions en CPC** du fait de leur répartition principalement dans la phase mobile en CPC (celle enrichie en acétonitrile). En revanche, les interactions entre les

groupements polaires de la phase stationnaire utilisées en SFC et les groupements azotés des analytes ont permis à ces derniers d'être retenus en SFC. Un rectangle rouge sur la Figure 122 indique sur chaque cartographie la zone d'élution des composés azotés.

À l'opposé des composés contenant de l'azote, **les HAP ont été détectés tout au long de la séparation par CPC** (rectangles noirs sur la Figure 122). Ainsi, **les composés azotés et les hydrocarbures ont été directement et facilement différenciés grâce aux conditions de séparation orthogonale de la CPCxSFC.**

En ce qui concerne les composés contenant du soufre, ils sont généralement présents dans les DSV sous forme d'alkyles et de polybenzothiophènes. Dans les échantillons étudiés, les teneurs en soufre couvraient une large gamme de valeurs allant de 0,30 à 2,58% en poids de soufre. Dans nos conditions d'analyse, **les composés soufrés ont été élués tout au long de la séparation en CPC** (c'est-à-dire de 10 à 40 min) dans les mêmes zones d'élution que celles des HAP (rectangles noirs sur la Figure 122). En effet, les composés aromatiques contenant du soufre ont des propriétés chimiques proches de celles des hydrocarbures aromatiques, ce qui entraîne une rétention similaire en CPC et SFC. Par exemple, le pyrène ( $C_{16}H_{10}$ , DBE 12) et le dibenzothiophène ( $C_{16}H_{10}S$ , DBE 12) ont tous deux été élués entre 13 et 14 min en CPC, et à 6,5 et 7,9 min respectivement en SFC ; tandis que le benzocarbazole ou l'aminopyrène ( $C_{16}H_{11}N$ , DBE 12) a été élué entre 7 et 8 min en CPC et entre 13,8 et 14,6 min en SFC. **Dans le cas des composés soufrés, un traitement spécifique des données HRMS doit donc être effectué pour faire la distinction entre les molécules contenant du soufre et les HAP.**



**Figure 122 : Cartographies CPCxSFC/HRMS des six DSV analysés. La zone d'élution des HAP et composés soufrés est encadrée en noir, celle des composés azotés est encadrée en rouge.**

Ce traitement donne lieu à des **cartographies 2D consacrés uniquement aux hydrocarbures** (composés  $C_xH_y$ ), comme le montre la Figure 123. Étant donné que les hydrocarbures ont été élués lors de la séparation en SFC en fonction de leur nombre d'insaturations, les temps de rétention en SFC ont été utilisés pour subdiviser les cartographies 2D en fonction du DBE des HAP. Il a alors été possible d'obtenir des chromatogrammes CPCxSFC organisés, fournissant une structuration

pertinente basée sur les valeurs du DBE, allant d'un DBE inférieur à 12 jusqu'à 19 et plus. De plus, pour un DBE donné, la position verticale (temps de rétention en CPC) d'un pic chromatographique est révélatrice du niveau d'alkylation du composé. En effet, dans la première partie de ce chapitre, il a été démontré que la rétention en CPC était basée sur le nombre d'atomes de carbone pour un DBE donné. Ainsi, les « têtes de famille » éluent en début de CPC, puis leurs homologues alkylés éluent dans un second temps.

A noter que les intensités sur les cartographies sont relatives et qu'il n'est donc pas possible de comparer directement les intensités entre les différents DSV. Pour aller plus loin, la méthodologie de quantification mise en place précédemment a été appliquée aux six échantillons et les teneurs en HAP ont été mesurées pour chaque DSV à partir du DBE 12. Bien que les HAP ayant un DBE inférieur à 12 n'aient pas été quantifiés en raison des pertes pendant l'étape d'évaporation, les cartographies 2D de la Figure 123 montrent un grand nombre de pics dans le DSV 1 ainsi que dans le DSV 6, alors que la zone consacrée à cette classe de DBE était presque vide dans le DSV 5.

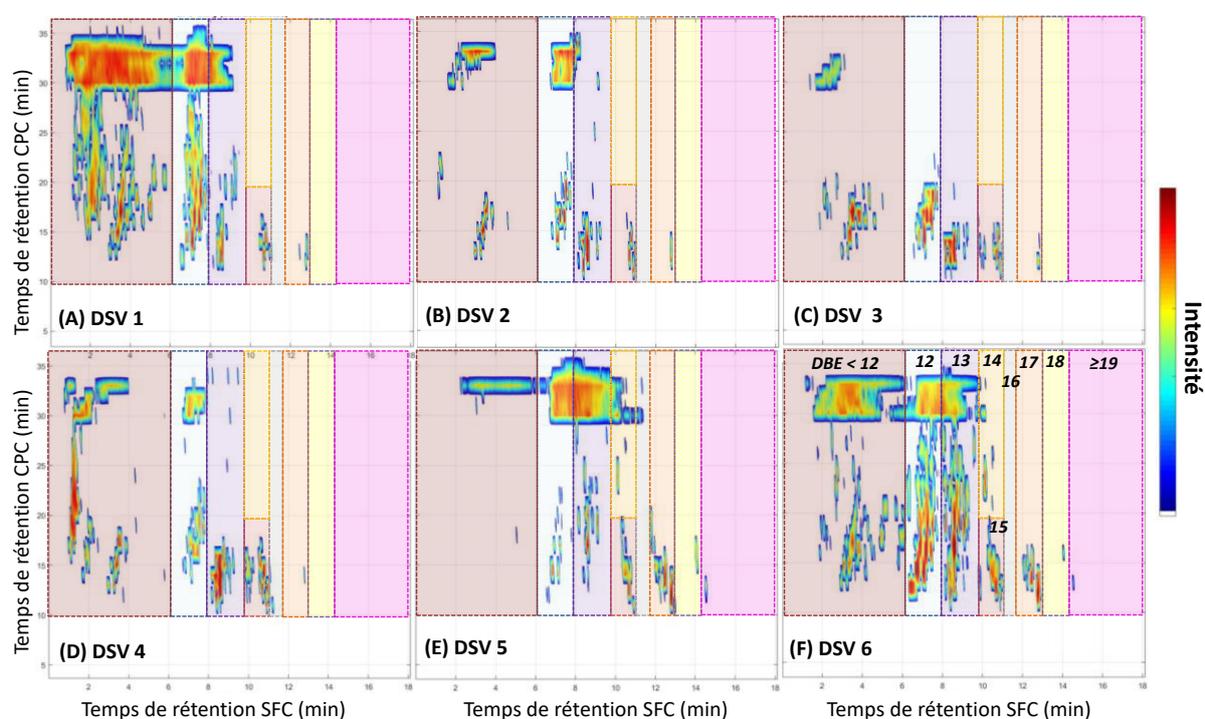


Figure 123 : Cartographies CPC×SFC/HRMS spécifiques des composés  $C_xH_y$  détectés dans les six DSV analysés. Les rectangles colorés correspondent aux zones d'élution selon le DBE (se référer à la cartographie F pour la légende).

## 5.2. Quantification des HAP dans les DSV

Les teneurs en HAP mesurées pour les six échantillons étudiés à partir des analyses CPC×SFC/HRMS sont indiquées dans le Tableau 34. Globalement, **les teneurs en HAP diminuent avec les valeurs de DBE** et sont **réparties sur une large gamme de concentrations en fonction de la valeur du DBE et du DSV considérés**. Par exemple, les teneurs en HAP varient de 6296 ppm (DSV 3) à 14357 ppm (DSV 1) si l'on considère une valeur DBE égale à 12. **Tous les DSV contiennent des HAP à des concentrations significatives pour les DBE compris entre 12 et 17**, tandis que **seuls les DSV avec des hautes densités (DSV 4, 5 et 6) contiennent des HAP avec un DBE égal à 18**. **Un seul échantillon, le DSV 5 provenant d'un processus de conversion, contient des HAP avec un DBE de 20**.

Tableau 34 : Concentrations des HAP (en ppm) par DBE dans les six DSV.

DBE	<i>DSV 1</i> <i>SRVGO</i>	<i>DSV 2</i> <i>SRVGO</i>	<i>DSV 3</i> <i>SRVGO</i>	<i>DSV 4</i> <i>SRVGO</i>	<i>DSV 5</i> <i>DC-VGO</i>	<i>DSV 6</i> <i>Mélange</i>
<b>12</b>	14357	10090	6296	8240	11905	13315
<b>13</b>	6215	4732	2382	4521	8748	7517
<b>14</b>	2909	1808	800	2098	6753	3418
<b>15</b>	952	1085	980	1749	3022	1616
<b>16</b>	13	85	91	234	1933	501
<b>17</b>	107	95	89	135	1916	767
<b>18</b>	0	7	5	34	614	54
<b>19</b>	0	0	0	0	65	24
<b>20</b>	0	0	0	0	41	2
<b>Total</b>	24554	17902	10642	17010	34998	27214

L'approche tridimensionnelle CPCxSFC/HRMS développée dans cette étude a offert une description détaillée et quantitative de la composition des HAP pour les DSV étudiés. Grâce à la haute résolution fournie par la chromatographie bidimensionnelle et par la spectrométrie de masse, il a été possible d'obtenir plus d'informations sur les HAP présents dans les DSV, y compris des données sur leur niveau d'alkylation. Parmi l'ensemble des distillats sous vide étudiés dans le cadre de ce travail, deux échantillons différents ont été sélectionnés à titre d'exemple : un DSV de type SRVGO de moyenne densité (DSV 3) et un DSV provenant d'un processus de conversion (DSV 5). Pour chaque échantillon, le DBE en fonction du nombre d'atomes de carbone (nC) a été tracé en indiquant la concentration en HAP grâce à la taille des points (Figure 124). Une telle représentation est classiquement utilisée pour décrire des produits complexes et doit généralement être considérée d'un point de vue qualitatif en raison des effets de matrice qui empêchent la quantification lorsque l'échantillon est introduit en HRMS par infusion directe sans séparation chromatographique préalable [115]. Cependant, dans notre cas, l'utilisation de la CPCxSFC permet de réduire ces effets de matrice et fournit une quantification des HAP. **Par conséquent, les points tracés sur la Figure 124 représentent les teneurs en HAP et non les intensités du signal en HRMS, de sorte que les compositions des DSV peuvent être directement comparées entre elles.** Par exemple, les niveaux d'alkylation des HAP dépendent notamment du DBE et du type de DSV : les HAP avec un faible DBE et un faible degré d'alkylation (chaînes CH<sub>2</sub> courtes et/ou peu nombreuses) sont principalement observés pour le DSV 3, tandis que les HAP sont répartis sur une plus large gamme de DBE avec des chaînes alkyles assez longues ou nombreuses pour le DSV 5. À partir des données CPCxSFC/HRMS, il est également possible de calculer une **"moyenne pondérée du nombre d'atomes de carbone"** en pondérant le nombre d'atomes de carbone de tous les HAP avec le même DBE par la teneur de chaque hydrocarbure. Ces nombres moyens d'atomes de carbone, tracés en pointillés sur la Figure 124, prennent en compte simultanément le nombre d'atomes de carbone dans les cycles aromatiques et dans les chaînes alkyles et peuvent être considérés comme un centre de gravité dédié à chaque famille de DBE.

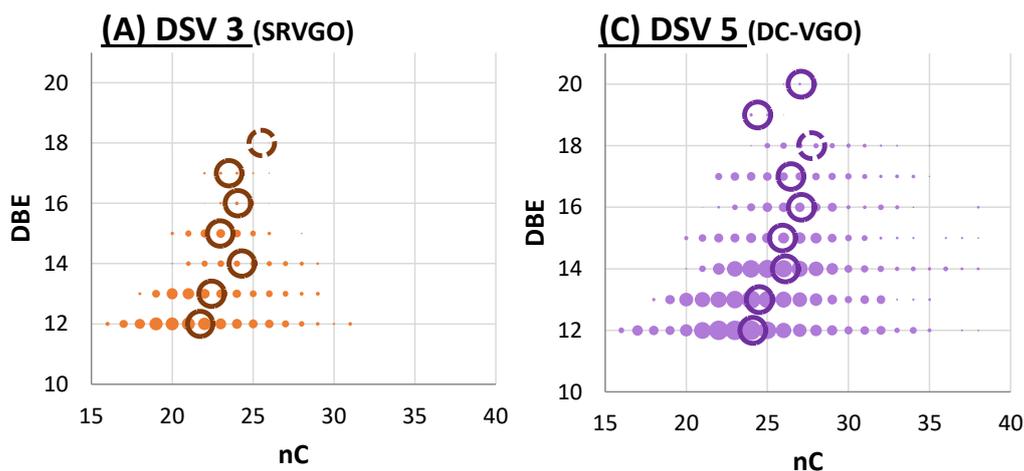


Figure 124 : DBE en fonction du nC pour (A) le DSV 3 et (B) le DSV 5 ; les lignes en pointillées correspondent à la moyenne pondérée de nC.

L'évolution des moyennes pondérées de nC en fonction des valeurs de DBE pour les six DSV est illustrée sur la Figure 125. À titre de comparaison, les HAP n'ayant pas de substituant alkyle (c'est-à-dire les « têtes de famille » : pyrène, le benz(a)anthracène, le pérylène, le benzo(ghi)pérylène et le coronène) ont également été tracés comme références dans la Figure 125.

Il apparaît clairement que **l'écart du nombre pondéré de nC entre les HAP dans les DSV et les « têtes de famille » est plus élevé pour les plus faibles DBE et tend à se réduire pour une valeur croissante du DBE**. Pour un DBE de 12, la référence non alkylée, le pyrène, est constituée de 16 atomes de carbone alors que dans les DSV, la moyenne pondérée de nC est comprise entre 22 (DSV 3) et 24 (DSV 5). Ainsi, **les composés avec un noyau de pyrène sont alkylés avec en moyenne 8 atomes de carbone pour le DSV 5. Pour les HAP plus lourds, le niveau d'alkylation est plus faible** avec, par exemple, deux atomes de carbone en moyenne dans la chaîne alkyle pour les composés ayant un DBE de 17 dans le DSV 6 (sur la base du benzo(ghi)pérylène comme référence non alkylée). **Cette différence de degré d'alkylation entre les DBE est également observée directement sur les cartographies 2D** de la Figure 123. En effet, les HAP avec un DBE  $\geq 17$  n'ont été élués que dans la première partie du CPC alors que les HAP ayant un DBE compris entre 12 et 14 ont été élués tout au long de la séparation en CPC, jusqu'à l'extrusion de la phase stationnaire. Par ailleurs, comme l'indique le Tableau 34, **le DSV 5 provenant d'un procédé de conversion présente une composition particulière par rapport aux SRVGO (DSV 1 à 4)** : en plus de contenir les HAP les plus lourds (avec un DBE de 19 et 20), **le DSV 5 présente un degré d'alkylation plus important que les autres DSV**. Enfin, il semble que le DSV 1 ait un nombre moyen d'atomes de carbone, pour les composés avec un DBE de 16, inférieur par rapport aux autres DSV. Or, le DSV 1 est celui qui a la teneur la plus basse en composés avec un DBE de 16 (13 ppm dans le DSV 1 contre de 85 à 1933 ppm dans les autres DSV). Deux hypothèses sont alors possibles : (1) la concentration est trop basse pour faire une moyenne pondérée du nC ou (2) le peu de composés avec un DBE 16 sont peu alkylés. L'ensemble des graphiques représentant la concentration en fonction du nC pour les DBE 12 à 20 sont disponibles en Figure S11. Pour le DBE 16, il semble que les composés soient peu alkylés, d'où une moyenne pondérée de nC d'environ 23.

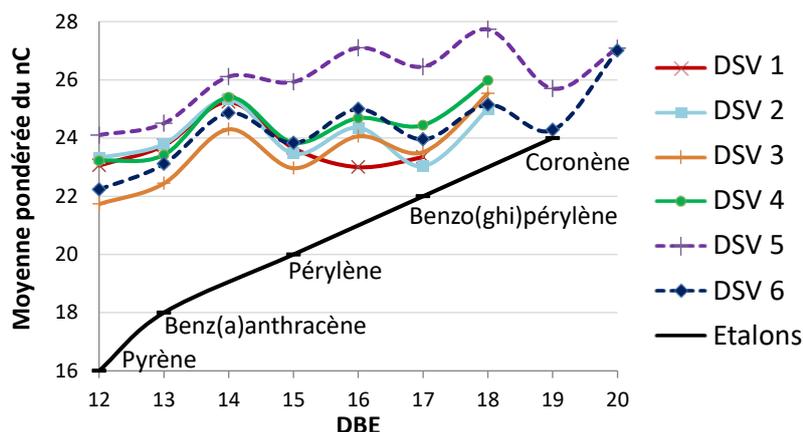


Figure 125 : Moyenne pondérée du nombre d'atomes de carbone en fonction du DBE.

Par ailleurs, dans la partie consacrée à la méthodologie pour quantifier les HAP, nous avons démontré que **les spectres de masse des HAP alkylés étaient différents selon le type de chaîne alkylée**. Ainsi, le diméthylpyrène peut être différencié de l'éthylpyrène par exemple. Les spectres de masse des principaux composés appartenant à la famille du pyrène (DBE 12) dans le DSV 6 avec un, deux et trois atomes de carbone dans la chaîne alkylée sont présentés sur la Figure 126. **Pour tous ces composés,  $[M]^{+\bullet}$  est l'ion majoritaire, ce qui signifie qu'au lieu d'une longue chaîne alkylée comme les groupements éthyle ou propyle, les atomes de carbone sont partagés en plusieurs groupes méthyles**. Ce type d'information sur l'isomérisation des chaînes alkyles devrait être très utile pour mieux comprendre le rôle joué par les HAP dans la réactivité des DSV lors des processus d'hydrotraitement et d'hydrocraquage.

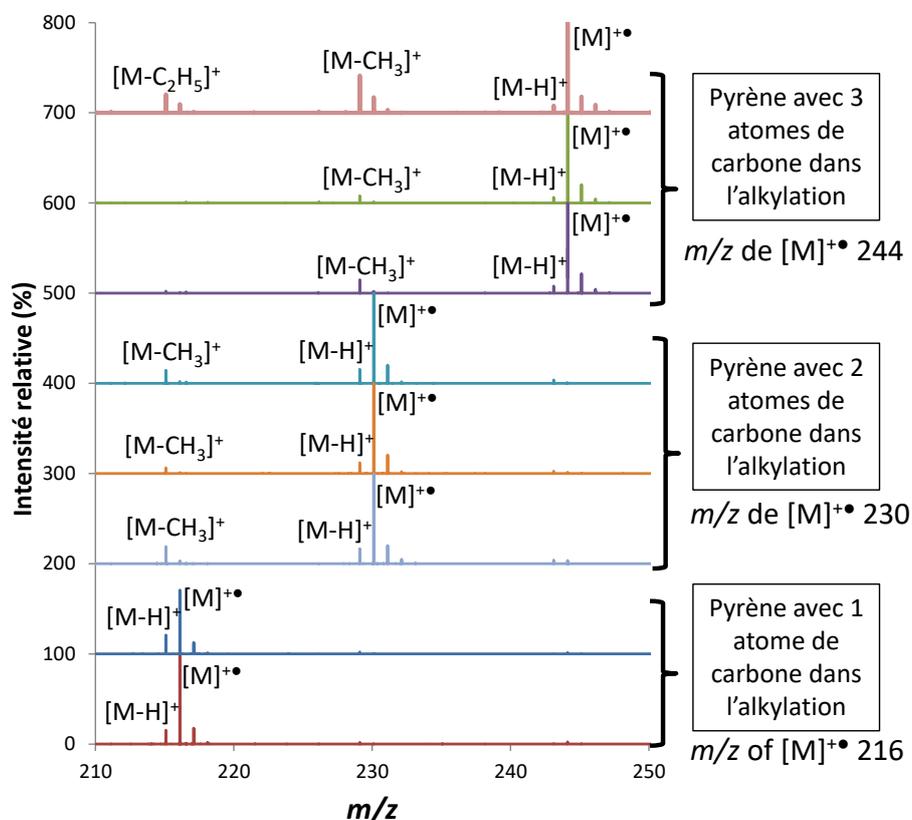


Figure 126 : Spectres de masse des principaux composés appartenant à la famille du pyrène (DBE 12) dans le DSV 6 avec un, deux et trois atomes de carbone dans la chaîne alkylée.

En conclusion, la méthode analytique développée pour les HAP dans les DSV permet pour la première fois d'avoir accès à des données quantitatives. Ainsi, **il est possible de déterminer la nature et la concentration des HAP dans les charges de départ pour les procédés de conversion. Selon la provenance du distillat sous vide, nous avons vu que des HAP avec 8 cycles aromatiques pouvaient être présents.** En revanche, **pour l'ensemble des DSV, il s'est avéré que le degré d'alkylation diminue avec le DBE.** En effet, les composés avec un DBE de 12 sont étendus sur une plus large gamme de nombre d'atomes de carbone en comparaison avec des composés ayant des DBE plus élevés. **Enfin, l'analyse des DSV par CPC×SFC/HRMS permet une caractérisation plus juste qu'une analyse par SFC/HRMS ou par introduction directe en HRMS.** En effet, comme nous l'avions observé, une forte suppression d'ionisation a lieu lors de l'analyse des DSV par SFC/HRMS liée à la compétition d'ionisation des analytes entrant simultanément dans la source d'ionisation. Lorsque la moyenne pondérée du nombre d'atomes de carbone est calculée en se basant sur l'intensité des ions détectés en SFC/HRMS, il s'avère que ce nombre moyen d'atomes de carbone pour un DBE donné est supérieur à celui calculé via l'analyse CPC×SFC/HRMS. À titre d'exemple, pour les composés ayant un DBE de 12 détectés dans le DSV 4, le nombre de nC moyen mesuré par SFC/HRMS est d'environ 37, tandis que ce dernier est de seulement 23 par CPC×SFC/HRMS. Il semble donc que les composés très alkylés soient préférentiellement ionisés par rapport aux analytes peu alkylés, ce qui crée un biais dans la caractérisation des DSV. **Le couplage de la CPC et de la SFC en amont de la HRMS est donc requis pour accéder à une caractérisation plus juste, reflétant la composition réelle des DSV.**

### 5.3. Composés soufrés et azotés

**Bien que les composés soufrés et azotés n'aient pas été quantifiés dans cette étude, il est toutefois intéressant de comparer les résultats obtenus par CPC×SFC/HRMS pour les différents échantillons.**

Les sommes des aires de l'ensemble des composés azotés et soufrés détectés dans les différents DSV sont présentées Figure 127. Un axe vertical secondaire indique également les concentrations en soufre et en azote élémentaires, mesurées par d'autres techniques analytiques. Concernant les composés soufrés, les sommes des aires sont en concordance avec les concentrations élémentaires. Par exemple, la plus grande somme des aires est mesurée dans le DSV 3 tandis que la plus basse est dans le DSV 1. Étant donné que les composés soufrés ont été élués sur une large plage de rétention en CPC et SFC, il est probable que la méthode CPC×SFC/HRMS permette également de les quantifier. En revanche, la somme des aires des composés azotés ne suit pas toujours la concentration élémentaire en azote total. Bien que les DSV 5 et 6 soient les échantillons ayant les plus grandes valeurs en termes de sommes des aires et de concentrations élémentaires, les concentrations des autres DSV ne suivent pas les sommes des aires. Il est possible que l'ensemble des composés azotés n'aient pas été détectés étant donné que seul la source APPI(+) a été employée. Habituellement, ces composés sont détectés en combinant la source d'ionisation ESI en modes positif et négatif, ainsi les composés azotés basiques et neutres peuvent être ionisés. De plus, l'objectif de ces travaux était de quantifier les HAP, la méthode CPC développée permettant seulement d'isoler les composés azotés dans les premières fractions. Bien que la SFC permette de les retenir, ces derniers sont co-élués entre eux et un effet de matrice peut donc se produire. Enfin, le degré et la position des alkylations pourraient également avoir un impact important sur la réponse des molécules azotées.

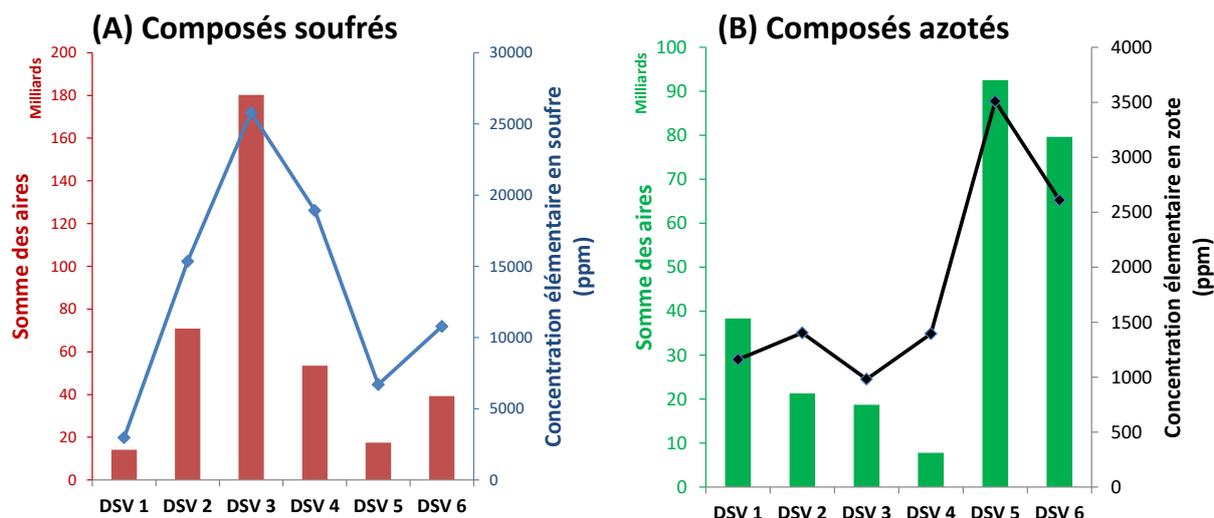


Figure 127 : Sommes des aires en CPCxSFC/HRMS (A) des composés sulfurés et (B) azotés dans les six DSV et comparaison aux concentrations élémentaires.

## 6. Suivi de la concentration des HAP au cours des procédés de conversion

Dans la section précédente, les HAP ont été quantifiés dans plusieurs DSV. Dans cette partie, le DSV 2 a été sélectionné et les sous-produits provenant de l'hydrotraitement et de l'hydrocraquage de cette charge ont été caractérisés en termes de concentrations de HAP afin d'avoir une vue globale de leur évolution. Les charges non converties (UCO) ne contenant pas ou peu de composés sulfurés et azotés, peuvent donc être analysées par SFC/HRMS. Ainsi, les dimensions SFC et HRMS sont communes à l'analyse des DSV et des sous-produits ce qui permet de comparer facilement les données.

L'évolution des HAP dans une unité d'hydrocraquage en une étape avec recycle au niveau du réacteur d'hydrotraitement a été étudiée. Les prises d'échantillon sont indiquées par des bulles bleues sur la Figure 128. **Dans un premier temps, deux prises d'échantillon ont été effectuées avant le démarrage du débit de recycle.** Dans la suite de ce chapitre, on nommera ces échantillons HDT- $t_0$  pour la charge hydrotraitée en sortie de R1 et UCO- $t_0$  la coupe de température d'ébullition supérieure à 370°C+ issue des étapes d'hydrotraitement et d'hydrocraquage. **Dans un second temps, cinq échantillons nommés UCO- $t_1$ , UCO- $t_2$ , UCO- $t_3$ , UCO- $t_4$  et UCO- $t_5$  ont été prélevés à plusieurs temps sous charge (procédé opéré en continu) après le démarrage du débit de recycle.**

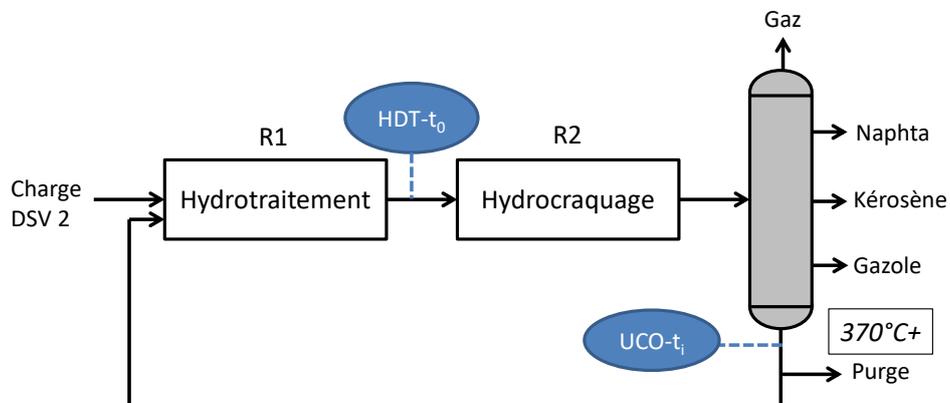


Figure 128 : Schéma de l'unité d'hydrocraquage

Le Tableau 35 résume les conditions expérimentales avec lesquelles ces échantillons ont été obtenus.

Tableau 35 : Paramètres expérimentaux du procédé pendant l'échantillonnage des différents produits HDT et UCO

Echantillons	Temps sous charge (h)	Température R1 (°C)	Température R2 (°C)	Rendement en coupe 370°C+ (% p/p)
HDT-t <sub>0</sub>	0	T <sub>0</sub>	T <sub>0</sub>	49,7
UCO-t <sub>0</sub>				
UCO-t <sub>1</sub>	583	T <sub>0</sub> +3°C	T <sub>0</sub> +10°C	49,6
UCO-t <sub>2</sub>	847	T <sub>0</sub> +3°C	T <sub>0</sub> +22°C	45,4
UCO-t <sub>3</sub>	1015	T <sub>0</sub> +7°C	T <sub>0</sub> +25°C	48,7
UCO-t <sub>4</sub>	1135	T <sub>0</sub> +7°C	T <sub>0</sub> +29°C	45,8
UCO-t <sub>5</sub>	1207	T <sub>0</sub> +7°C	T <sub>0</sub> +31°C	47,2

### 6.1. Suivi de l'unité avec un débit de recycle nul

Tout d'abord, le DSV 2 a été hydrotraité. Ensuite, l'échantillon HDT-t<sub>0</sub> a été hydrocraqué pour convertir le DSV en produits plus légers. Les HAP ont été quantifiés dans la charge, HDT-t<sub>0</sub> et UCO-t<sub>0</sub>. Toutefois, en l'état, les concentrations ne sont pas directement comparables. En effet, l'UCO-t<sub>0</sub> résultant de la distillation, les HAP ont été concentrés dans ce dernier. Afin de comparer les concentrations dans ces trois échantillons, les concentrations mesurées dans l'UCO-t<sub>0</sub> ont donc été multipliées par le rendement de la coupe 370°C+ (de température d'ébullition supérieure à 370°C), on nommera alors l'échantillon UCO-t<sub>0</sub>\*. De cette façon, les résultats sont ramenés à la quantité de HAP par kg de charge. Autrement dit, cela revient à mesurer la concentration en sortie de R2, avant distillation. Les résultats sont présentés dans la Figure 129.

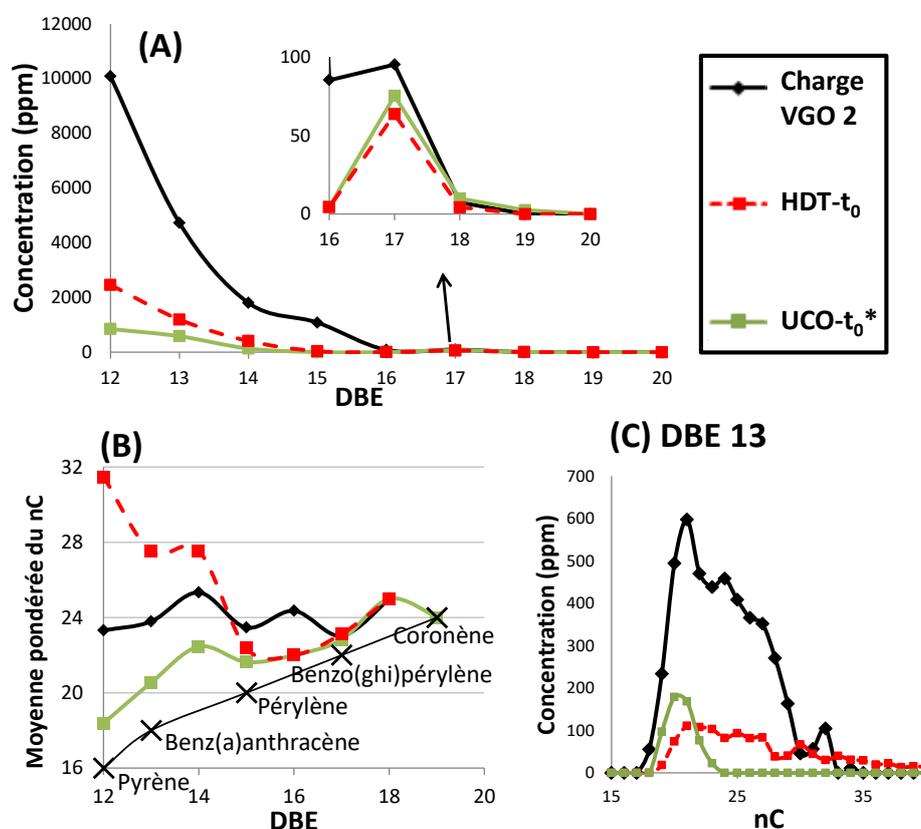


Figure 129 : Évolution des (A) concentration des HAP par DBE, (B) moyenne pondérée du nombre d'atomes de carbone pour chaque DBE et (C) concentration en fonction du nC pour le DBE 13 dans les VGO 2, HDT-t<sub>0</sub> et UCO-t<sub>0</sub>\*

L'évolution des teneurs en HAP dans le VGO 2, HDT-t<sub>0</sub> et UCO-t<sub>0</sub>\* en fonction du DBE est présentée à la Figure 129(A). Dans un premier temps, nous observons **une nette baisse des concentrations lors de l'hydrotraitement pour les HAP ayant un DBE compris entre 12 et 16**, indiquant **une forte hydrogénation** de ces espèces aromatiques dans les conditions de procédé étudiées. Par exemple, la concentration des composés ayant un DBE de 12 a été divisée par 4 entre le VGO 2 et HDT-t<sub>0</sub>. En ce qui concerne les HAP ayant un DBE supérieur à 17, aucun changement notable n'a pu être observé étant donné des faibles concentrations mesurées (inférieures à 10 ppm). De même, **lors de l'hydrocraquage, une diminution de la concentration des composés ayant un DBE compris entre 12 et 16 a été observée**, mais dans une moindre mesure par rapport à la diminution qui s'est produite lors de l'hydrotraitement. La concentration des composés ayant un DBE de 12 a été cette fois-ci divisée par un facteur inférieur à 3.

Ensuite, l'évolution de la moyenne pondérée du nC en fonction du DBE est illustrée sur la Figure 129(B). Au départ, **le VGO 2 contient des HAP dont le degré d'alkylation diminue avec la valeur du DBE** en considérant l'écart entre les moyennes pondérées du nC des HAP dans le VGO 2 et les références non alkylées. Au cours de l'hydrotraitement, la moyenne pondérée du nC augmente pour les DBE 12, 13 et 14 entre le VGO 2 et HDT-t<sub>0</sub>. **Cette observation peut indiquer que les HAP ayant un faible niveau d'alkylation ont été de préférence hydrotraités**. Pour les DBE de 15 à 18, cette observation n'a pas pu être faite étant donné que ces HAP déjà présents dans le VGO 2 n'étaient que légèrement alkylés initialement. Au contraire, le niveau d'alkylation était plutôt constant dans l'UCO-t<sub>0</sub>, quelle que soit la valeur du DBE. En effet, l'écart entre la moyenne pondérée du nC mesurée pour les HAP dans l'UCO-t<sub>0</sub> et les références non alkylées est compris entre un et trois pour toutes les valeurs de DBE. **La forte diminution de la moyenne pondérée du nC entre HDT-t<sub>0</sub> et UCO-t<sub>0</sub> pour les DBE 12, 13 et 14 est la conséquence des réactions de craquage des HAP hautement alkylés.**

**Ces résultats quantitatifs obtenus à partir de trois exemples sélectionnés montrent que la teneur et la composition des HAP sont spécifiques à un type d'échantillon.** Pour chaque valeur de DBE, il est possible de tracer la distribution des teneurs en HAP en fonction du nombre d'atomes de carbone; par exemple, ces distributions mesurées pour un DBE égal à 13 ont été illustrées dans la Figure 129(C). Le nC pour le VGO 2 et HDT-t<sub>0</sub> est réparti entre 18 et environ 35 ; alors que, après hydrocraquage, le nC est seulement réparti entre 18 et 23 pour l'UCO-t<sub>0</sub>. De plus, la baisse de la teneur en HAP entre le VGO 2 et HDT-t<sub>0</sub> est plus importante pour les nC les plus faibles, avec par exemple une baisse d'un facteur 13 pour les HAP avec 19 atomes de carbone, alors que la teneur globale en HAP pour le DBE 13 diminue d'un facteur de seulement quatre. Bien que nous ayons observé une diminution de la concentration entre HDT-t<sub>0</sub> et UCO-t<sub>0</sub>\* pour les HAP avec un DBE de 13 sur la Figure 129(A), la Figure 129(C) montre une augmentation des teneurs en HAP avec un nC entre 19 et 21, et une diminution pour un nombre plus élevé d'atomes de carbone. Les réactions de craquage peuvent avoir transformé les HAP fortement alkylés en HAP légèrement alkylés.

**En résumé, l'hydrotraitement de la charge a entraîné une diminution des concentrations de HAP due à l'hydrogénation des doubles liaisons C=C. Il semble que les HAP ayant un faible niveau d'alkylation soient de préférence hydrogénés. Ensuite, l'hydrocraquage permet de couper les chaînes alkylées et de convertir les HAP fortement alkylés en HAP à faible niveau d'alkylation.**

## 6.2. Suivi de l'unité avec un débit de recycle non nul

Dans cette partie, **le suivi de la concentration des HAP a été réalisé dans plusieurs UCO échantillonnés à différents temps de séjour.** Le point de départ du suivi est l'UCO-t<sub>0</sub> qui a été

prélevé en premier avant le démarrage du débit de recycle. Les cinq autres échantillons, UCO-t<sub>1</sub> à UCO-t<sub>5</sub>, sont prélevés après le démarrage du débit de recycle. Comme indiqué dans le tableau 2, les produits à la sortie du réacteur d'hydrocraquage présentent des quantités assez similaires de composés à haut point d'ébullition (c.a. 47-50% en poids de la fraction 370°C+). De la même façon que précédemment, les concentrations de HAP dans les UCO ont été normalisées en utilisant le rendement de la coupe 370°C+. On nommera ces concentrations UCO-t<sub>i</sub>\*. Les concentrations sont données en ppm correspondant à des mg/kg de charge qui comprend le DSV 2 et le débit de recycle.

L'évolution des teneurs en HAP pour le VGO 2 et les six UCO-t<sub>i</sub>\* est représentée en fonction des valeurs du DBE dans la Figure 130. Pour un DBE inférieur à 16, les teneurs en HAP des UCO-t<sub>i</sub>\* sont toutes inférieures à celles mesurées pour le VGO 2 : ces teneurs en HAP ont d'abord chuté de manière drastique du VGO 2 à l'UCO-t<sub>0</sub>\* en raison de l'hydrogénation des cycles aromatiques ; puis elles ont augmenté progressivement avec le temps sous charge, indiquant une accumulation de HAP dans le réacteur HCK. **Pour les composés avec un DBE ≥ 17 (c'est-à-dire des HAP avec six cycles aromatiques au minimum), leur teneur est devenue plus élevée que dans le VGO 2 une fois que le débit de recycle commencé. Cette accumulation de HAP a tendance à augmenter de UCO-t<sub>0</sub>\* à UCO-t<sub>5</sub>\*.**

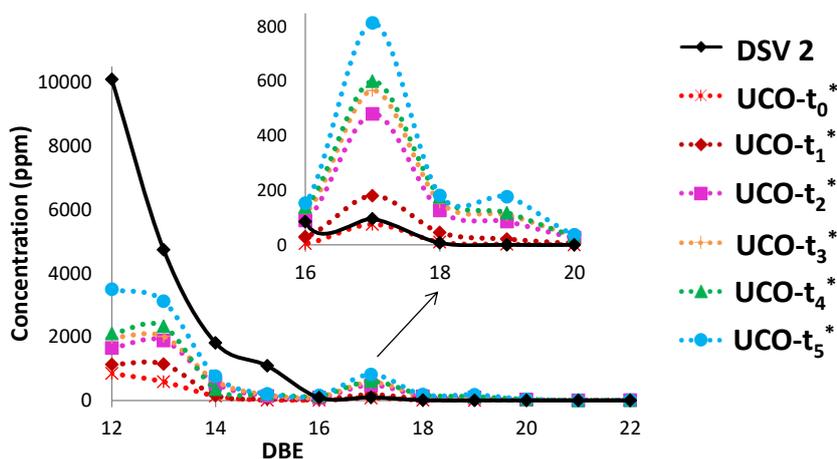


Figure 130 : Concentrations des HAP en fonction du DBE pour le VGO 2 et les UCO-t<sub>i</sub>\*

L'évolution de la moyenne pondérée du nombre d'atomes de carbone en fonction des DBE pour le VGO 2 et les UCO-t<sub>i</sub> est illustrée à la Figure 131(A). Comme indiqué précédemment, le VGO 2 contient des HAP dont le degré d'alkylation diminue avec la valeur du DBE. Contrairement au VGO 2, **les produits en sortie d'hydrocraquage sont constitués de HAP avec un degré d'alkylation plutôt faible et constant quelle que soit la valeur du DBE.** De plus, **les moyennes pondérées du nC sont similaires pour tous les UCO-t<sub>i</sub>** et sont largement inférieures à celles mesurées pour les HAP dans le VGO 2 pour des DBE inférieurs à 15. Ces résultats montrent que, dans nos conditions, les HAP ayant un faible DBE ont été significativement affectés par l'hydrogénation en amont de l'hydrocraquage puis que les structures alkylées sont restées les mêmes au cours du temps, même lorsque les teneurs en HAP ont fortement augmenté. **Ainsi, les HAP qui s'accumule dans le réacteur HCK sont semblables, à savoir peu alkylés, au cours du temps** comme l'illustre la Figure 131(B) pour les composés ayant un DBE de 13.

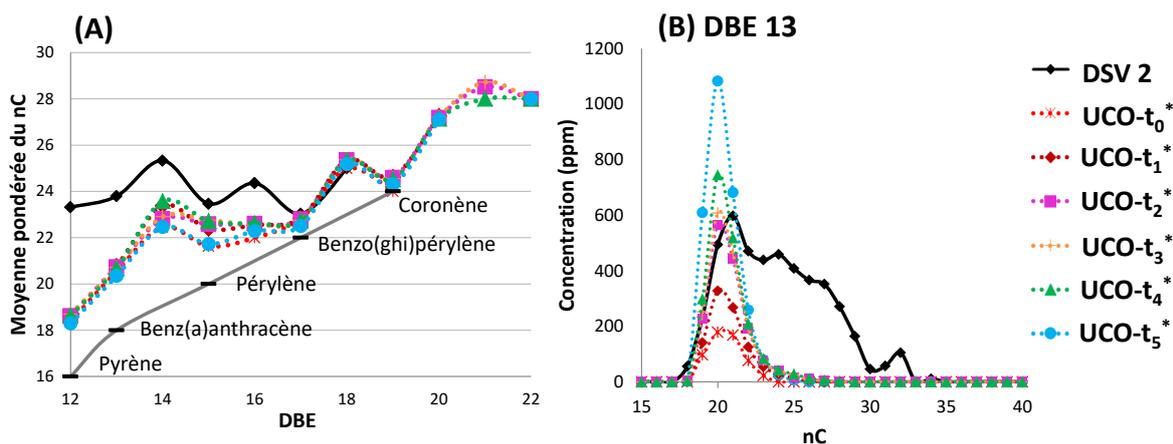


Figure 131 : (A) Évolution de la moyenne pondérée du nC pour chaque DBE et (B) teneurs en HAP en fonction du nC pour le DBE 13 dans le VGO 2 et les UCO-t<sub>i</sub>\*.

A titre d'exemple, l'évolution des HAP en fonction de la température du réacteur R2 a été représentée sur la Figure 132. Les valeurs absolues des températures n'ont pas pu être données en raison de leur caractère confidentiel. La température R2 est généralement augmentée afin de compenser la désactivation du catalyseur au cours du temps et de maintenir une conversion constante. Cependant, il semble que cette augmentation de la température entraîne également une augmentation des concentrations de HAP. Pour les HAP à 4 et 5 cycles aromatiques (DBE entre 12 et 16), les concentrations passent de 1581 ppm à T<sub>0</sub> à 7717 ppm à T<sub>+30°C</sub> ce qui représente une augmentation de 390%. Pour les HAP lourds à au moins 6 cycles aromatiques (DBE ≥ 17), cette augmentation a été encore plus importante en passant de 88 ppm à 1216 ppm soit une augmentation de plus de 1000%.

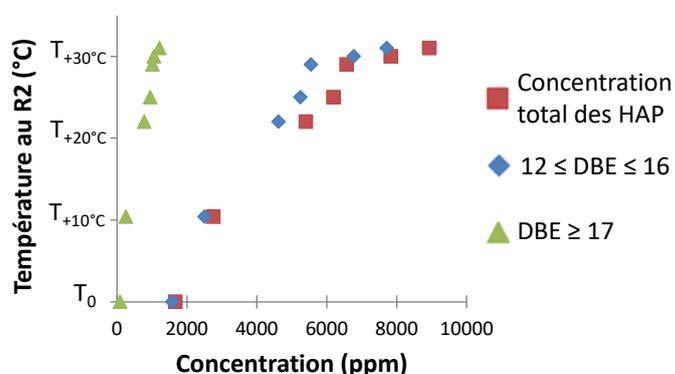


Figure 132 : Température au R2 en fonction de la concentration des HAP dans les UCO-t<sub>i</sub>\*.

## 7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré que le couplage SFC/HRMS était adapté pour quantifier les HAP présents dans les distillats sous vide hydrotraités. Cependant, pour les matrices plus complexes telles que les distillats sous vide avant hydrotraitement, la SFC/HRMS était insuffisante et ne permettait pas d'obtenir des données quantitatives. Ainsi, **une approche multidimensionnelle couplant CPC, la SFC et la HRMS a été développée pour la séparation et la quantification des HAP dans les DSV**. La CPC offre des avantages considérables. En effet, cette dernière permet d'injecter jusqu'à 1 g d'échantillon sans perturber le système solvant en équilibre au sein de la colonne CPC

utilisée. De plus, cette première dimension a permis de séparer les analytes en fonction de **leur degré d'alkylation**. De manière complémentaire, **la SFC en tant que deuxième dimension a permis une séparation selon le nombre d'insaturations**. Ainsi, **la séparation CPCxSFC a permis d'obtenir des cartographies 2D organisées**, reflétant la composition chimique des DSV. Ensuite, le dopage au d-pyrène de DSV a démontré que l'utilisation de la CPC et de la SFC en amont de la HRMS permettait de **limiter les effets de matrice** en APPI positif et rendait ainsi possible **la quantification des HAP dans les DSV pour la première fois**.

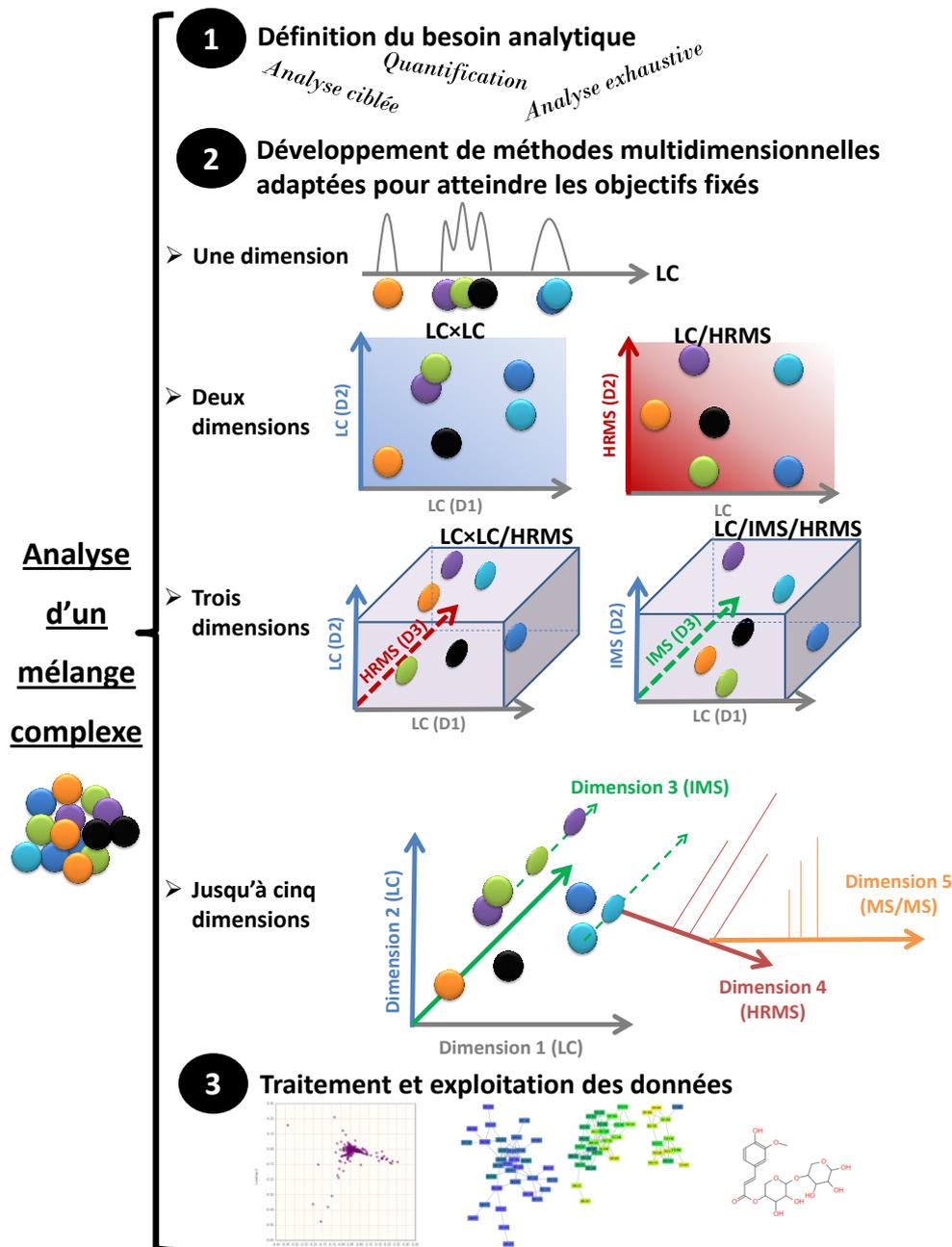
Suite à la vérification du taux de récupération des analytes analysés par CPCxSFC/HRMS ainsi qu'à la mise en place **d'une méthodologie de quantification des HAP alkylés**, six DSV ont été analysés via notre méthode. Des différences entre les DSV ont pu être mises en évidence alors que les propriétés habituellement mesurées sur ce type d'échantillon ne permettaient pas de les distinguer. Globalement, **il s'est avéré que les distillats sous vide issus de distillation directe ne contenaient pas ou peu d'hydrocarbures aromatiques avec plus de huit cycles aromatiques**. À l'inverse, **les DSV obtenus à partir d'une unité de conversion peuvent contenir ce type de HAP lourds**. Pour l'ensemble des DSV, **le degré d'alkylation diminue avec le DBE**. Ainsi, les composés appartenant à la famille du pyrène sont plus alkylés que ceux appartenant à la famille du benzo[ghi]pérylène.

Enfin, **l'évolution de la concentration des HAP a été suivie dans une unité d'hydrocraquage en une étape avec recycle** vers le réacteur d'hydrotraitement. Il a été démontré que, dans nos conditions, l'hydrotraitement de la charge entraîne une diminution des concentrations de HAP en raison des réactions d'hydrogénation. Il semble également que les HAP ayant un faible niveau d'alkylation soient préférentiellement hydrogénés. Les réactions d'hydrocraquage ont permis de couper les chaînes alkylées et de convertir les HAP fortement alkylés en HAP à faible niveau d'alkylation.

En résumé, **cette étude a démontré qu'il est possible d'obtenir des données quantitatives précieuses sur les coupes pétrolières lourdes telles que les distillats sous vide** ainsi que sur les produits de conversion. La SFC/HRMS étant commune à l'analyse des deux types de matrices, la comparaison et le suivi peuvent se faire facilement. **Les données obtenues pourront être un atout non négligeable pour améliorer la compréhension de la formation des HAP mais aussi pour modéliser et prévoir les rendements et conversion des procédés d'hydrocraquage**.



# Chapitre 7 – Les méthodes multidimensionnelles, une course à la résolution



<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>- 201 -</b>
<b>2. DES ECHANTILLONS AVEC UNE COMPLEXITE VARIEE .....</b>	<b>- 202 -</b>
<b>3. LE DEVELOPPEMENT DE METHODES MULTIDIMENSIONNELLES EN REPONSE A LA COMPLEXITE .....</b>	<b>- 203 -</b>
3.1. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLES EN LIGNE <i>VERSUS</i> HORS-LIGNE .....	- 204 -
3.1.1. <i>Temps d'analyse et capacité de pics</i> .....	- 204 -
3.1.2. <i>Impact du mode hors-ligne ou en ligne lors du couplage avec la spectrométrie de masse ..</i>	- 208 -
3.2. LA SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION, UNE NECESSITE.....	- 208 -
3.2.1. <i>Impact de la résolution en spectrométrie de masse lors du couplage RPLC/FT-ICR/MS .....</i>	- 209 -
3.2.2. <i>FT-ICR/MS versus timsTOF : avantages et inconvénients.....</i>	- 213 -
3.3. VERS DES COUPLAGES A TROIS ET QUATRE DIMENSIONS AVEC LA MOBILITE IONIQUE .....	- 216 -
<b>4. POUVOIR RESOLUTIF DES COUPLAGES ET INTERETS .....</b>	<b>- 220 -</b>
4.1. POUVOIR RESOLUTIF DES COUPLAGES REALISES .....	- 220 -
4.2. BESOIN ET INTERET D'UNE GRANDE RESOLUTION .....	- 222 -
<b>5. ÉCHANTILLONS COMPLEXES : VERS UN DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE ET UN TRAITEMENT DES DONNEES COMPLEXES .....</b>	<b>- 223 -</b>
5.1. DU DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE AU TRAITEMENT DE DONNEES MULTIDIMENSIONNELLES .....	- 223 -
5.2. PERSPECTIVES POUR L'ANALYSE STRUCTURALE .....	- 224 -
<b>6. CONCLUSION .....</b>	<b>- 229 -</b>

## 1. Introduction

Dans les chapitres précédents, plusieurs méthodes analytiques impliquant des méthodes séparatives couplées à la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ont été développées. **L'objectif était de répondre à un besoin préalablement identifié**, à savoir la caractérisation exhaustive des échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique et la quantification des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les coupes pétrolières lourdes. La **diversité de la nature des échantillons étudiés dans cette thèse** mais aussi du besoin analytique, nous a amenés à développer des **méthodes séparatives diverses** telles que la chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC), la chromatographie de partage centrifuge (CPC) ou encore la chromatographie en phase supercritique (SFC) couplées à la HRMS et HRMS<sup>n</sup> via la ou les **sources d'ionisation adaptées à la nature des analytes** (ESI, APCI et APPI). **L'augmentation du nombre de dimensions et donc de la résolution globale des méthodes analytiques, nous a permis de répondre aux problématiques initiales.** Ainsi, par exemple, le couplage CPC×SFC/HRMS a permis pour la première fois d'accéder à la quantification des HAP dans des distillats sous vide.

Dans la littérature, la multiplication des dimensions de séparation couplée de manière compréhensive en ligne a commencé avec la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GC×GC). Cette dernière a permis d'augmenter la capacité de pics et ainsi d'améliorer la caractérisation d'échantillons complexes. La GC×GC, ainsi que la GC×GC/MS ont été particulièrement utilisées dans le domaine pétrolier pour l'analyse de coupes relativement légères comme les essences [86,87,89,90]. Elles ont également été utilisées pour l'analyse des huiles de pyrolyse rapide de biomasse [15,16,20]. Toutefois, les échantillons avec des analytes à hauts poids moléculaires, thermosensibles ou encore oxygénés sont difficilement analysables en GC. Plus récemment et en réponse au manque d'applicabilité de la GC pour certains types d'échantillons, la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC×LC) a été développée dans des domaines variés (composés pharmaceutiques [234,237,249], protéines/matrices biologiques [233,250–252], biomasse [30,42,43,253,254], composés naturels [255–258], contaminants [222,259], etc.). Ce couplage peut se faire de manière en ligne ou hors-ligne en collectant des fractions de la première dimension, puis en les ré-injectant dans une seconde dimension. Le développement tardif de la LC×LC en ligne en comparaison à la GC×GC provient de difficultés techniques, notamment de l'incompatibilité de certaines phases mobiles entre les deux dimensions. Plusieurs travaux dans la littérature ont porté sur les méthodes d'optimisation, les avantages et les limites d'un tel couplage [232–235].

Un second moyen d'améliorer les performances d'une méthode analytique est le couplage avec la spectrométrie de masse, et plus particulièrement la HRMS. Parfois considérée à tort comme une simple technique de détection, la MS est une technique de séparation en soi permettant de distinguer les analytes en fonction de leur rapport  $m/z$ . La très haute résolution de certains analyseurs tels que les FT-ICR, a permis de largement avancer dans la connaissance de la composition d'échantillons complexes comme les échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique [22–28,39,72,194,260,261]. La HRMS a également joué un rôle majeur dans le domaine de la pétrochimie [107,109,110,112,113,115,116,125,129,238,239,244,262]. Cependant, lorsque l'échantillon est introduit par infusion (introduction directe), elle reste limitée d'une part par son incapacité à séparer des isomères et d'autre part par le processus d'ionisation des analytes qui est compétitif et limite donc grandement l'aspect quantitatif des résultats. Afin de surmonter ces deux problèmes, il est possible de coupler une méthode séparative en amont de la HRMS comme

présenté dans le Chapitre 3. Dans la littérature, on retrouve quelques travaux sur la LC/HRMS pour des matrices lignocellulosiques [14,33,34,36–38,196]. À IFPEN, la SFC/HRMS a également été évaluée pour l'analyse d'huile de pyrolyse durant la thèse de Julien CREPIER [31,32]. Par ailleurs, il est également possible d'ajouter une dimension en fractionnant l'échantillon initial comme cela a été réalisé dans la thèse d'Alexis DUBUIS [42,43] et présenté dans le Chapitre 4 avec un fractionnement LLE en amont de la RPLC/HRMS. Toutefois, bien qu'attrayant, le couplage LC/HRMS nécessite un certain nombre de compromis, notamment sur la composition de la phase mobile ou encore le débit de solvant.

Enfin, la multiplication des dimensions peut aller jusqu'au couplage LC×LC/HRMS bien que moins retrouvé dans la littérature. Ce type de couplage est parfois réalisé dans le domaine biopharmaceutique ; toutefois, la seconde dimension LC est pour le plus souvent utilisée pour rendre la phase mobile de première dimension compatible avec la HRMS (*i.e.* dessalage).

La mobilité ionique (IMS) en couplage avec la HRMS s'est également développée depuis quelques années avec la multiplication des systèmes commerciaux [220,221,223,224,228,230,263–265]. Une problématique émergente de cette course à la résolution via la multiplication des dimensions analytiques est la représentation et le traitement des données. Cette problématique a été soulignée dans les travaux menés à l'Université de Stellenbosch (équipe d'André de Villiers) avec le couplage LC×LC/IMS/HRMS pour l'analyse de produits naturels [231].

**L'objectif de ce chapitre est de mettre en avant les avantages et inconvénients de chaque technique développée au cours de cette thèse. Le positionnement des différentes méthodes sera réalisé en fonction de la résolution apportée. Cette dernière sera évaluée en estimant une capacité de pics pour chaque méthode séparative individuelle et pour les méthodes couplées. Ce pouvoir séparatif sera mis en perspective du besoin analytique, de la complexité de l'échantillon étudié, de la complexité technique pour la mise en place du couplage et de la complexité de l'exploitation des données acquises. Des perspectives sur le traitement des données et plus particulièrement de l'exploitation des données de fragmentation seront également discutées.**

## **2. Des échantillons avec une complexité variée**

Dans cette thèse, **deux grands types d'échantillons liquides ont été étudiés**. Le premier concerne les échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique qui sont des mélanges oxygénés, contenant des molécules s'étendant sur une large gamme de polarité, de poids moléculaire et de concentration. De plus, certains de ces composés sont polyfonctionnels et parfois thermosensibles. Le second type d'échantillon concerne les coupes pétrolières lourdes et plus particulièrement les distillats sous vide (DSV). Les DSV contiennent des milliers d'analytes incluant des composés hydrocarbonés saturés, aromatiques, des composés soufrés, azotés et dans une moindre mesure oxygénés. Par ailleurs, les DSV sont des coupes avec des points d'ébullition très élevés (entre 350 et 650°C). Bien que ces deux types d'échantillons n'aient que peu de points communs, ils sont tous les deux considérés comme complexes. Par ailleurs, la faible volatilité des analytes les constituant rend des techniques usuellement employées comme la GC, non applicables à leur analyse.

**La complexité d'un échantillon peut avoir des origines multiples.** En effet, un échantillon pourra être dit complexe s'il contient un grand nombre de composés, si sa composition chimique est variée, s'il contient des composés avec des hautes masses moléculaires ou encore si les concentrations des analytes d'intérêt sont particulièrement faibles.

Lorsque l'on introduit le terme de complexité, **la connaissance préalable et le recul que l'on possède sur l'échantillon** sont également à prendre en compte. En effet, il sera d'autant plus facile de caractériser un échantillon étudié depuis plusieurs dizaines d'années qu'un échantillon émergent pour lequel très peu de données ont été recueillies. De plus, **le besoin analytique joue également un rôle dans cette complexité**. Si le besoin est d'identifier la structure de l'ensemble des composés d'un échantillon ou bien d'analyser de façon ciblée une classe de molécules, alors la complexité sera différente. **La complexité est donc non seulement liée à l'échantillon lui-même mais également au recul que l'on a sur ce dernier, au besoin analytique et à la méthode analytique nécessaire pour répondre à ce besoin**. La Figure 133 reprend ces quatre points pour les échantillons issus de la biomasse et les DSV.

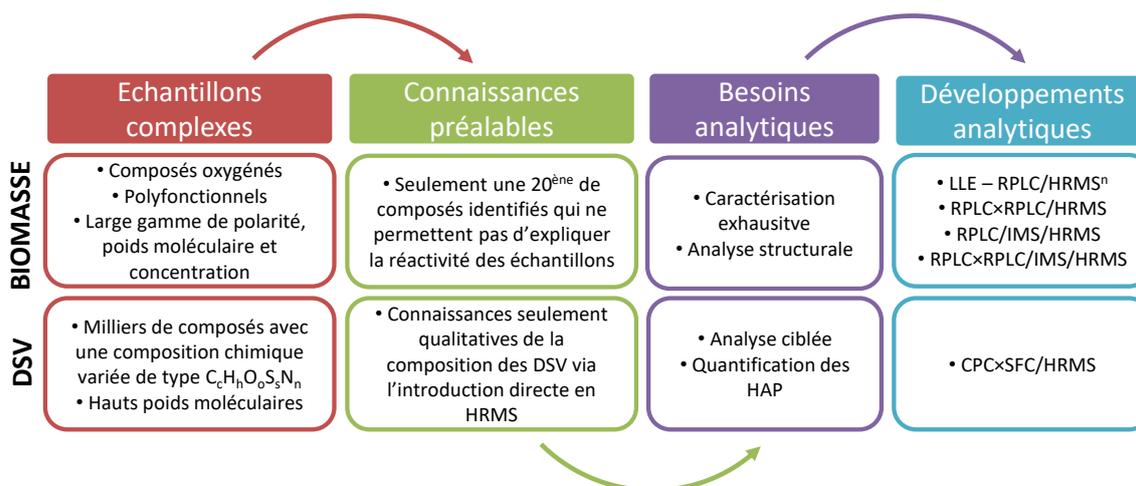


Figure 133 : Des échantillons complexes vers des développements de méthodes analytiques à plusieurs dimensions.

Les DSV sont des échantillons plus complexes que les échantillons de biomasse si l'on considère le nombre de composés. En effet, comme illustré dans le Chapitre 6, une seule dimension de séparation, la SFC, ne permet pas de distinguer des pics chromatographiques en raison des nombreuses co-élutions. En revanche, les DSV sont étudiés depuis bien plus longtemps que les échantillons issus de la conversion de la biomasse et notamment de la conversion biochimique. Ce recul permet de cibler une classe de molécules d'intérêt dans les DSV en vue de leur quantification tandis qu'une analyse exhaustive et structurale est requise pour les échantillons de biomasse.

L'essor des techniques multidimensionnelles est ainsi proportionnel à la complexité des échantillons mais aussi aux besoins analytiques qui demandent une caractérisation toujours plus poussée de ces derniers.

### 3. Le développement de méthodes multidimensionnelles en réponse à la complexité

Afin d'atteindre nos objectifs et répondre aux besoins analytiques, des méthodes multidimensionnelles ont été développées au cours de cette thèse. Les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles seront discutés dans cette partie. Certaines méthodes ont impliqué des couplages hors-ligne, comme le couplage entre la CPC et la SFC pour l'analyse des DSV, ou des couplages en ligne, comme le couplage RPLC×RPLC pour l'analyse des sucres dans les échantillons aqueux de biomasse. L'ensemble des couplages a été réalisé de manière comprehensive, c'est-à-dire que l'ensemble des fractions de la première dimension a été analysé dans une seconde dimension.

Par ailleurs, leur couplage avec la HRMS s'est avéré une nécessité tant pour augmenter le pouvoir résolutif via la séparation des molécules en fonction de leur rapport  $m/z$  que pour procéder à l'identification des analytes.

### 3.1. La chromatographie en phase liquide bidimensionnelles en ligne versus hors-ligne

#### 3.1.1. Temps d'analyse et capacité de pics

**L'objectif premier de la chromatographie bidimensionnelle est l'augmentation du pouvoir résolutif.**

En chromatographie, ce dernier est évalué à l'aide de la capacité de pics ( $n_c$ ). Toutefois, afin de séparer 1000 composés, une capacité de pics bien supérieure à 1000 est nécessaire. En effet, d'après les travaux de Davis et Giddins, en considérant des pics répartis de façon aléatoire sur un chromatogramme, on peut écrire [266] :

$$\ln(p) = \ln(m) - \frac{m}{n_c} \quad (\text{Éq. 21})$$

Avec  $m$  le nombre d'analytes et  $p$  le nombre de pics.

Ainsi pour séparer 95% d'un mélange comprenant 1000 analytes, une capacité de pics de près de 20 000 est nécessaire. Des capacités de pics aussi élevées ne peuvent pas être atteintes en chromatographie monodimensionnelle (1D-LC), d'où l'intérêt de la LC×LC.

La **capacité de pics expérimentale en 1D-LC** est définie selon l'équation 22.

$$n_c = 1 + \frac{t_n - t_1}{w} \quad (\text{Éq.22})$$

Avec  $t_1$  et  $t_n$  les temps de rétention des composés le moins et le plus retenus respectivement,  $w$  la largeur moyenne des pics à 13,4% de la hauteur correspondant également à quatre fois l'écart-type ( $\sigma$ ).

En LC×LC, la **capacité de pics théorique ( $n_{c,2D}$ )** est le produit des capacités de pics de la première et de la seconde dimension. Cependant, en pratique **cette capacité de pics doit être corrigée (1) par le degré d'orthogonalité entre les deux dimensions, (2) par le sous-échantillonnage des pics issus de la première dimension et (3) par l'élargissement des pics de la seconde dimension, principalement lié aux effets à l'injection.**

En effet, un sous-échantillonnage des pics de la première dimension (D1) peut entraîner une perte de séparation en re-mélangeant des analytes qui avaient été séparés en D1. Ici, nous avons mesuré la largeur des pics de la première dimension à partir du détecteur UV placé en sortie de D1. La capacité de pics de D1 sera donc corrigée par un facteur  $\alpha$  (équation 23).

$$n_{c,D1}^* = n_{c,D1} \times \alpha \quad \text{Avec } \alpha = \frac{1}{\sqrt{1+0.21(6/\tau)^2}} \quad (\text{Éq. 23})$$

Avec  $n_{c,D1}^*$  la capacité de pics expérimentale effective de la première dimension,  $n_{c,D1}$  la capacité de pics expérimentale de la première dimension mesurée selon l'équation 22 à partir de la largeur des pics en sortie de D1,  $\alpha$  le facteur de correction pour le sous-échantillonnage calculé selon Davis *et al.* [236] et  $\tau$  la fréquence d'échantillonnage (nombre de fractions collectées par pic à  $6\sigma$ ).

Ensuite, la différence de force éluante entre la première et la seconde dimension peut entraîner un élargissement ou un dédoublement des pics en seconde dimension (D2) lorsque le solvant de D1 a

une force éluante plus forte que celui de D2. La largeur des pics de la seconde dimension a été mesurée directement à partir des chromatogrammes 2D à partir du détecteur UV placé en sortie de D2. Ainsi, la capacité de pics expérimentale de la seconde dimension ( $n_{c,D2}$ ) calculée selon l'équation 22 correspond directement à la capacité de pics expérimentale effective et prend déjà en compte cet élargissement.

Enfin, un faible degré d'orthogonalité entre deux méthodes conduira à une occupation de l'espace chromatographique réduit. Dans cette thèse, nous avons choisi d'utiliser l'approche développée par D'Attoma *et al.* pour mesurer l'occupation de l'espace de la séparation 2D ( $\gamma$ ) comme décrit dans le Chapitre 5 [234].

On écrira donc la **capacité de pics expérimentale effective** ( $n_{c,2D}^*$ ) comme suit :

$$n_{c,2D}^* = (n_{c,D1} \times \alpha) \times n_{c,D2} \times \gamma \quad (\text{Éq. 24})$$

En combinant les équations 22 et 24, on obtient :

$$n_{c,2D}^* = \left(1 + \frac{t_{n,D1} - t_{1,D1}}{w_{D1}}\right) \times \left(1 + \frac{t_{n,D2} - t_{1,D2}}{w_{D2}}\right) \times \gamma \times \frac{1}{\sqrt{1 + 0.21 \left(\frac{6}{\tau}\right)^2}} \quad (\text{Éq. 25})$$

Ainsi, la capacité de pic effective d'une méthode bidimensionnelle va dépendre d'un nombre important de facteurs.

**Dans le cas de la chromatographie bidimensionnelle hors-ligne**, comme la CPC×SFC présentée dans le Chapitre 6, les deux dimensions sont décorréélées. Il n'y a donc pas de restriction en termes de compatibilité de solvant entre la première et la seconde dimension, de débit ou encore de temps d'analyse de la seconde dimension. Malgré **un temps d'analyse relativement long** (près de 15 h pour l'analyse CPC×SFC/HRMS d'un échantillon), la LC×LC hors-ligne présente plusieurs avantages. Le premier est le large choix de modes chromatographiques permettant ainsi la sélection de deux dimensions orthogonales. En effet, en cas d'incompatibilité de solvant entre les deux dimensions, les fractions peuvent être traitées et solubilisées dans un autre solvant compatible avec la deuxième dimension. On pourra donc atteindre **une occupation maximale de l'espace de séparation avec un facteur  $\gamma$  qui tend vers 1**. L'évaporation des fractions issues de la première dimension avant injection en deuxième dimension permet également d'analyser des composés de faibles concentrations. De plus, **les pics de la seconde dimension ne subiront pas de déformation liée aux effets d'injection**. Un second point fort est l'optimisation individuelle des dimensions qui permet d'atteindre **des capacités de pics optimales en augmentant ( $t_n - t_1$ ) et en diminuant  $w$  via l'utilisation de colonnes chromatographiques et débits optimaux**. Enfin, le facteur  $\alpha$  pourra être proche de 1 en veillant à fractionner suffisamment les pics de la première dimension.

**La LC×LC en ligne**, comme la RPLC×RPLC présentée dans le Chapitre 5, permet de **réduire le temps d'analyse et de limiter le risque de perte d'échantillon**, cependant son développement est plus complexe. Le temps d'analyse de la seconde dimension étant également le temps de modulation/fractionnement de la première dimension, **la séparation en D2 doit être réalisée dans un temps très court**. Afin de réaliser suffisamment de fractions par pic et obtenir un facteur  $\alpha$  proche de 1, le débit de la première dimension est souvent très faible et les pics en D1 très larges, ce qui détériore  $n_{c,D1}$ . Dans le même temps, des gradients très rapides sont utilisés en deuxième dimension ( $[t_{n,D2} - t_{1,D2}]$  très court) limitant  $n_{c,D2}$ . De plus, les solvants entre les deux dimensions devant être compatibles afin de limiter l'élargissement des pics de la seconde dimension, le couplage de

différents modes chromatographiques orthogonaux (*i.e.* RPLC, NPLC) est limité. **L'occupation de l'espace chromatographique pourra donc être réduite.**

**Bien que la LC×LC en ligne présente l'avantage d'un temps d'analyse réduit ainsi qu'un risque limité de perte d'échantillon, la LC×LC hors-ligne permet d'accéder à des capacités de pics plus élevées.** Le Tableau 36 compare les capacités de pics expérimentales effectives des différentes méthodes chromatographiques développées. Il inclut ainsi la méthode RPLC×RPLC en ligne développée pour l'analyse des sucres dans les échantillons de biomasse, la CPC×SFC hors-ligne pour l'analyse des HAP dans les DSV ainsi que la combinaison du fractionnement liquide-liquide et de la RPLC (nommée LLE×RPLC) présentée dans le Chapitre 3 pour l'analyse des échantillons de biomasse. De plus, afin de comparer les modes hors-ligne et en ligne pour un même type d'échantillon, la capacité de pics effective de la RPLC×RPLC hors-ligne pour l'analyse des sucres a été estimée. **L'ensemble des résultats présentés dans ce tableau sont basés sur des mesures de largeurs de pics en UV.**

**Tableau 36 : Comparaison des capacités de pics expérimentales effectives mesurées en UV des méthodes chromatographiques**

	LLE×RPLC	RPLC×RPLC	RPLC×RPLC	CPC×SFC
<b>Mode</b>	Pré-fractionnement	Hors-ligne	En-ligne	Hors-ligne
<b>Echantillons étudiés</b>	Biomasse	Biomasse - sucres	Biomasse - sucres	DSV
<b>Temps d'analyse</b> (*hors temps de traitement des fractions)	6h*	250 fractions ×10 min = 42h	3h30	15h*
$t_{n,D1} - t_{1,D1}$ (min)	/	200	200	30
$w_{D1}$ (min)	/	2,7	2,7	2,7
$n_{c,D1}$	4	74,4	74,4	12,1
$t_{n,D2} - t_{1,D2}$ (min)	25	6	0,25	17
$w_{D2}$ (min)	0,107	0,099	0,019	0,109
$n_{c,D2}$	234,6	61,8	14,4	156,9
<b>Occupation de l'espace (<math>\gamma</math>)</b>	0,70	0,75	0,75	0,86
<b>Sous-échantillonnage (<math>\alpha</math>)</b>	/	0,88 ( $\tau \approx 5$ )	0,88 ( $\tau \approx 5$ )	0,88 ( $\tau \approx 5$ )
$n^*_{c,2D}$	657 (sucres : 50)	3035	707	1438
<b>Capacité de pics/h</b>	110	72	202	96

Les méthodes ont été classées selon l'objectif initial et les échantillons analysés. La LLE×RPLC a été développée pour l'analyse de l'intégralité des échantillons aqueux de biomasse, tandis que la RPLC×RPLC a pour objectif de séparer les sucres non retenus en RPLC présents dans ces mêmes échantillons. En RPLC monodimensionnelle, une capacité de pics d'environ 235 est atteinte pour une plage d'élution de 25 min. **Le fractionnement LLE en 4 fractions permet d'augmenter cette capacité de pics à environ 650** avec une occupation des 4 chromatogrammes estimée à 70%. Cependant, il était apparu que **l'échantillon était à plus de 90% regroupé dans une seule fraction (AQ1)** comprenant les composés les plus hydrophiles. Au sein de cette même fraction, une partie des composés n'était pas retenue et co-élueait au début du chromatogramme. Nous avons donc développé par la suite **la RPLC×RPLC compréhensive en ligne**. Cette méthode nous a permis d'obtenir **une capacité de pics effective de 707 dédiée aux sucres** (contre seulement 50 en RPLC).

Toutefois, cette capacité de pics est relativement faible en comparaison à d'autres méthodes bidimensionnelles en ligne de la littérature. Le Masle *et al.* ont par exemple atteint une capacité de pics d'environ 1900 avec une méthode RPLC×RPLC en ligne pour l'analyse d'une phase aqueuse d'huile de pyrolyse (Tableau 37). Si l'on compare les deux méthodes, il apparaît que cette différence de capacité de pics provient essentiellement de la largeur des pics en seconde dimension. En effet, la largeur moyenne des pics à  $4\sigma$  était de 1,14 s (0,019 min) dans nos travaux, contre 0,85 s dans cette publication. Cet élargissement des pics pourraient provenir de l'utilisation d'isopropanol en première dimension. Bien qu'un solvant avec une force éluante inférieure, comme le méthanol ou l'acétonitrile eut été plus approprié, seul l'isopropanol permettait d'éluer tous les analytes et plus particulièrement les composés hybrides constitués d'une partie phénolique et d'une partie sucre.

**Tableau 37 : Conditions expérimentales d'une méthode RPLC×RPLC développée par Le Masle *et al.* [30]**

	D1	D2
Stationary phase	Hypercarb	Acquity CSH Phenyl Hexyl
Column geometry	100 mm × 1 mm; 5 $\mu$ m	50 mm × 2.1 mm; 1.7 $\mu$ m
Mobile phase	A: H <sub>2</sub> O + 0.1% formic acid B: ACN + 0.1% formic acid	A: H <sub>2</sub> O + 0.1% formic acid B: MeOH + 0.1% formic acid
Gradient conditions	1%–99%B in 285 min	1%–81%B in 44s
Normalized gradient slope	1.6%	8.0%
Temperature	60 °C	80 °C
Flow-rate	10 $\mu$ L/min	1400 $\mu$ L/min
Injected volume	1 $\mu$ L	11 $\mu$ L
Run number	1	240
Sampling rate ( $6\sigma$ )	3.6	
Average peak width ( $4\sigma$ )	2.7 min	0.85s
Dilution factor <sup>a</sup>	17	1.1
Effective practical peak capacity	81 <sup>b</sup>	24 <sup>c</sup>
$n^*_{2D}$ <sup>d</sup>	1940	

1.15 min as sampling time.

Bien que réalisé en ligne, le couplage RPLC×RPLC aurait pu être opéré hors-ligne. Les calculs de capacité de pics de la RPLC×RPLC hors-ligne ont été estimés en gardant la même méthode que la RPLC×RPLC en ligne pour la première dimension ainsi qu'un fractionnement similaire au temps de modulation (48 s). En se basant sur une seconde dimension d'une durée de 10 min, le temps d'analyse global (hors traitement potentiel des fractions) serait de 42 h. La plage d'élution des sucres d'intérêt en seconde dimension ainsi que la largeur des pics ont été estimées via l'analyse monodimensionnelle de l'échantillon A1 présenté dans le Chapitre 5 lors du screening de colonne de seconde dimension. On estime ainsi la **capacité de pics de la RPLC×RPLC hors-ligne à plus de 3000**, soit 4 fois plus que la RPLC×RPLC en ligne. En revanche, **la capacité de pics par heure de la RPLC×RPLC hors-ligne est 2,8 fois inférieure à celle de la RPLC×RPLC en ligne**. À noter que si le couplage RPLC×RPLC hors-ligne devait être réalisé, une méthode en D1 plus rapide serait employée étant donné qu'aucune contrainte serait imposé par la D2.

Concernant le **couplage CPC×SFC**, malgré une efficacité moindre de la CPC par rapport à une méthode LC, le couplage hors-ligne permet d'atteindre une **capacité de pics élevée d'environ 1400** grâce à une bonne orthogonalité des dimensions. Le temps d'analyse étant relativement long, la capacité de pics par heure est de seulement 100.

### 3.1.2. Impact du mode hors-ligne ou en ligne lors du couplage avec la spectrométrie de masse

En fonction du mode de chromatographie bidimensionnelle utilisé (hors-ligne ou en ligne), le couplage avec la spectrométrie de masse pourra impacter les capacités de pics préalablement calculées. En effet, le couplage de la LC×LC hors-ligne avec la spectrométrie de masse se fera de la même manière que la LC/HRMS. En revanche, pour la LC×LC en ligne, les débits élevés appliqués en seconde dimension impliquent l'utilisation d'un split afin de réduire le débit arrivant dans la source d'ionisation. Ce split engendre de la dispersion, comme présenté dans le Chapitre 3. Cette dispersion a un impact d'autant plus important que les pics chromatographiques sont fins. Afin d'estimer l'impact des dispersions liées à l'interface entre la LC et la spectrométrie de masse (split et source d'ionisation), les capacités de pics calculées précédemment via une détection UV ont été mesurées à partir des chromatogrammes obtenus en HRMS. Les largeurs des pics de seconde dimension mesurées en UV et MS, ainsi que les capacités de pics effectives sont présentées dans le Tableau 38. Lors du couplage hors-ligne impliquant la RPLC en seconde dimension (cas de la LLE×RPLC et RPLC×RPLC hors-ligne) avec la HRMS sans utilisation de split, l'élargissement des pics était faible ou nul. Ainsi, pour la LLE×RPLC et RPLC×RPLC hors-ligne, 100% et 88% des capacités de pics sont retrouvés en HRMS respectivement. De la même façon, la capacité de pics de la CPC×SFC hors-ligne a été relativement peu impactée par le couplage avec la HRMS avec 81% de la capacité de pics retrouvé en HRMS. L'élargissement des pics entre l'UV et la HRMS, de 0,109 à 0,135 min, peut être lié à la fois au split imposé par l'ABPR dans la configuration SFC utilisée, mais aussi à la décompression du CO<sub>2</sub> dans la source d'ionisation. Concernant la RPLC×RPLC en ligne, la largeur des pics passe de 0,019 à 0,039 min entre l'UV et la HRMS, soit un élargissement d'un facteur 2 qui provoque une perte de près de 50% de la capacité de pics.

**Tableau 38 : Comparaison des largeurs de pics en seconde dimension et des capacités de pics effectives mesurées en UV et en MS**

	Interface	HRMS	w <sub>D2</sub> - UV (min)	w <sub>D2</sub> - MS (min)	n* <sub>c,2D</sub> UV	n* <sub>c,2D</sub> MS	n* <sub>c,2D</sub> MS / n* <sub>c,2D</sub> UV
LLE×RPLC	ESI	timsTOF	0,107	0,107	657	657	100%
RPLC×RPLC hors ligne	ESI	timsTOF	0,099	0,112	3035	2680	88%
RPLC×RPLC en ligne	Split (1:2) - ESI	timsTOF	0,019	0,039	707	364	51%
CPC×SFC hors ligne	Split (contrôlé par l'ABPR) - APPI	FT-ICR	0,109	0,135	1438	1162	81%

**En résumé, la chromatographie bidimensionnelle hors-ligne permet d'atteindre des capacités particulièrement élevées. De plus, son couplage avec la HRMS n'engendre pas de perte de résolution chromatographique. En revanche, le plus souvent, le mode hors-ligne conduit à des temps d'analyse particulièrement longs. Pour réduire ce temps d'analyse, la chromatographie bidimensionnelle en ligne est envisageable. Il faut toutefois veiller à l'élargissement des pics provenant à la fois du solvant d'injection et des dispersions liées à l'interface entre la chromatographie et la HRMS.**

### 3.2. La spectrométrie de masse haute résolution, une nécessité

L'ensemble des méthodes chromatographiques développées au cours de cette thèse a été couplé à la spectrométrie de masse haute résolution. Selon les analytes à ioniser, les sources d'ionisation à pression atmosphérique adaptées ont été sélectionnées. Ainsi, l'APPI en mode positif a été employée

pour les HAP dans les DSV, tandis que l'ESI et l'APCI en modes positif et négatif ont été préférées pour les composés polaires issus de la biomasse lignocellulosique. Par ailleurs, deux spectromètres de masse, un LTQ/FT-ICR/MS 7 T de Thermo (Finnigan LTQ FT Ultra) et un timsTOF de Bruker, ont été utilisés et leurs performances seront comparées dans la suite de ce chapitre via l'analyse d'échantillons issus de la conversion de la biomasse. L'impact de la résolution en masse sera également discuté en comparant l'analyse RPLC/HRMS d'une huile de pyrolyse sur le FT-ICR/MS à plusieurs résolutions via l'utilisation d'un boîtier électronique supplémentaire appelé « Booster ».

**La HRMS a eu dans nos travaux quatre intérêts :**

- **La séparation des analytes en fonction du rapport  $m/z$  qui fait de la HRMS une réelle dimension séparative avec une capacité de pics bien supérieure à la chromatographie en phase liquide,**
- **Une mesure précise des rapports  $m/z$  avec une faible erreur qui a permis de calculer les formules brutes des analytes,**
- **Un accès à la quantification des HAP qui était impossible avec une simple détection UV à cause de co-élutions persistantes en CPC×SFC,**
- **Un accès à des informations structurales via les expériences de fragmentation CID.**

### 3.2.1. Impact de la résolution en spectrométrie de masse lors du couplage RPLC/FT-ICR/MS

L'ensemble des couplages RPLC/FT-ICR/MS a été réalisé avec une résolution de 12 500 pour  $m/z$  400 afin d'avoir une vitesse de scan suffisante et ainsi suffisamment de points pour correctement décrire les pics chromatographiques. L'objectif de cette partie est d'étudier l'impact de la résolution en spectrométrie de masse lorsque la HRMS est en couplage avec la RPLC pour l'analyse d'échantillons complexes.

Les étapes clés d'une analyse par FT-ICR/MS sont dans un premier temps l'ionisation des analytes, puis le transfert des ions vers un piège ionique linéaire dans lequel les ions sont accumulés, et enfin l'analyse des ions via la cellule ICR au sein d'un aimant supraconducteur. Soumise à un champ magnétique (B), une particule chargée subit une force de Lorentz ( $F_L$ ) qui résulte en un mouvement circulaire perpendiculaire à la direction du champ avec une vitesse ( $v$ ) et une oscillation nommée mouvement cyclotronique.

$$F_L = q \times v \times B \text{ avec } q = ze \quad (\text{Éq. 26})$$

$z$  étant le nombre de charges et  $e$  la charge électrique élémentaire.

La force de Lorentz étant en équilibre avec la force centripète, on en déduit les équations 27 et 28.

$$\frac{mv^2}{r} = \frac{m(r\omega)^2}{r} = qvB \quad (\text{Éq. 27})$$

$$\omega = \frac{qB}{m} \quad (\text{Éq. 28})$$

Avec  $\omega$  la fréquence cyclotronique,  $r$  le rayon du mouvement cyclotronique et  $m$  la masse de l'ion.

La fréquence cyclotronique est ainsi inversement proportionnelle à  $m/z$  ce qui permet de séparer les ions ayant différents  $m/z$ .

La cellule ICR est composée de six électrodes symétriques deux à deux. Deux électrodes perpendiculaires au champ magnétique ont pour rôle de piéger les ions au sein de la cellule ICR en

créant un puits de potentiel. Deux autres électrodes permettent d'exciter les ions et ainsi d'augmenter leur rayon de rotation en émettant une impulsion électrique sur une large gamme de fréquences. Les ions ayant le même rapport  $m/z$  (paquet d'ions) auront un mouvement d'ensemble cohérent, en phase. Enfin, les deux dernières électrodes servent à la mesure du courant induit par le mouvement des ions. Ce mouvement étant périodique, chaque ion va produire un signal sinusoïdal. La somme de ces signaux forme le transient qui par transformée de Fourier permet d'obtenir un spectre de masse. Le pouvoir résolutif ou résolution (R) peut être déterminé via l'équation 29.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{\omega}{\Delta \omega} = \frac{qB}{m\Delta \omega} \propto \frac{qBT}{mk} \text{ avec } \Delta \omega = \frac{k}{T} \quad (\text{Éq. 29})$$

Où  $\Delta m$  est la largeur du pic à mi-hauteur sur le spectre de masse,  $\Delta \omega$  la largeur à mi-hauteur sur le spectre de fréquence,  $k$  la constante de largeur de pic et  $T$  le temps d'acquisition.

La résolution dépend donc du rapport  $m/z$  de l'ion, du champ magnétique et du temps d'acquisition. Si l'on souhaite augmenter la résolution sur un même appareil (même champ magnétique), il est donc nécessaire **de mesurer le signal pendant un temps plus long** afin de moyennner davantage de scans. C'est également pour cette raison, que les FT-ICR/MS ne sont pas nécessairement les analyseurs les plus adaptés pour un couplage avec la chromatographie. Une seconde façon d'améliorer la résolution réside dans le traitement du signal avant transformée de Fourier. En effet, la transformée de Fourier permet d'obtenir deux domaines de fréquences (imaginaire et réelle) qui peuvent être ensuite convertis en spectre de masse. La partie imaginaire est souvent préférée et permet d'obtenir **des spectres en mode magnitude**. Ce mode est celui qui a été employé dans cette thèse. En effet, en raison d'un déphasage des ions peu contrôlable expérimentalement, **il est plus difficile d'employer le mode adsorption qui se sert de la partie réelle**. Cependant, il a été démontré dans la littérature que l'utilisation du **mode adsorption permet un gain d'un facteur deux sur la résolution** en comparaison au mode magnitude [267–269]. Aujourd'hui, des logiciels permettent un rephasage des transients comme le logiciel AutoVectis développé par SpectroSwiss. Cette même société a également développé un « Booster », qui est un boîtier électronique externe permettant entre autres **d'augmenter le temps d'acquisition des transients sans pour autant modifier la vitesse de scan**. Une expérience LTQ/FT-ICR/MS n'est pas continue. La première étape consiste à accumuler les ions dans le premier analyseur qui est un piège ionique linéaire (LTQ), puis à réaliser la séparation des paquets d'ions dans la cellule ICR. En temps normal, sur notre instrument il n'est pas possible d'effectuer ces deux étapes simultanément. L'ajout du Booster permet d'enregistrer les transients en parallèle de l'étape d'accumulation, comme représenté sur la Figure 134. Ainsi, **le temps d'enregistrement des transients est rallongé**, ce qui permet **d'augmenter la résolution** d'après l'équation 8.

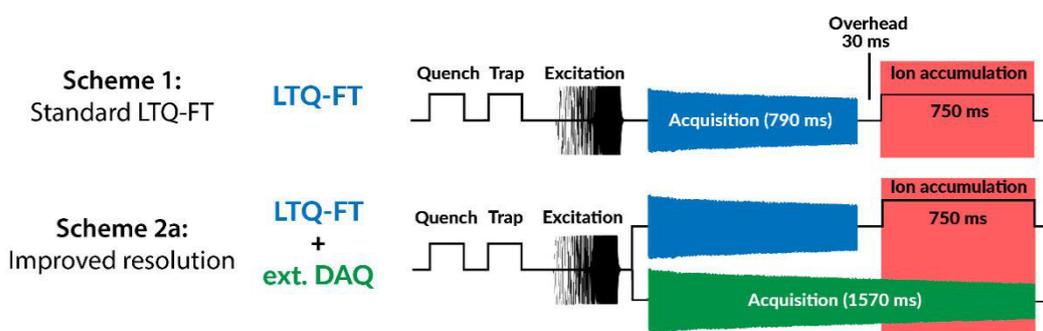


Figure 134 : Principe de fonctionnement du Booster de SpectroSwiss [schéma réalisé par la société SpectroSwiss]

Afin d'étudier l'impact de la résolution, une huile de pyrolyse a été analysée en RPLC/HRMS dans plusieurs conditions : **(1) dans le mode magnitude sans Booster, (2) dans le mode magnitude avec Booster et (3) dans le mode adsorption avec Booster.** La Figure 135 présente la comparaison de ces trois conditions. 28 scans appartenant à un pic chromatographique ont été sommés permettant d'obtenir trois spectres de masse selon les conditions utilisées. Un agrandissement entre  $m/z$  531,08 et 535,36 permet de mettre en valeur l'apport du Booster et du mode adsorption. En effet, environ 3 pics ont pu être distingués sur le spectre de masse dans le mode magnitude sans Booster, tandis qu'environ 8 pics peuvent être séparés à l'aide du Booster. **En utilisant le mode adsorption avec Booster, jusqu'à 12 pics sont détectés soit 4 fois plus que dans le mode classiquement employé sans Booster.**

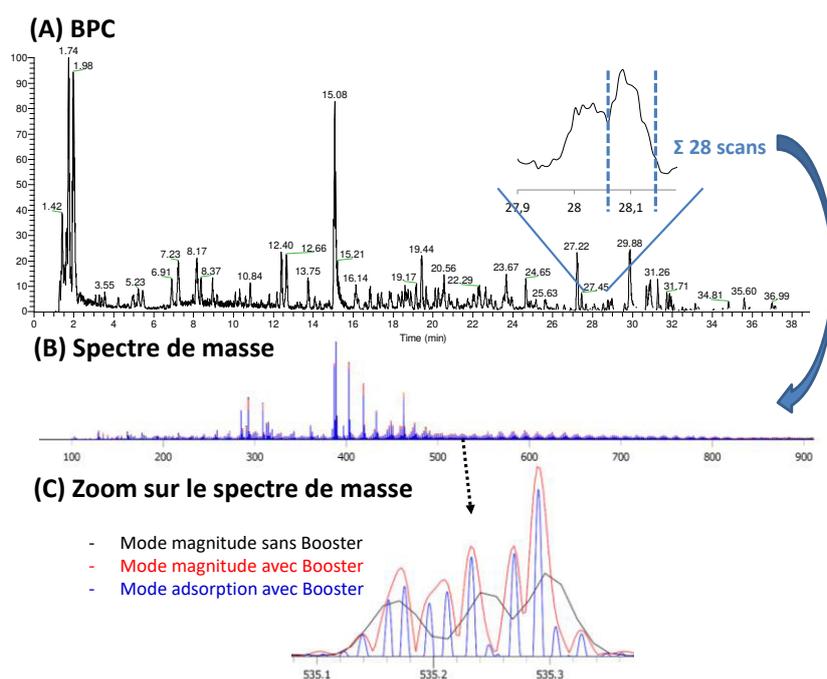


Figure 135 : Comparaison des modes magnitude sans Booster, magnitude avec Booster et adsorption avec Booster lors de l'analyse d'une huile de pyrolyse en RPLC/FT-ICR/MS

Si l'on compare le nombre de formules brutes attribuées (sans considérer les isomères éluant à plusieurs temps de rétention), l'utilisation du mode adsorption avec le Booster permet d'identifier 1670 formules brutes contre 1415 avec le mode magnitude sans le Booster, soit une augmentation de 18%. Plus précisément, une nette augmentation du nombre de formules brutes identifiées pour des ions avec un rapport  $m/z$  entre 700 et 850 a été observée (Figure 136).

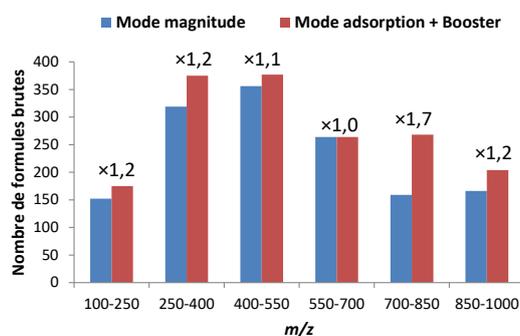
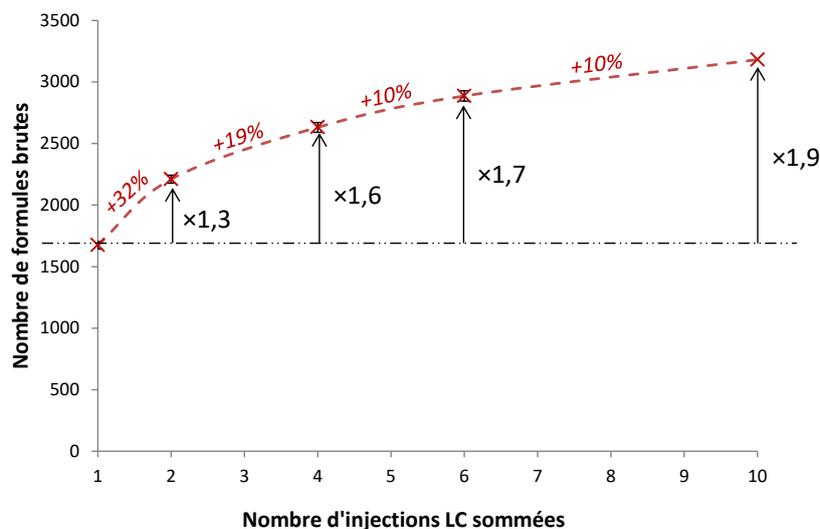


Figure 136 : Comparaison du nombre de formules brutes identifiées par tranche de  $m/z$  dans le mode magnitude et dans le mode adsorption avec Booster

Pour aller plus loin, l'analyse RPLC/FT-ICR/MS avec Booster dans le mode adsorption a été répétée 10 fois. L'objectif ici n'est pas d'augmenter la résolution mais davantage d'augmenter le rapport signal sur bruit en sommant les transients obtenus lors des différentes analyses (multiplexage). Afin d'évaluer le potentiel de la multiplication des injections, le nombre d'ions détectés et identifiés pour 1 injection ainsi que pour la somme des transients de 2, 4, 6 et 10 injections ont été comparés. Les données multiplexées ont été générées par SpectroSwiss. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque configuration, à l'exception de la somme de 10 analyses LC, permettant d'obtenir un écart type sur le nombre de composés détectés. Les données centroïdées ont été traitées via MZmine. Un seuil d'intensité des ions identique a été utilisé lors du traitement des cinq jeux de données (fixé à 1000). Ensuite, après avoir associé les isotopes, les pics ne possédant pas au minimum deux ions dans leur massif isotopique ont été retirés des listes de pics. De la même façon que précédemment, les isomères n'ont pas été considérés (pas de déconvolution des EIC). La Figure 137 présente le nombre de formules brutes calculées en fonction du nombre d'injections sommées. La sommation des transients issus de 10 analyses LC permet de multiplier le nombre d'ions identifiés par près de 2. En revanche, l'augmentation du nombre de formules brutes tend à s'amoinrir au fur et mesure que l'on augmente le nombre d'injections sommées. En effet, un gain de 32% en termes de nombre de formules brutes a été atteint grâce au multiplexage de 2 analyses. Ensuite, un gain de 19% a été observé en sommant 2 injections supplémentaires, soit 4 en tout. À partir de là, le multiplexage de 2 analyses supplémentaires (6 au total) ne permet d'augmenter que de 10% le nombre de formules brutes identifiées.



**Figure 137 : Nombre de formules brutes identifiées en fonction du nombre d'analyses sommées**

L'apport de ce multiplexage provient, non pas de l'augmentation de la résolution, mais de la diminution du bruit et donc de l'augmentation du rapport signal sur bruit (S/B). En effet, le S/B est proportionnel à la racine carrée du temps de sommation. Ainsi, le multiplexage de 10 injections LC permet de multiplier le temps de sommation par 10 et donc d'augmenter le S/B par un facteur proche de 3. La Figure 138 présente une partie des spectres de masse acquis au même temps de rétention avec 1, 2 ou 10 analyses LC sommées. Sans sommation des transients, le bruit est d'environ 30 000. Ce dernier chute à environ 17 000 puis à 7 000 en sommant les transients issus de 2 et 10 analyses respectivement.

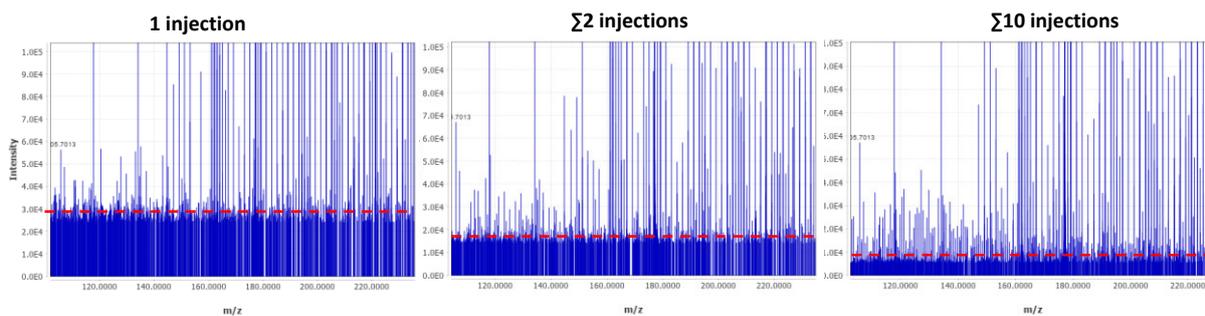


Figure 138 : Comparaison du bruit sur les spectres de masse pour une, deux et dix injections en LC

Malgré les avantages certains de l'utilisation du mode adsorption et du Booster, l'enregistrement et le traitement des transients génèrent un large volume de données nécessitant des outils de calcul relativement puissants ainsi qu'un espace de stockage adapté.

### 3.2.2. FT-ICR/MS *versus* timsTOF : avantages et inconvénients

En fonction des applications et développements analytiques, deux spectromètres de masse haute résolution ont été employés. L'objectif de cette partie est de comparer les deux analyseurs, un TOF *versus* un FT-ICR, et ainsi de mettre en valeur les avantages mais aussi les inconvénients de chacun d'eux.

**Le premier point de comparaison est la fréquence d'acquisition.** Comme décrit dans la section précédente, sur un FT-ICR, la fréquence d'acquisition va avoir un impact direct sur le pouvoir résolutif. Sur un TOF, la fréquence ne va pas impacter la résolution mais davantage la sensibilité de l'analyse. En effet, le pouvoir résolutif d'un TOF est défini par la distance parcourue par les ions. Cette distance est dépendante de la longueur du TOF et ne dépend pas des conditions expérimentales. Ainsi, la fréquence d'acquisition souhaitée est indiquée dans la méthode et sera constante tout du long de l'analyse. La Figure 139A représente le TIC de l'échantillon A1 ainsi que le temps entre deux scans tout du long de la séparation chromatographique. Étant donné que la fréquence avait été fixée à 3 Hz pour cette analyse, le temps entre deux scans est d'environ 0,33 s. Sur le FT-ICR employé, on fixe non pas la fréquence d'acquisition mais la résolution. Par ailleurs, dans les cellules de piégeage d'ions, lorsque le nombre d'ions devient trop élevé, la mesure des rapports  $m/z$  ainsi que la résolution peuvent être impactées. Afin d'éviter cette charge d'espace trop importante, le nombre d'ions injectés dans la cellule ICR est contrôlé au niveau du piège ionique linéaire (LTQ) qui se situe en amont de l'ICR. Cette fonctionnalité est appelée Automatic Gain Control (AGC Target). Ainsi, lorsqu'un grand nombre d'ions est présent, la fréquence d'acquisition est augmentée en diminuant le temps d'accumulation. On observe donc sur la Figure 139B, une diminution du temps entre deux scans lorsque de nombreux composés sont élués ou pour des composés très concentrés. Pendant les premières secondes de l'analyse, avant le temps mort, aucun composé n'est élué et donc le temps entre deux scans est long (maximum 1,5 s). À l'opposé, lorsque le composé le plus intense élué vers 13,6 min, le temps entre deux scans a chuté à 0,50 s.

**Ces fréquences d'acquisition sont compatibles avec une analyse de type RPLC/HRMS ou SFC/HRMS.** En effet, en moyenne un pic dure en moyenne 8 secondes ce qui permet d'acquérir 10 scans avec une fréquence d'acquisition moyenne de 0,8 s sur le FT-ICR et environ 25 scans sur le TOF dans les conditions employées. En revanche, **lors d'un couplage avec la chromatographie bidimensionnelle en ligne**, les pics chromatographiques éluent en seulement 1 à 2 secondes. Ainsi, **seul le TOF peut être utilisé dans ce type de configuration.** De plus, la fréquence du TOF peut si

besoin être augmentée sans pour autant impacter la résolution comme cela a été réalisé lors du couplage RPLC×PLC/HRMS présenté dans le Chapitre 5 où la fréquence a été augmentée à 20 Hz.

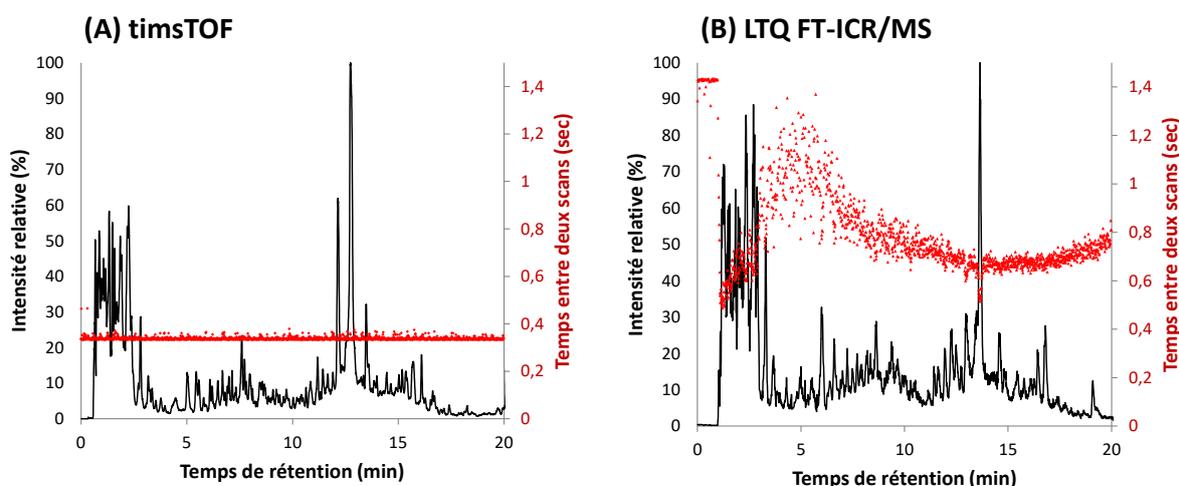


Figure 139 : TIC de l'échantillon A1 obtenus sur (A) le timsTOF et (B) le FT-ICR et temps mesuré entre deux scans tout du long de la séparation chromatographique.

**Le deuxième point de comparaison des deux analyseurs est la résolution.** Comme discuté, la résolution du FT-ICR dépend non seulement des conditions expérimentales mais aussi du traitement du signal. Lors d'une analyse en introduction directe, le temps d'acquisition n'étant pas une limite, des résolutions très largement supérieures peuvent être atteintes sur le FT-ICR par comparaison au TOF. Ici, nous comparons les résolutions dans les conditions utilisées au cours de la thèse lors du couplage avec la chromatographie, soit avec une résolution indiquée dans la méthode de 12 500 à  $m/z$  400. Les résolutions obtenues avec le FT-ICR dans le mode magnitude (utilisé pendant la thèse), adsorption et adsorption avec le Booster sont également discutées. La Figure 140 représente la largeur à mi-hauteur des pics, mesurée sur les spectres de masse pour plusieurs  $m/z$ . L'augmentation de la largeur des pics avec  $m/z$  est relativement linéaire et faible sur le TOF tandis qu'elle est plus rapide sur le FT-ICR. Le graphique représentant la résolution en fonction de  $m/z$  a également été tracé à la fois pour le timsTOF et le FT-ICR selon le mode d'acquisition employé. La résolution du TOF est comprise entre 40 000 et 50 000 pour des  $m/z$  entre 400 et 800, tandis qu'elle est un peu plus basse pour les faibles rapports  $m/z$ . Sur le FT-ICR en mode magnitude, la résolution décroît fortement avec  $m/z$ , allant de 80 000 pour  $m/z$  100 à 6 500 pour  $m/z$  800. Ainsi dans les conditions utilisées, il s'avère qu'une **meilleure résolution est atteinte sur le FT-ICR pour des  $m/z < 200$ , tandis que le TOF permet d'obtenir une résolution plus importante pour des  $m/z > 200$ .**

En revanche, dans le mode adsorption, le FT-ICR atteint des résolutions plus élevées que le timsTOF jusqu'à  $m/z$  300. Enfin, lorsque le mode adsorption ainsi que l'allongement du temps d'acquisition des transients avec le Booster sont employés, la résolution atteinte dépasse celle du timsTOF pour des  $m/z$  de 100 à 500. **Ainsi, le Booster associé à un traitement spécifique des transients permet de rendre le FT-ICR autant, voire plus performant, lors des couplages avec la chromatographie que des instruments adaptés et conçus pour les couplages, comme le timsTOF.**

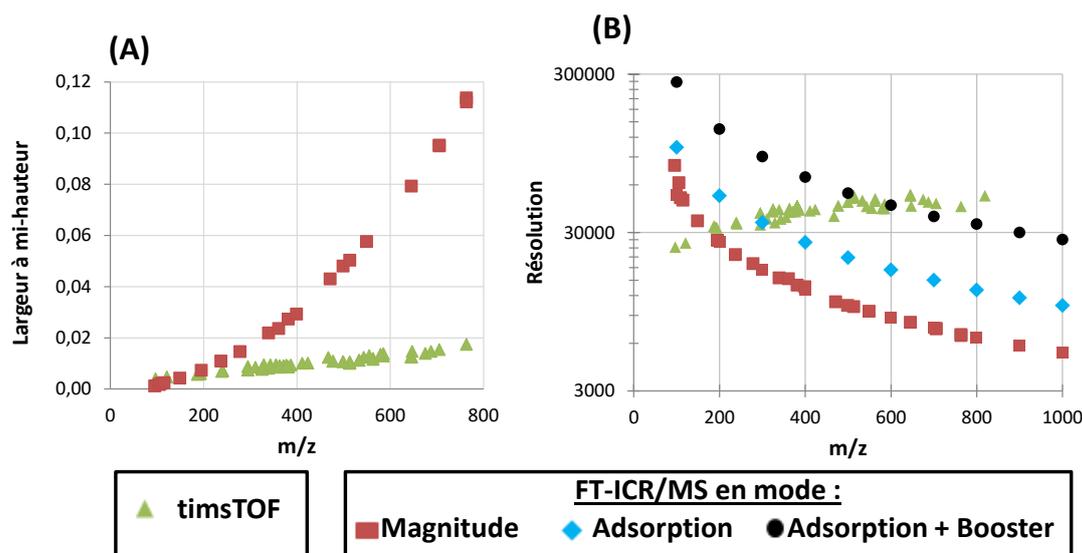


Figure 140 : (A) Largeur à mi-hauteur et (B) résolution obtenues dans les conditions employées sur le timsTOF et le FT-ICR en mode magnitude, adsorption et adsorption avec le Booster.

Concernant la **sensibilité**, il est difficile de comparer la sensibilité d'un appareil à l'autre étant donné que cette dernière dépend de la capacité de la source d'ionisation à former des ions, de la transmission des ions tout du long du spectromètre ainsi que du détecteur. Toutefois, d'après la Figure 139, des sensibilités du même ordre de grandeur sont obtenues avec les deux systèmes.

Enfin, le dernier point de comparaison est l'**exactitude de mesure** des deux spectromètres de masse. Au cours de cette thèse, une calibration externe a été utilisée sur le FT-ICR permettant d'obtenir une incertitude inférieure à 2 ppm et même inférieure à 1 ppm pour la plupart des mesures. Pour atteindre une telle exactitude de mesure, une calibration proche externe est nécessaire sur le timsTOF.

Pour terminer, chaque spectromètre de masse possède des fonctionnalités qui lui sont propres. Le **timsTOF est équipé d'une double cellule de mobilité ionique** ce qui permet d'ajouter une dimension de séparation supplémentaire. Le FT-ICR étant muni d'un LTO, il permet de réaliser **des expériences de fragmentation successives (MS<sup>n</sup>)** apportant des informations structurales complémentaires tandis que le timsTOF permet uniquement de réaliser de la fragmentation en tandem (MS/MS). Cependant, au sein du **LTO, situé en amont de la cellule ICR, le processus de fragmentation ne permet que la fragmentation de l'ion précurseur** (fragmentation temporelle d'un ion isolé à sa fréquence de résonance). En revanche, **au sein de la cellule de collision du timsTOF, les ions fils peuvent également être fragmentés en même temps que l'ion précurseur** (fragmentation spatiale via des collisions par chocs avec un gaz neutre). Afin d'illustrer ces différences, la Figure 141 présente les spectres de fragmentation de l'ion  $C_{15}H_{17}O_8^-$  présent dans l'échantillon B1 et éluant à 13 min, obtenus avec les deux instruments. Pour rappel, nous avons proposé dans le Chapitre 4 une structure développée de ce composé consistant en un acide férulique lié à un pentose via la fonction acide carboxylique. Si l'on compare le spectre MS/MS et le spectre MS<sup>2</sup> obtenus sur le timsTOF et le LTO/FT-ICR respectivement, il apparaît que **la cellule de collision du timsTOF a permis d'obtenir davantage de fragments dans les conditions utilisées**. Le fragment  $C_8H_6O_2^-$  a été produit en une seule étape sur le timsTOF tandis que ce dernier n'a été détecté qu'à partir de l'étape MS<sup>5</sup> avec le LTO/FT-ICR. Par ailleurs, sur le timsTOF, l'ion  $C_{10}H_7O_3^-$  ( $m/z$  175) a été produit avec une intensité relative d'environ 60%, tandis que ce dernier n'a été observé durant aucune des étapes de

fragmentation successives sur le LTQ/FT-ICR. La différence entre ce fragment et l'ion précurseur correspond à une perte de  $C_5H_{10}O_5$ , qui pourrait correspondre à la fragmentation du pentose avec une coupure de type Z.

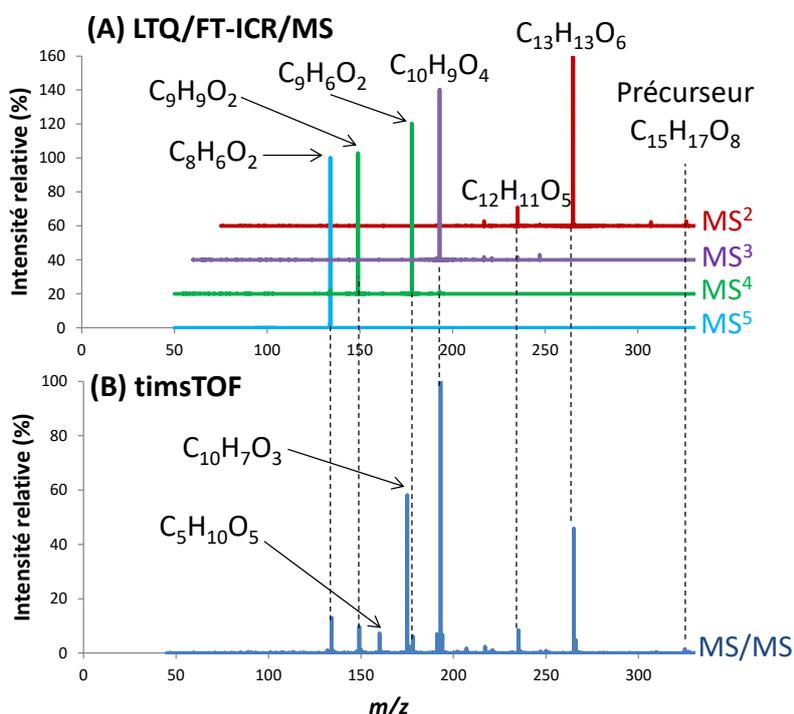


Figure 141 : Comparaison de la fragmentation de l'ion  $m/z$  325,0927 (A) dans le LTQ et (B) dans une cellule de collision

La richesse des spectres MS/MS obtenus avec le timsTOF peut entraîner une exploitation plus complexe pour comprendre la provenance de chaque fragment, mais elle est également un atout pour la recherche de structures développées via des bases de données *in silico* et/ou expérimentales. Enfin, ce grand nombre de fragments peut également faciliter la construction de réseaux moléculaires qui consistent à regrouper les composés en fonction de leurs similarités spectrales observées sur leurs spectres de fragmentation. Ce type d'approche est basé sur l'hypothèse que deux molécules ayant une structure proche, auront un spectre de fragmentation similaire. Lors de la fragmentation avec le LTQ/FT-ICR, la plupart du temps la  $MS^2$  ne permet que d'observer la perte d'une unité de sucre pour les oligomères polysaccharidiques, ou encore un groupement méthoxyle pour les composés phénoliques. Ainsi, deux molécules ayant une partie de leur structure en commun, comme l'acide férulique et l'hybride acide férulique-pentose, n'auront aucun fragment commun en  $MS^2$ . En revanche, la fragmentation dans la cellule de collision du timsTOF permet de fragmenter en MS/MS l'hybride à  $m/z$  325 (Figure 141B) en formant les ions  $C_8H_6O_2^-$  et  $C_9H_6O_2^-$  qui sont également présents lors de la fragmentation de l'acide férulique. Ainsi, la comparaison des spectres MS/MS de ces deux molécules indiquera une similarité qui permettra de les relier. Un exemple de réseau moléculaire sera construit dans la suite de ce chapitre afin d'illustrer les perspectives d'exploitation des spectres de fragmentation.

### 3.3. Vers des couplages à trois et quatre dimensions avec la mobilité ionique

Le couplage de la chromatographie en phases liquide ou supercritique avec la spectrométrie de masse haute résolution s'est avéré vital pour l'analyse de nos échantillons d'intérêt. Par ailleurs, nous avons également été amenés à développer des couplages avec trois dimensions de séparation,

consistant en deux dimensions chromatographiques et la HRMS, pour l'analyse des sucres issus de la conversion de la biomasse ou encore pour la quantification des HAP dans les DSV. L'utilisation du timsTOF a également permis d'ajouter la spectrométrie à mobilité ionique (IMS) en tant que dimension de séparation au sein du couplage RPLC/IMS/HRMS et RPLC×RPLC/IMS/HRMS (Chapitre 5).

Bien que l'IMS ne soit pas une technique récente, cette dernière a connu un regain d'intérêt depuis une quinzaine d'années, notamment avec son couplage avec la spectrométrie de masse comme le montre la Figure 142 représentant le nombre de publications entre 1990 et 2019. Par ailleurs, **son couplage avec la chromatographie en phase liquide s'avère particulièrement adapté compte tenu des échelles de temps**. En effet, en LC l'échelle de temps est la minute, avec des pics de quelques secondes, tandis qu'une analyse IMS ne prend que quelques dizaines ou centaines de millisecondes et quelques dizaines de microsecondes pour le TOF. Ainsi **chaque pic provenant de la dimension précédente est parfaitement échantillonné**. Par ailleurs, **l'ajout de l'IMS au sein du couplage LC/IMS/HRMS permet d'augmenter la capacité de pics sans pour autant augmenter le temps d'analyse**. Les atouts d'un tel couplage lui permettent de concurrencer la chromatographie bidimensionnelle qui est souvent plus difficile à mettre en place et avec un temps d'analyse plus long. En 2017 et 2018, le nombre d'articles référencés sur Scopus traitant du couplage LC/IMS/MS devient pour la première fois plus important que celui traitant du couplage LC×LC/MS.

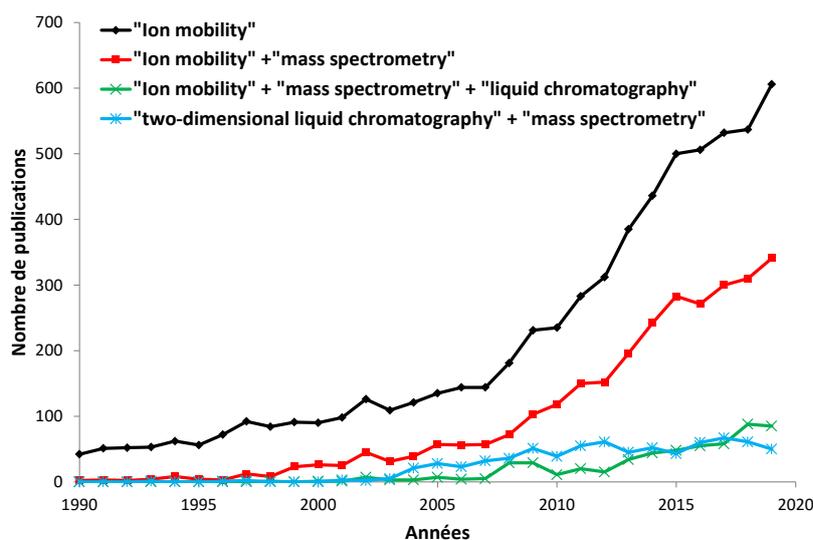


Figure 142 : Nombre de publications répertoriées sur Scopus par année (les mots clés indiqués dans la légende devant être compris dans le titre, le résumé ou les mots clés des articles).

**Malgré ce fort intérêt pour le couplage de l'IMS avec notamment la HRMS, l'orthogonalité de ces deux méthodes est souvent moindre en comparaison à l'orthogonalité entre la LC et la HRMS**. En effet, la séparation en IMS est basée sur la forme mais aussi la taille et la charge des ions comme en spectrométrie de masse. L'occupation de l'espace de la séparation IMS/HRMS est donc partielle, limitant alors la capacité de pics du couplage. Le pouvoir résolutif des couplages développés dans cette thèse sera évalué via les capacités de pics dans la suite de ce chapitre. Par ailleurs, **l'interprétation d'une cartographie LC×LC/HRMS est plus directe que celle d'un couplage LC/IMS/HRMS** étant donné qu'un pic en LC représente une molécule ; alors que les pics représentent des ions sur une cartographie LC *versus* IMS et que plusieurs ions peuvent représenter une même molécule.

Outre l'augmentation du pouvoir résolutif, l'un des principaux intérêts de la mobilité ionique lors d'un couplage LC/IMS/HRMS est de pouvoir obtenir des spectres MS/MS plus propres car plus spécifiques que lors d'un couplage LC/HRMS. En effet, la LC/IMS/HRMS permet de sélectionner un précurseur ( $m/z$ ) associé simultanément à un temps de rétention et une valeur de mobilité ionique. Ainsi on s'affranchit des ions voisins ayant un  $m/z$  et un temps de rétention proches de l'ion précurseur. La Figure 143(C) présente deux spectres de fragmentation issus de l'analyse LC/IMS/HRMS de l'échantillon A1. Le premier correspond au spectre MS/MS de l'ion  $m/z$  381,1052 éluant à 1,6 min, le 2<sup>ème</sup> spectre correspond également à la fragmentation de ce même précurseur mais en sélectionnant uniquement un pic sur le mobilogramme. Dans cet exemple, la sélection simultanément d'un rapport  $m/z$ , d'un temps de rétention et d'une mobilité a permis de « nettoyer » le spectre MS/MS en enlevant certains ions, parfois intenses, du spectre MS/MS obtenu sans sélection via l'IMS. Il est également possible de tracer des EIC pour un rapport  $m/z$  et une mobilité donnés. Il faut néanmoins souligner que ce type d'exemple a été relativement peu rencontré dans nos échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique.

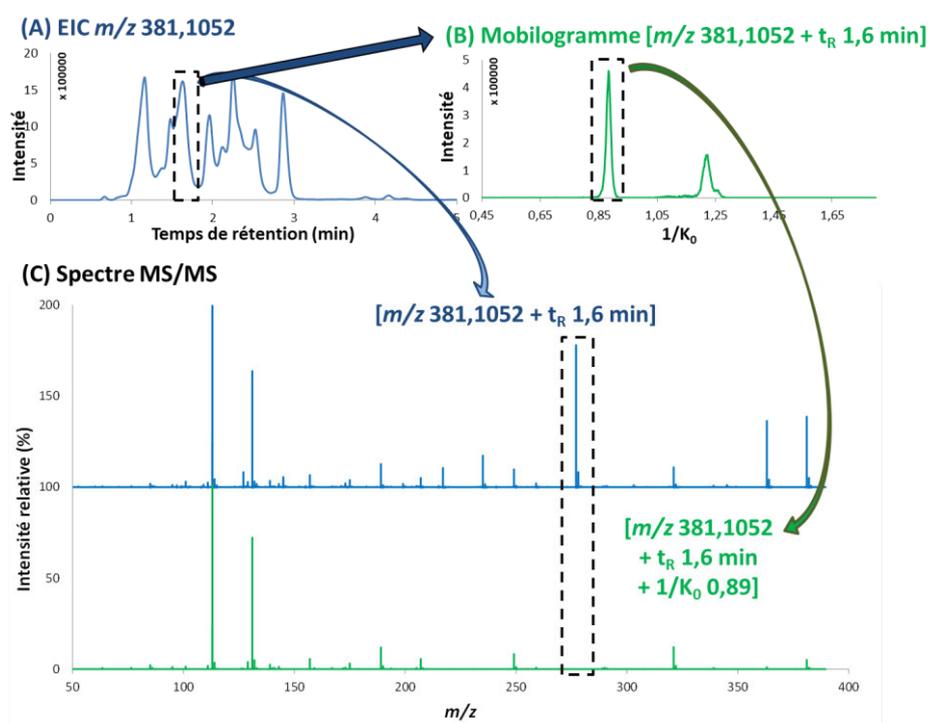
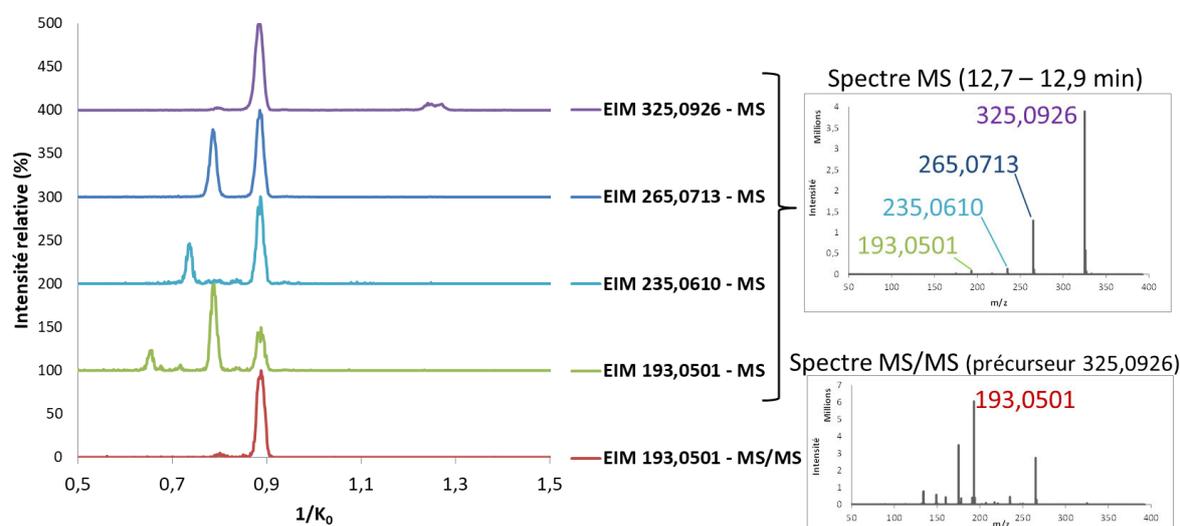


Figure 143 : (A) EIC de l'ion  $m/z$  381,1052  $\pm$  0,005, (B) mobilogramme de cet ion éluant à 1,6 min et (C) spectres MS/MS pour les couples  $[m/z, \text{temps de rétention}]$  et  $[m/z, \text{temps de rétention, mobilité}]$

Par ailleurs, comme discuté dans le Chapitre 5, la mobilité ionique permet également de déterminer la provenance d'ions fragments produits soit avant, soit après la séparation en mobilité ionique, ce qui peut faciliter l'optimisation des paramètres expérimentaux. Un second exemple est donné dans ce chapitre. La Figure 144 présente plusieurs mobilogrammes provenant d'ions mesurés en MS ou MS/MS sous un même pic chromatographique. En MS, quatre ions ont été détectés et on peut faire l'hypothèse que les trois ions à  $m/z$  193, 235 et 265 résultent de la fragmentation de l'ion  $m/z$  325 étant donné que l'ensemble de ces ions élue au même temps de rétention. Les mobilogrammes de ces derniers montrent un pic commun avec un  $1/K_0$  égal à 0,884 V.s/cm<sup>2</sup> mais aussi d'autres pics avec un  $1/K_0$  inférieur. Certains ions ont donc été formés à partir de la fragmentation du précurseur à  $m/z$  325 après leur séparation en mobilité ionique, ce qui explique une valeur de  $1/K_0$  identique. Tandis que d'autres ont été fragmentés en amont de la mobilité ionique (fragmentation en source

par exemple), et ont donc été séparés lors de leur passage dans la cellule de mobilité ionique. Ainsi, l'ion  $m/z$  265 détecté en MS provient pour un peu plus de 50% de la fragmentation en amont de la mobilité ionique. Bien que la fragmentation en source puisse être problématique lors du traitement des données, **elle permet ici de pouvoir mesurer la section efficace (CCS) des fragments et donc faciliter la compréhension des mécanismes de fragmentation.** Dans le cas de l'ion  $m/z$  235, la partie correspondant à la fragmentation après IMS peut ici provenir soit directement de l'ion  $m/z$  325 mais aussi de l'ion  $m/z$  265. Pour l'ion  $m/z$  193 qui a été identifié comme l'acide férulique dans le Chapitre 4, trois pics sont visibles sur le mobilogramme. Celui avec un  $1/K_0$  de 0,886 peut provenir de la fragmentation après IMS des trois autres ions avec la même mobilité. Par ailleurs, le mobilogramme de l'ion  $m/z$  193 provenant du spectre MS/MS du précurseur  $m/z$  325 ne montre que ce pic de mobilité étant donné qu'il a été obtenu dans la cellule de collision placée après la séparation en mobilité ionique. Le pic du milieu avec un  $1/K_0$  de 0,789 ne peut provenir que de la fragmentation après la mobilité ionique de l'ion  $m/z$  265, lui-même produit à partir de la fragmentation de l'ion  $m/z$  325 avant la mobilité ionique. Enfin le premier pic avec un  $1/K_0$  de 0,657 a été produit avant son passage en mobilité ionique. Sa valeur de  $1/K_0$  peut donc être convertie en CCS et comparée à une valeur prédite ou expérimentale. La valeur mesurée est ici de  $140,8 \text{ \AA}^2$ . La prédiction de la CCS de l'acide férulique (via <http://allccs.zhulab.cn/login?url=//allccs.zhulab.cn/prediction/>) permet d'estimer la CCS à  $141,2 \text{ \AA}^2$ , soit une différence de moins de 0,3% par rapport à la valeur mesurée expérimentalement. **Ainsi, la mobilité ionique permet de conforter des hypothèses réalisées à partir des expériences de fragmentation.** Plus globalement, **la valeur de CCS est un élément pouvant être utilisé lors de l'identification structurale afin de rejeter ou alors d'appuyer des structures hypothétiques.**



**Figure 144 : Mobilogrammes des ions extraits (EIM) à partir du spectre MS issu de l'intégration du pic chromatographique entre 12,7 et 12,9 min et du spectre MS/MS provenant de la fragmentation de l'ion  $m/z$  325,0926 (le tracé des EIM a été réalisé avec une tolérance de  $m/z \pm 0,005$ )**

Enfin, il est également possible de coupler l'IMS/HRMS à la chromatographie bidimensionnelle afin d'augmenter encore plus la sélectivité et la capacité de pics comme réalisé dans le Chapitre 5. Ce couplage nous a permis de séparer des ions ayant le même rapport  $m/z$  et les mêmes temps de rétention en première et seconde dimension. De plus, la RPLC×RPLC en amont de la séparation par mobilité ionique permet de diminuer les co-élutions et ainsi faciliter l'interprétation des mobilogrammes. **La complexité de ce couplage réside dans la représentation, le traitement et**

**l'exploitation des données à quatre dimensions.** Dans la littérature, on trouve moins de dix publications ayant employé l'IMS dans un couplage à plus de trois dimensions.

## 4. Pouvoir résolutif des couplages et intérêts

### 4.1. Pouvoir résolutif des couplages réalisés

**Afin d'estimer le pouvoir résolutif global des couplages, la capacité de pics, habituellement utilisée en chromatographie, a été calculée pour l'ensemble des méthodes développées.** Bien que les calculs de capacité de pics ne soient pas totalement adaptés à la mobilité ionique et à la spectrométrie de masse étant donné que ces techniques séparent des ions et non des molécules, l'objectif étant de positionner les couplages les uns par rapport aux autres, nous avons utilisé les équations décrites dans la partie 3.1 de ce chapitre pour réaliser l'ensemble des calculs. De plus, ces derniers tiennent compte d'une séparation à  $4\sigma$  des pics.

En considérant la largeur des pics à  $4\sigma$  pour  $m/z$  400 en HRMS et une fenêtre de séparation entre  $m/z$  100 et 800, **les capacités de pics du timsTOF et du FT-ICR peuvent être évaluées à 40 000 et 14 000 respectivement.** Ces capacités correspondent au nombre d'ions qui pourraient être différenciés en HRMS. Lors de l'ionisation d'un composé, un certain nombre d'ions est produit qui dépend à la fois de la molécule, de la source d'ionisation employée et des conditions expérimentales. Ainsi, la capacité de la HRMS à séparer des analytes est moindre en comparaison des capacités de pics calculées. Plus le nombre d'ions formés par composé sera grand, et plus la capacité à distinguer un grand nombre de molécules sera faible.

Lorsque la HRMS est couplée à une ou plusieurs dimensions de séparation, il est **nécessaire d'évaluer l'occupation de l'espace de la même façon qu'en chromatographie bidimensionnelle.** En revanche, le coefficient  $\alpha$  qui estime le sous-échantillonnage lors du passage d'une dimension à une deuxième, peut être considéré comme égal à 1 au vu de la différence des échelles de temps entre la HRMS et la chromatographie. Par ailleurs, **l'interface entre la méthode chromatographique et la HRMS peut créer une dispersion engendrant une diminution de la capacité de pics effective du couplage.** Ainsi, **un nouveau facteur correctif, que nous nommerons  $\beta$ ,** a été appliqué afin de prendre en compte cet élargissement de pic. Au vu des résultats présentés dans le Tableau 38, nous attribuerons un facteur correctif  $\beta$  de 0,9 pour le couplage RPLC/HRMS lorsqu'un split de 1:2 est utilisé (cas du couplage avec le FT-ICR), de 1 pour la RPLC/HRMS si aucun split n'est utilisé (cas du timsTOF), de 0,5 pour la RPLC×RPLC en ligne et enfin nous appliquerons un facteur de correction de 0,8 pour la SFC/HRMS ou la CPC×SFC/HRMS hors-ligne. Le Tableau 39 présente les facteurs de correction à appliquer sur les capacités de pics. À noter que l'occupation de l'espace a été évaluée en considérant l'ensemble des ions incluant les potentiels fragments et adduits. De plus, la mesure de l'occupation de l'espace dépend également du nombre d'ions et du seuil sélectionnés. Étant donné que deux spectromètres de masse ont été employés, on ne peut pas fixer un seuil absolu. Nous avons donc sélectionné l'ensemble des ions détectés ayant une intensité supérieure à 1% de l'intensité de l'ion le plus intense. Les analyses de l'échantillon A1 provenant de la biomasse et le DSV 6 ont été utilisées pour les calculs.

**Tableau 39 : Estimation des différents facteurs correctifs pour le calcul de la capacité de pics effective des couplages**

	HRMS	Echantillons	$V_{D1-D2}$	$V_{D1-D3}$	$V_{D2-D3}$	$V_{global}$	$\alpha$	$\beta$	Facteur correctif global
<b>RPLC/HRMS</b>	FT-ICR/MS	Biomasse	0,98	/	/	0,98	1,00	0,90	<b>0,88</b>
<b>RPLC/HRMS</b>	timsTOF	Biomasse	0,98	/	/	0,98	1,00	1,00	<b>0,98</b>
<b>LLE×RPLC/HRMS</b>	FT-ICR/MS	Biomasse	0,70	1,00	0,98	0,69	1,00	0,90	<b>0,62</b>
<b>RPLC×RPLC/HRMS (en ligne)</b>	timsTOF	Biomasse – sucres	0,75	0,99	0,99	0,74	0,88	0,50	<b>0,33</b>
<b>RPLC/IMS/HRMS</b>	timsTOF	Biomasse – sucres	0,96	1,00	0,77	0,74	1,00	1,00	<b>0,74</b>
<b>SFC/HRMS</b>	FT-ICR/MS	DSV après HDT/HCK	0,94	/	/	0,94	1,00	0,80	<b>0,75</b>
<b>CPC×SFC/HRMS (hors ligne)</b>	FT-ICR/MS	DSV	0,86	0,93	0,94	0,75	0,88	0,80	<b>0,53</b>

Pour les méthodes employant deux dimensions, à savoir la RPLC/HRMS et la SFC/HRMS, le facteur global de correction est compris entre 0,75 et 0,98. En revanche, pour celles employant trois dimensions, ce facteur de correction est compris entre 0,33 et 0,74. Le couplage tridimensionnel le plus favorable est la RPLC/IMS/HRMS avec un facteur de correction global de 0,74 du fait des échelles de temps entre les dimensions particulièrement adaptées. En revanche, les méthodes employant deux dimensions chromatographiques ont un facteur de correction faible (impliquant une forte correction de la capacité de pics), et plus particulièrement la RPLC×RPLC/HRMS en ligne qui possède un facteur correctif de 0,33 principalement lié à l'élargissement des pics à l'interface entre la LC et la HRMS.

De manière générale, **l'augmentation du nombre de dimensions tend à diminuer l'occupation de l'espace global**. Pour autant, la capacité de pics effective des couplages ( $n^*_{couplage}$ ) augmente largement malgré ces facteurs de correction, comme présenté dans le Tableau 40. Le couplage de la RPLC ou de la SFC avec la HRMS, permet d'augmenter la capacité de pics/d'ions à plus de 1 000 000 et jusqu'à 9 000 000 avec l'utilisation du timsTOF. Une telle résolution nous a permis au cours de cette thèse de caractériser de manière non-ciblée des échantillons issus de la biomasse ou encore de quantifier les HAP dans des matrices pétrolières hydrotraitées et hydrocraquées. Cette capacité de pics a pratiquement pu être multipliée par 3 via un pré-fractionnement des échantillons lignocellulosiques. Par ailleurs, en plus d'augmenter le pouvoir résolutif, la LLE×RPLC/HRMS a permis de limiter le nombre de composés simultanément ionisés et ainsi de simplifier les spectres de masse et leur traitement. Le couplage en ligne de la RPLC×RPLC/HRMS permet d'atteindre les 13 000 000 en capacité de pics malgré le facteur correctif appliquée qui divise la capacité de pics théorique ( $n_{couplage}$ ) par 3. Le couplage hors-ligne de la CPC à la SFC/HRMS a quant à lui permis d'atteindre une capacité de pics de près de 14 000 000. Ce couplage très performant nous a permis de quantifier les HAP dans les DSV qui sont des mélanges particulièrement complexes. **La grande capacité de pics apportée par la CPC×SFC a été cruciale pour limiter les effets de matrice en HRMS**. Ce couplage aurait également pu être réalisé sur le timsTOF, ce qui aurait permis d'atteindre une capacité de pics effective de près de 40 000 000. Enfin, la RPLC/IMS/HRMS permet d'atteindre une capacité de pics supérieure à 150 000 000. Cependant, **de la même manière qu'en HRMS, la mobilité ionique souffre également de la suppression d'ionisation qui a lieu dans la source d'ionisation**. Ainsi, la RPLC/IMS/HRMS n'aurait par exemple pas permis de quantifier les HAP dans les DSV malgré sa grande capacité de pics. **La mobilité ionique peut être un réel atout dans un couplage, notamment pour étudier des isomères, toutefois elle ne peut remplacer une dimension chromatographique**. En effet, la chromatographie est souvent utilisée non pas uniquement pour son pouvoir résolutif qui, en comparaison à la HRMS, est très faible, mais pour **(1) séparer des composés selon une ou plusieurs**

propriétés chimiques ou physiques et ainsi faciliter l'interprétation des spectres de masse et de fragmentation et (2) éviter les effets de matrice en HRMS et ainsi permettre l'obtention de résultats plus représentatifs de la composition des échantillons allant jusqu'à la quantification des analytes.

Tableau 40 : Capacités de pics théoriques et effectives des couplages développés au cours de cette thèse

	HRMS	Echantillons	$n_{c,D1}$	$n_{c,D2}$	$n_{c,D3}$	$n_{\text{couplage}}$	$n^*_{\text{couplage}}$
<b>RPLC/HRMS</b>	FT-ICR/MS	Biomasse	235	14 000	/	3 290 000	<b>2 895 000</b>
<b>RPLC/HRMS</b>	timsTOF	Biomasse	235	40 000	/	9 400 000	<b>9 212 000</b>
<b>LLE×RPLC/HRMS</b>	FT-ICR/MS	Biomasse	4	235	14 000	13 160 000	<b>8 159 000</b>
<b>RPLC×RPLC/HRMS (en ligne)</b>	timsTOF	Biomasse – sucres	74	14	40 000	41 440 000	<b>13 675 000</b>
<b>RPLC/IMS/HRMS</b>	timsTOF	Biomasse – sucres	234	22	40 000	205 920 000	<b>152 381 000</b>
<b>SFC/HRMS</b>	FT-ICR/MS	DSV après HDT/HCK	157	14 000	/	2 198 000	<b>1 649 000</b>
<b>CPC×SFC/HRMS (hors ligne)</b>	FT-ICR/MS	DSV	12	157	14 000	26 376 000	<b>13 980 000</b>

Concernant le couplage RPLC×RPLC/IMS/HRMS, il est difficile d'estimer l'occupation de l'espace compte tenu des outils disponibles pour le traitement des données. En se basant sur l'occupation de l'espace des méthodes RPLC×RPLC/HRMS ainsi que RPLC×IMS et IMS×HRMS calculées pour le couplage RPLC/IMS/HRMS, le facteur de correction global de la RPLC×RPLC/IMS/HRMS devrait être inférieur à 0,25 conduisant à une capacité de pics corrigée de 228 000 000.

#### 4.2. Besoin et intérêt d'une grande résolution

L'objectif premier des méthodes multidimensionnelles est d'augmenter la résolution, c'est à dire la capacité de pics, dans le but de séparer davantage d'analytes au sein d'un mélange complexe. Comme nous l'avons vu, une grande résolution peut être atteinte de différentes façons. Le moyen le plus rapide est l'introduction directe en HRMS avec des spectromètres puissants comme les FT-ICR. Toutefois, comme cela a été démontré dans le Chapitre 3, un biais entre la composition réelle et les résultats peut être obtenu à cause des effets de matrice dans la source d'ionisation. Bien que toutes les méthodes ne requièrent pas une analyse quantitative, ces biais peuvent également conduire à des interprétations erronées. **Ajouter une dimension de séparation est apparu alors comme une solution adéquate**, notamment pour analyser des échantillons issus de la biomasse lignocellulosique. **Outre augmenter la capacité de pics et diminuer les effets de matrice, l'ajout d'une dimension de séparation apporte également des informations qui peuvent aider à l'identification.** En effet, en RPLC par exemple, un composé très polaire (avec un rapport O/C élevé) éluera en début d'analyse lorsque le pourcentage d'eau au sein de la phase mobile est élevé. Ce type d'information permet alors d'ajouter un degré de confiance supplémentaire lors de l'attribution des formules brutes. La capacité de pics de la RPLC/HRMS a été augmentée avec un pré-fractionnement LLE de l'échantillon initial qui a ainsi permis de quantifier des composés non détectables auparavant [45]. **Dans cette thèse, le fractionnement LLE par famille chimique a été mis à contribution afin de faciliter la compréhension de la fragmentation de composés inconnus** (Chapitre 4). Le couplage de la chromatographie à la HRMS a également permis de quantifier les HAP dans des matrices pétrolières en sortie du procédé d'hydrocraquage via la SFC/HRMS (Chapitre 6). Cependant, pour des mélanges plus complexes en termes de nombre de composés, le couplage d'une dimension chromatographique à la HRMS s'est avéré insuffisant. **La quantification des HAP dans les DSV par exemple a nécessité d'augmenter le pouvoir résolutif en amont de la HRMS pour réduire les effets**

**de matrice.** De plus, la HRMS a joué un vrai rôle en tant que dimension de séparation en distinguant les composés hydrocarbonés et azotés co-éluant parfois en CPC×SFC.

**En résumé, l'augmentation de la résolution via l'augmentation du nombre de dimensions présente plusieurs intérêts :** (1) **augmenter la capacité de pics du couplage pour pouvoir séparer davantage de composés,** (2) **diminuer les effets de matrice via l'augmentation de la résolution chromatographique** et (3) **apporter des informations complémentaires avec par exemple des cartographies organisées.** Ainsi, bien que des capacités de pics infinies ne soient potentiellement pas nécessaires, l'augmentation du nombre de dimensions permettra toujours d'approfondir la compréhension de la composition des échantillons complexes, sous réserve que ces dimensions soient un minimum orthogonales. La Figure 145 schématise l'apport de la capacité de pics du couplage *versus* la capacité de pics apportée uniquement par la chromatographie au sein de ces couplages. **Le pouvoir résolutif de la chromatographie permet de s'orienter vers des méthodes quantitatives plus fiables.** Toutefois, l'augmentation du nombre de dimensions chromatographiques engendre souvent une augmentation du temps d'analyse. **L'augmentation de la capacité de pics globale du couplage via plusieurs dimensions permet de détecter potentiellement davantage de composés.** En revanche, le traitement des données sera également plus complexe. Pour atteindre une connaissance complète de l'échantillon, la méthode analytique devrait avoir simultanément un grand pouvoir résolutif chromatographique et une capacité de pics très élevée.

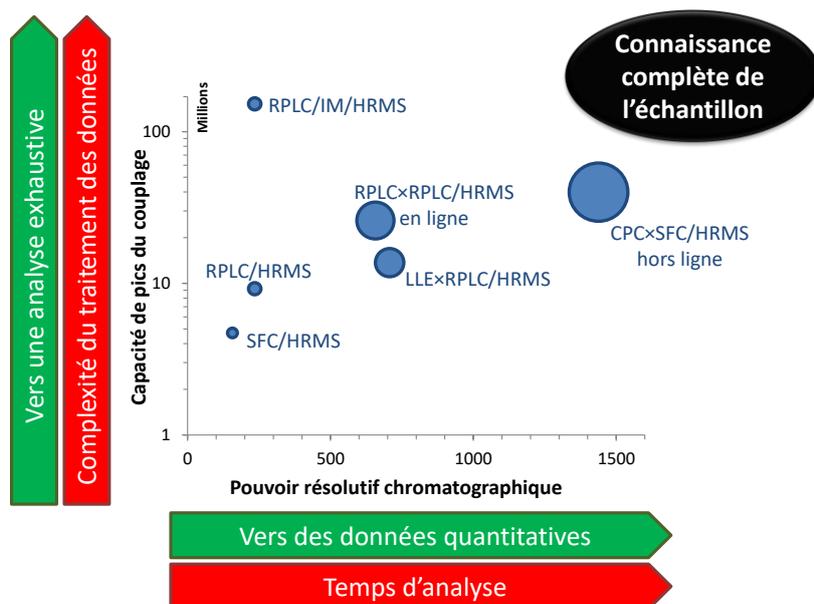


Figure 145 : Capacité de pics des couplages (HRMS = timsTOF) en fonction de la capacité de pics apportée par la chromatographie. L'aire des bulles est proportionnelle au temps d'analyse.

## 5. Échantillons complexes : vers un développement analytique et un traitement des données complexes

### 5.1. Du développement analytique au traitement de données multidimensionnelles

Aujourd'hui, les deux principales limites au développement de méthodes multidimensionnelles sont d'une part **la difficulté expérimentale et le temps nécessaire pour développer ces méthodes,** et d'autre part **le traitement et l'exploitation des données acquises.**

Concernant le premier point, nous avons au cours de cette thèse développé **une méthodologie pour optimiser le couplage de la chromatographie à la HRMS via des plans d'expériences**. Cette dernière permet d'obtenir des conditions de désolvatation et d'ionisation optimisées en approximativement trois jours sans nécessité d'être constamment devant l'appareillage. Les méthodes chromatographiques ont été développées en tenant compte des contraintes liées au couplage avec la HRMS (débit, choix et quantité des additifs, etc.). Ensuite, lors de l'utilisation de plusieurs dimensions chromatographiques, le choix des dimensions a été réalisé en fonction des besoins analytiques. Par exemple, la CPC en tant que première dimension s'est avérée un choix judicieux pour une analyse quantitative étant donné qu'elle permet une perte limitée d'échantillon (absence d'absorption irréversible sur une phase stationnaire solide) et qu'une quantité relativement importante d'échantillon pouvait être injectée. Par ailleurs, le nombre de DSV pour lequel il est nécessaire de quantifier les HAP est relativement restreint. Ainsi, le temps d'analyse n'était pas la première préoccupation dans le cas de l'étude réalisée.

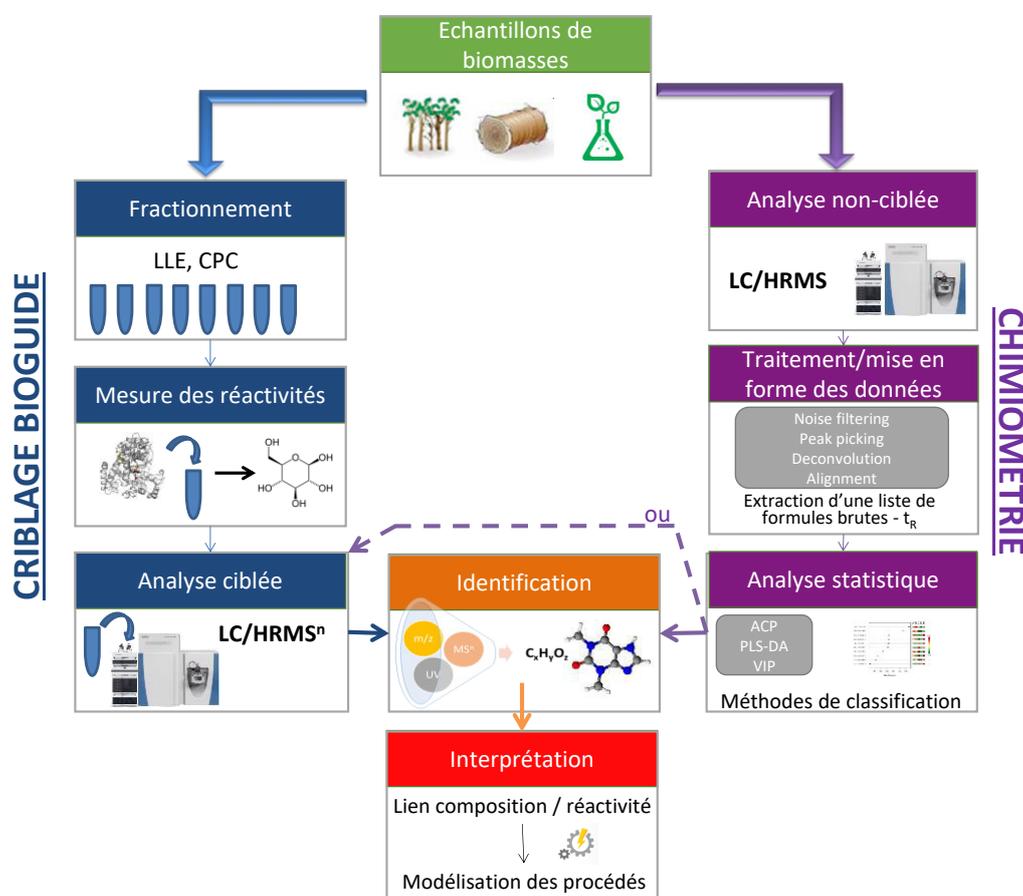
Le second verrou porte sur **le traitement des données multidimensionnelles**. Dans le cas du couplage d'une dimension chromatographique avec la HRMS, il existe des logiciels tels que MZmine permettant de traiter les données afin d'obtenir une liste de temps de rétention associés à une formule brute. Cependant pour des méthodes tridimensionnelles, il existe un vrai manque dans les logiciels de retraitement disponibles. Il est possible de traiter chaque modulation entre la première et la deuxième dimension individuellement puis de réaligner les données comme cela a été fait pour la CPC×SFC/HRMS. En revanche, pour des couplages en ligne du type RPLC×RPLC/HRMS avec de hautes fréquences d'acquisition, la taille des données une fois converties en .mzxml ne permet aucun traitement sur un ordinateur classique. Le dépouillement s'effectue alors manuellement sur le logiciel constructeur, ce qui peut limiter l'exploitation des données.

## 5.2. Perspectives pour l'analyse structurale

Pour terminer, **un troisième verrou en lien avec le traitement des données lors de l'analyse structurale via des expériences de fragmentation, est l'exploitation des spectres de fragmentation permettant d'aller jusqu'à la proposition d'une structure développée**. Nous avons démontré dans le Chapitre 4 que la fragmentation  $MS^n$  permettait d'obtenir des informations pertinentes, cependant l'exploitation via la comparaison de spectres *in silico* ou expérimentaux était uniquement pertinente pour des composés connus et largement référencés. Pour certains de nos composés présents dans les échantillons de biomasse, seule l'interprétation manuelle des spectres de fragmentation permettait de proposer une structure développée cohérente avec les pertes observées. Cette exploitation manuelle est cependant très consommatrice en temps et ne peut donc pas être réalisée sur tous les composés fragmentés. À ce stade, plusieurs stratégies sont possibles en fonction du besoin analytique.

**La première stratégie consiste à passer d'une analyse non-ciblée à une analyse ciblée**. Dans le cas de la conversion biochimique de la biomasse, au cours de cette thèse, nous n'avons pas suffisamment de recul pour mettre en avant les composés pertinents à exploiter qui pourraient en partie expliquer la réactivité des échantillons. C'est pourquoi les méthodes analytiques développées avaient pour objectif de décrire le maximum d'analytes appartenant à diverses familles chimiques présentes dans les échantillons. Aujourd'hui, il apparaît pertinent d'employer ces méthodes sur un large panel d'échantillons afin d'obtenir un set de données, qui permettra de **faire ressortir les composés pouvant expliquer la différence de réactivité des échantillons via des traitements**

**statistiques et chimiométriques.** À partir de là, une analyse et un traitement des données ciblés pourraient être réalisés. **Un second moyen de cibler, ou tout du moins de réduire l'espace chimique d'intérêt, serait d'employer une stratégie de criblage bioguidé** via des mesures de réactivité. Par exemple, dans le Chapitre 4 un échantillon aqueux de biomasse a été fractionné en quatre fractions qui ont par la suite été analysées par RPLC/HRMS<sup>n</sup>. La mesure de la réactivité de chaque fraction à l'hydrolyse enzymatique pourrait permettre d'identifier la ou les fractions d'intérêt et ainsi se focaliser uniquement sur ces dernières en employant la méthode analytique adéquate : RPLC×RPLC/HRMS pour les sucres ; RPLC/HRMS pour les composés phénoliques. Pour aller plus loin, un fractionnement plus fin serait également possible via la CPC développée dans la thèse d'Alexis DUBUIS, par exemple. **La mutualisation des résultats des deux approches (statistique et criblage bioguidé) pourrait permettre la mise en évidence des espèces clés pour lesquelles une analyse structurale via la RPLC/HRMS<sup>n</sup>, la RPLC/IMS/MS/MS ou d'autres techniques, comme la RMN, serait réalisée.** Cette première stratégie est illustrée sur la Figure 146.



**Figure 146 : Stratégie pour passer d'une analyse non-ciblée à une analyse ciblée via le criblage bioguidé ou les outils statistiques**

**La seconde stratégie** possible lorsque l'ensemble d'un mélange a un intérêt (recherche de molécules plateformes à forte valeur ajoutée par exemple) est d'utiliser dans un premier temps **des méthodes de déréplication**. L'objectif est **d'identifier rapidement et de manière automatisée les composés connus** déjà étudiés. En LC/HRMS<sup>n</sup> ou LC/MS/MS, un moyen d'identifier les molécules connues est la comparaison des spectres de fragmentation avec des bases de données expérimentales ou *in silico* comme présenté dans le Chapitre 4. La première étape d'une telle approche est de déterminer le type d'ions formé ( $[M-H]^-$ ,  $[M+HCO_2H-H]^+$ , etc.) puis de déterminer la formule brute du composé

d'intérêt. Cette étape peut être réalisée en utilisant MZmine. La seconde étape consiste à interroger des bases de données du type PubChem ou alors des bases de données plus spécialisées. Ensuite, les spectres MS<sup>2</sup> acquis sont comparés à des spectres expérimentaux ou *in silico* générés à partir des candidats retenus durant la précédente étape. Deux logiciels ont été comparés au cours de cette thèse : MetFrag et CFM-ID. Les structures proposées seront classées selon plusieurs critères (ressemblance du spectre acquis avec le spectre de la base de données, fréquence de citations). **Cette méthodologie reste toutefois relativement longue à appliquer**, notamment lorsqu'un grand nombre de candidats ont des scores proches et doivent être triés manuellement pour supprimer les propositions non cohérentes selon l'utilisateur. **Afin d'améliorer les annotations et la cohérence des structures proposées, il serait pertinent d'ajouter pour chaque ion précurseur son temps de rétention, spectre UV ou encore sa section efficace de collision (CCS) obtenue à partir de la mobilité ionique.** À ce jour, il n'existe pas de bases de données disponibles en ligne concaténant toutes ces informations. Il existe des plateformes permettant de prédire un spectre MS/MS (*in silico*), d'autres permettant la prédiction de la CCS ; mais il n'existe pas un outil qui simule à la fois le spectre MS/MS et la CCS de plusieurs candidats issus de bases de données (spectrales ou moléculaires) pour ensuite les comparer à nos valeurs. La seule possibilité est alors de créer sa propre base de données qu'il faudra enrichir au fil du temps.

**Une alternative complémentaire à la déréplication est la construction de réseaux moléculaires** qui permettent de regrouper des composés ayant des spectres MS/MS proches sous forme de clusters. Les composés ayant des structures proches (appartenant à une même famille moléculaire) seront ainsi regroupés entre eux au sein du réseau. L'identification d'une molécule à l'intérieur d'un cluster permet d'apporter des informations structurales sur des composés inconnus. Ainsi, cette approche permet d'avancer dans la **caractérisation et la découverte de nouvelles molécules**, ce qui n'est pas possible avec la stratégie de déréplication précédente. Un exemple de réseau moléculaire a été construit pour l'échantillon A1 à partir des données acquises en MS/MS sur le timsTOF et exportées au format MGF (Mascot Generic Format) via le logiciel DataAnalysis 5.2. Le fichier .mgf contient la liste des ions précurseurs ( $m/z$  et temps de rétention) associés aux fragments mesurés ( $m/z$ , intensité). Ce dernier a été importé sur la plateforme GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) qui permet de comparer les spectres MS/MS en recherchant des ions fragments ou des pertes communes. Si la similarité entre deux spectres MS/MS dépasse un score défini par l'utilisateur, un lien sera créé entre les deux précurseurs. Les résultats peuvent être visualisés avec le logiciel Cytoscape. La Figure 147 représente plusieurs réseaux moléculaires obtenus pour le même échantillon mais en modifiant le seuil d'intensité des fragments et la valeur minimale de similarité (score cosinus) pour que deux ions parents, correspondant à des nœuds, soient reliés. Ainsi, l'augmentation du seuil d'intensité des ions fragments réduit la probabilité de retrouver des ions similaires entre plusieurs spectres MS/MS. Dans le même temps, certains précurseurs peu intenses sont également supprimés du réseau étant donné que ces derniers n'ont plus d'ions fragments pour des valeurs élevées en seuil d'intensité. Le nombre de nœuds a ainsi été divisé par 3, de 153 à 53, en augmentant le seuil d'intensité de 2000 à 5000. Le nombre de connexions entre les nœuds diminue également en passant de 254 à 85 pour des seuils d'intensité de 2000 et 5000 respectivement. De la même façon, l'augmentation du score cosinus minimal à atteindre pour considérer la similarité entre deux spectres MS/MS diminue la taille des réseaux moléculaires. Pour 153 nœuds, 186 connexions ont été faites avec un score cosinus minimal de 0,80 contre 303 pour un score cosinus devant être supérieur à 0,50.

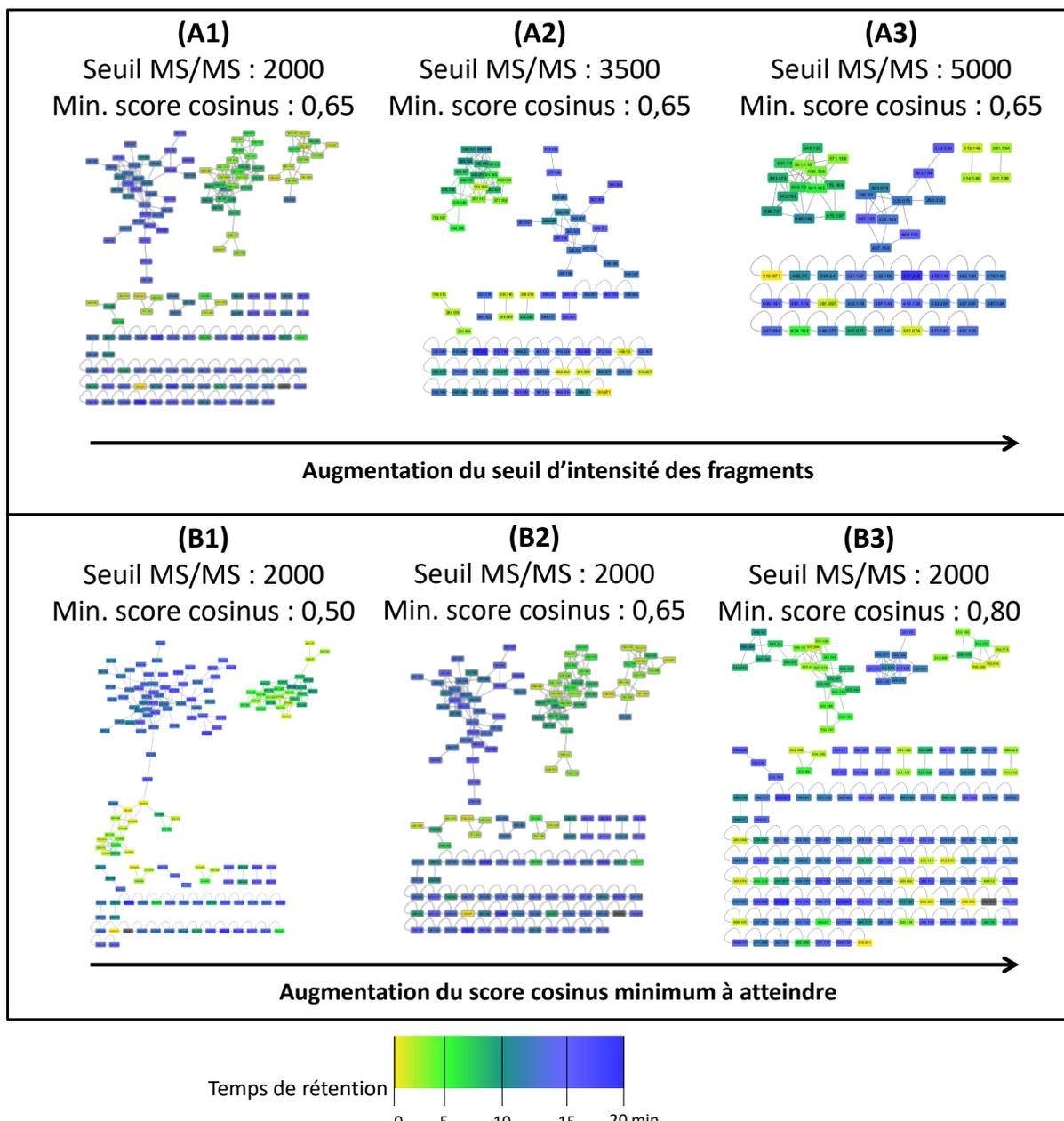


Figure 147 : Réseaux moléculaires obtenus à partir d'un même fichier mgf issu des données de fragmentation de l'échantillon A1 sur le timsTOF selon différents (A) seuils d'intensité des ions fragments et (B) scores cosinus (la couleur des nœuds représente le temps de rétention)

Ces exemples permettent d'illustrer l'importance du réglage des paramètres lors de la construction d'un réseau moléculaire, à la fois sur GNPS mais aussi lors de la création du fichier .mgf. Par ailleurs, plusieurs nœuds peuvent représenter un ion parent avec le même rapport  $m/z$  mais avec un temps de rétention différent (tolérance de 0,5 min dans les exemples ci-dessus) dans le cas d'isomères chromatographiquement séparés. De plus, il est possible qu'un même composé se retrouve sous plusieurs nœuds si ce dernier a été fragmenté en amont de la cellule de collision. Afin d'améliorer la construction des réseaux moléculaires, il serait pertinent de regrouper ces fragments provenant d'un seul et même composé en comparant par exemple les ions du spectre MS et ceux des spectres MS/MS associés à une tolérance en temps. Cette fonctionnalité est disponible sur MetaboScape (Bruker, Allemagne), mais n'a pas été évaluée dans ces travaux.

La Figure 148 représente une partie du réseau moléculaire obtenu avec un seuil d'intensité des ions fragments de 2000 et un score cosinus minimal de 0,65. La couleur des nœuds représente le temps de rétention de l'ion précurseur. Il apparaît que les composés considérés comme similaires ont également des temps de rétention proches. Au sein du cluster formé à partir des composés éluant globalement après 10 min, on retrouve trois composés pour lesquels une structure de type complexe lignine-carbohydrate avait été proposée dans le Chapitre 4. On peut donc faire l'hypothèse que ce cluster rassemble ces composés hybrides. Les deux autres clusters sont principalement constitués de molécules éluant entre 0 et 10 min dans la méthode RPLC employée. Une structure avait également été proposée pour l'un des composés présent dans le cluster de droite sur la figure. Il s'agissait d'un acide méthylglucuronique lié à un pentose. Ce dernier est lié au nœud correspondant à l'ion  $m/z$  381,1038 ( $C_{14}H_{21}O_{12}^-$ ), soit une différence de  $C_2H_2O$  entre les deux composés. De plus, ils se fragmentent en formant l'ion  $m/z$  249,0610 ( $C_9H_{13}O_8^-$ ) avec une intensité relative de 100% ainsi que quatre autres fragments en commun. On peut donc supposer que ces deux composés ont une partie de leur structure similaire et appartiennent à la même famille chimique.

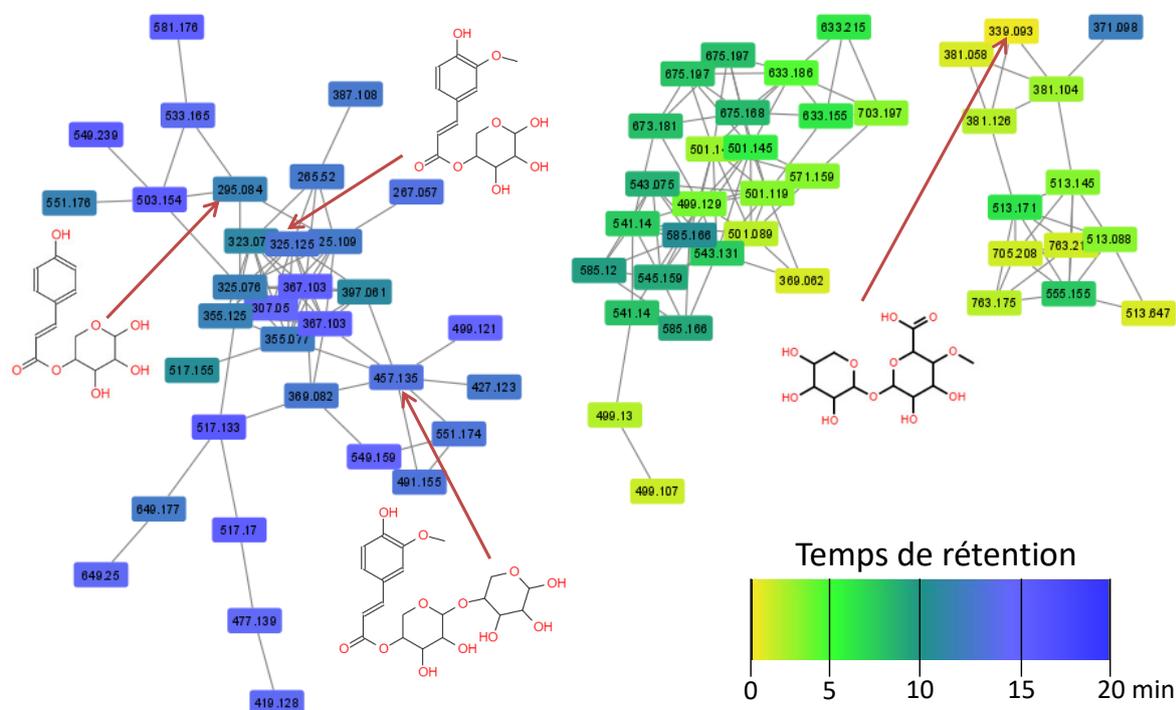


Figure 148 : Réseau moléculaire obtenu pour l'échantillon A1 avec un seuil d'intensité des ions MS/MS de 2000 et un score cosinus minimal de 0,65

La construction de réseaux moléculaires lors de l'analyse non-ciblée de mélanges complexes semble donc être pertinente **pour classer les composés par famille chimique**. En parallèle à une optimisation des paramètres expérimentaux afin d'obtenir des spectres de fragmentation de qualité, de **nombreux autres paramètres en relation avec le post-traitement des données doivent également être choisis avec attention pour générer des réseaux moléculaires cohérents**. Enfin, cette approche pourrait également être employée de façon complémentaire au criblage bioguidé afin de cibler une famille chimique pouvant expliquer la réactivité d'un mélange.

## 6. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mettre en évidence les avantages et inconvénients des méthodes multidimensionnelles développées dans cette thèse au regard des mélanges complexes à caractériser et des besoins analytiques. **La complexité variée tant en termes d'échantillon (nombre d'analytes, large gamme de polarité, etc.) que de besoins analytiques (quantification, analyse structurale), nous a amenés à coupler plusieurs dimensions séparatives avec la spectrométrie de masse haute résolution.**

Ainsi, **l'augmentation de la capacité de pics via la chromatographie**, et plus particulièrement la chromatographie bidimensionnelle hors-ligne, a permis d'accéder à des **données quantitatives**. Bien que moins performante en termes de capacité de pics, la chromatographie bidimensionnelle en ligne permet une analyse plus rapide. Cette dernière a par exemple permis de séparer les sucres atypiques issus de la conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique. En couplage avec la spectrométrie de masse, la LC×LC hors-ligne s'est avérée plus adaptée. En effet, avec la LC×LC en ligne, les pics de seconde dimension étant particulièrement fins, la dispersion créée à l'interface de la LC et de la HRMS engendre une perte de capacité de pics non négligeable.

Le couplage de méthodes chromatographiques avec la spectrométrie de masse haute résolution a été essentiel dans cette thèse. **La HRMS a été une dimension de séparation qui a permis de largement augmenter la capacité de pics des couplages.** Lors de l'utilisation du FT-ICR, l'augmentation de la résolution en masse via des traitements particuliers des transients et/ou l'augmentation du temps de détection des transients, permet d'augmenter le nombre d'ions détectés lors de l'analyse d'une huile de pyrolyse. De plus, **la précision des mesures des rapports  $m/z$  a permis d'identifier les formules brutes des analytes.** Enfin, **elle a été une source d'information structurale via les expériences de fragmentation.**

Malgré le fort intérêt pour les méthodes multidimensionnelles, **le traitement des données peut s'avérer être une limite.** En effet, peu d'outils permettant une valorisation de l'ensemble des données (spectres MS, MS/MS, temps de rétention, spectres UV et CCS) sont disponibles. **Pour l'analyse structurale, des stratégies de déréplication pourraient permettre une exploitation semi-automatisée des données de fragmentation.** Ce type d'approche permettrait d'identifier dans un premier temps les molécules connues, comme les composés phénoliques présents dans les échantillons issus de la biomasse. En revanche, **afin de découvrir de nouvelles molécules, des approches ciblées (criblage bioguidé et/ou statistique) pourraient permettre d'avancer dans la compréhension des liens entre la composition et la réactivité d'un mélange.** Enfin, l'utilisation de **réseaux moléculaires semble également être une approche pertinente pour classer des molécules inconnues par famille chimique.**



## **Conclusions générales**

---

L'augmentation de la demande en énergie conduit à maximiser la valorisation des ressources fossiles disponibles ainsi qu'à rechercher de nouvelles alternatives vertes pour atteindre un mix énergétique. Le développement de nouveaux procédés de conversion nécessite une connaissance approfondie des produits initiaux ainsi que des intermédiaires formés tout du long du procédé. Au cours de cette thèse qui s'inscrit dans cette thématique, nous avons étudié des échantillons issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique, ainsi que des distillats sous vide qui sont des coupes lourdes pétrolières. **L'objectif de ces travaux était d'apporter des solutions analytiques pertinentes pour la caractérisation exhaustive des mélanges complexes oxygénés dans le cas d'échantillons lignocellulosiques, et pour la quantification des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les coupes lourdes pétrolières.**

Un état de l'art sur l'analyse de ces deux types d'échantillon a montré que le couplage de la chromatographie en phase liquide (LC) ou supercritique (SFC) avec la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) semblait adéquat pour répondre à nos objectifs. Malgré tout, un nombre limité de publications relate de tels couplages pour l'analyse d'échantillons issus de la conversion de la biomasse, et d'autant moins pour les mélanges issus de la voie biochimique. En effet, la majorité des travaux s'est concentrée sur une seule famille de molécules chimiques, principalement les composés phénoliques et les furanes. Concernant la quantification des HAP dans les distillats sous vide, aucune étude publiée n'a proposé de méthode analytique permettant d'y parvenir compte tenu de la complexité de ces échantillons.

La première étape de cette thèse a donc été de mettre en place une **méthodologie destinée à optimiser les couplages entre la LC ou la SFC avec la HRMS**. Une étape cruciale lors d'un couplage avec la spectrométrie de masse est la désolvatation et l'ionisation des molécules. Ainsi, nous avons proposé l'utilisation de **plans d'expériences** afin d'optimiser cette étape. En effet, les paramètres expérimentaux ayant des interactions les uns avec les autres, une approche d'optimisation consistant à faire varier un seul facteur à la fois n'aurait pas permis d'atteindre l'optimum. Quatre plans composites centrés ont été construits afin d'optimiser les conditions d'ionisation des sources electrospray (ESI) et d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) dans les modes positif et négatif. L'utilisation de molécules modèles nous a permis de modéliser les aires des signaux de ces dernières via des modèles quadratiques. Enfin, la maximisation simultanée de toutes les réponses des molécules avec une fonction de réponse a permis de déterminer des conditions d'ionisation optimales.

Les méthodes développées ont par la suite été appliquées pour la caractérisation d'un échantillon issu de la conversion biochimique d'une paille de blé. Des expériences **de fragmentation HRMS<sup>n</sup>** ont également été réalisées afin d'apporter des informations sur la structure des analytes. Dans un premier temps, l'échantillon a été fractionné via une succession d'extractions liquide-liquide (LLE) afin de simplifier le mélange par familles chimiques et ainsi faciliter l'exploitation des données de fragmentation. Des **structures inédites** de molécules ont pu être proposées grâce à l'exploitation simultanée de l'ensemble des informations, incluant la nature de la fraction LLE, le temps de rétention en chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC), le rapport  $m/z$  de l'ion pseudo-moléculaire ainsi que des fragments obtenus. Cependant, le temps nécessaire pour le traitement manuel des spectres de fragmentation ne permet pas l'exploitation de toutes les données. Nous avons donc étudié **l'intérêt d'utiliser des bases de données spectrales expérimentales ou *in silico*** afin de les comparer avec nos spectres expérimentaux. Il est apparu que cette méthode

d'exploitation semblait pertinente pour des molécules connues et souvent référencées dans la littérature, mais cette stratégie reste limitée à l'heure actuelle pour des composés plus atypiques.

Malgré la description des échantillons apportée par le couplage RPLC/HRMS<sup>n</sup>, de nombreuses co-élutions en RPLC nous ont amenés à développer une **méthode chromatographique bidimensionnelle en ligne dédiée à la séparation des sucres** qui sont co-élus en RPLC. La sélection d'une colonne en carbone graphite poreux et d'une colonne à base de silice en première et seconde dimension respectivement a permis d'atteindre **une occupation de l'espace chromatographique de 75%**. De plus, le couplage RPLC×RPLC/HRMS a permis d'obtenir des spectres de masse plus propres et spécifiques, facilitant l'exploitation de ces derniers. Près de 70 pics chromatographiques correspondant à nos sucres d'intérêt ont pu être séparés. Par ailleurs, **l'apport de la spectrométrie à mobilité ionique (IMS)** au sein du couplage **RPLC/IMS/HRMS** a été évalué comme alternative à la RPLC×RPLC/HRMS. Tout d'abord, le couplage RPLC/IMS/HRMS présente plusieurs avantages considérables en comparaison de la RPLC×RPLC/HRMS. En effet, les échelles de temps de chaque dimension sont idéales, ce qui permet un bon échantillonnage entre chaque dimension. De plus, aucun temps d'analyse supplémentaire n'est ajouté par rapport à la RPLC/HRMS. Toutefois, nous avons pu mettre en évidence la difficulté d'interprétation des cartographies représentant la mobilité en fonction du temps de rétention. Cette difficulté est principalement liée à la séparation d'ions et non de molécules ; plusieurs pics sur les mobilogrammes peuvent ainsi appartenir à un seul et même composé (ions pseudo-moléculaires, fragments). De plus, la RPLC×RPLC en amont de la HRMS permet de réduire les potentiels effets de matrice, tandis que la RPLC/IMS/HRMS subit des effets de matrice similaires à la RPLC/HRMS.

Pour aller encore plus loin, l'ensemble de ces dimensions peut être couplé afin de combiner les avantages de la RPLC×RPLC avec la séparation apportée par la mobilité ionique. Lors de la mise en œuvre d'un tel couplage **RPLC×RPLC/IMS/HRMS**, **les dimensions RPLC×RPLC** ont permis de séparer nos sucres d'intérêt, ce qui a facilité l'interprétation des mobilogrammes. De plus, l'IMS a permis d'améliorer la séparation de certains composés encore co-élus en RPLC×RPLC. Chaque composé est alors défini par deux temps de rétention, une valeur de mobilité ionique qui peut être convertie en section efficace de collision (CCS) et un rapport  $m/z$  qui permet de remonter à la formule moléculaire. **Ce couplage hautement spécifique** semble donc prometteur, mais le traitement et l'exploitation des données demeurent une limite à ce jour.

Concernant **la quantification des HAP dans les distillats sous vide**, une **méthode tridimensionnelle** a été proposée. Cette dernière consiste au **couplage hors-ligne de la chromatographie de partage centrifuge (CPC) à la SFC/HRMS**. L'utilisation de deux dimensions chromatographiques s'est avérée impérative afin de **limiter les effets de matrice** au sein de la source à photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). De plus, **des cartographies organisées** représentant les temps de rétention en CPC et en SFC ont pu être construites. En effet, le mécanisme principal régissant la séparation en CPC est basé sur le nombre d'alkylations, tandis que la SFC permet de séparer les HAP principalement par leur nombre d'insaturations. Les composés azotés ont également été séparés du reste de l'échantillon grâce à leur élution au début de l'analyse CPC. Les composés soufrés encore co-élus avec les HAP ont pu être différenciés grâce à la HRMS. L'application de la méthode CPC×SFC/HRMS à plusieurs distillats sous vide, ainsi qu'à plusieurs échantillons issus d'une unité d'hydrocraquage a mis en avant l'apport d'une telle méthode.

Le dernier chapitre de cette thèse a eu pour objectif de mettre en évidence les **avantages et inconvénients de l'ensemble des couplages réalisés**. Les chromatographies bidimensionnelles hors-ligne et en ligne ont ainsi été comparées. Les différences entre les deux spectromètres de masse utilisés lors de ces travaux, un LTQ/FT-ICR et un timsTOF, ont également été discutées tant au niveau de la résolution que des spectres de fragmentation produits par les deux analyseurs. La **capacité de pics de toutes les méthodes développées a été estimée** dans le but de positionner les couplages en perspective du besoin analytique (quantification, analyse exhaustive). Enfin, tout du long des différents développements et applications des méthodes analytiques, **le traitement et l'exploitation des données ont été un travail à part entière**. Des perspectives sont présentées, comme le passage d'une analyse non-ciblée à une analyse ciblée via un traitement statistique ou alors un criblage bioguidé. Enfin, une dernière perspective en lien avec les données de fragmentation est l'utilisation de réseaux moléculaires afin de visualiser et de regrouper les molécules appartenant à une même famille chimique.

# Perspectives

---

Les perspectives de ces travaux sont séparées en deux parties en fonction du type d'échantillon.

Concernant **les mélanges issus de la conversion de la biomasse lignocellulosique**, un certain nombre de perspectives ont été évoquées dans ce manuscrit. **Ces perspectives sont différentes en fonction du besoin analytique**. Dans le cas de la transformation biochimique de la biomasse afin de produire de l'éthanol ou d'autres produits par hydrolyse enzymatique puis fermentation, **le besoin principal est d'identifier les inhibiteurs** de ces réactions dans l'objectif d'améliorer le rendement de conversion de la biomasse. Ainsi, l'ensemble de l'échantillon n'a pas forcément besoin d'être caractérisé : il faut **cibler les molécules d'intérêt**. Pour cela, la première solution serait d'utiliser **un criblage bioguidé** en fractionnant l'échantillon de départ puis en soumettant les fractions à des mesures de réactivité (à l'hydrolyse ou à la fermentation). De cette manière, certaines fractions seront identifiées comme étant inhibitrices et pourront donc être soit refractionnées soit analysées via la ou les techniques analytiques adaptées. Une seconde façon de cibler certaines molécules serait d'analyser un panel d'échantillons ayant des réactivités différentes par RPLC/HRMS dans un premier temps. Ensuite, les données acquises pourraient être soumises à **des traitements statistiques** afin de faire ressortir les variables expliquant les différences de réactivité. Les molécules ciblées pourraient alors être identifiées par RPLC/IMS/MS/HRMS ainsi que par d'autres techniques complémentaires comme la spectroscopie RMN. Les résultats du criblage bioguidé et du traitement statistique pourraient être comparés afin de s'assurer de la cohérence des conclusions réalisées.

Dans le cas où **l'ensemble de l'échantillon a un intérêt**, comme pour la recherche de molécules plateformes biosourcées, **des stratégies de déréplication** pourraient être mises en œuvre. L'objectif de la déréplication est **d'identifier rapidement des molécules connues**. Avec des données RPLC/HRMS<sup>n</sup>, une déréplication via la comparaison des spectres MS/MS à des bases de données spectrales expérimentales ou *in silico* pourrait être employée. Toutefois, cette méthodologie reste consommatrice en temps, notamment lorsqu'il faut trier les structures proposées. L'utilisation simultanée des spectres de fragmentation, des valeurs de section efficace de collision déterminées à partir de la mobilité ionique, des spectres UV et du temps de rétention pourrait améliorer le classement des structures proposées. Une seconde perspective abordée dans le Chapitre 7 serait la **construction de réseaux moléculaires** qui permettrait d'abord de classer les analytes par famille chimique, puis d'identifier les familles grâce à quelques molécules connues.

Concernant **l'analyse des coupes lourdes pétrolières**, le couplage CPC×SFC/HRMS a permis de quantifier les hydrocarbures polycycliques aromatiques. Ce même couplage pourrait également être utilisé pour **quantifier les composés soufrés**. En effet, ces derniers ont également été séparés selon le nombre d'alkylations en CPC et leur nombre d'insaturations en SFC, on peut donc faire l'hypothèse que la HRMS pourrait permettre de quantifier cette classe de molécules. Les **composés azotés**, souvent étudiés à cause de leurs effets néfastes sur les catalyseurs d'hydrotraitement, ont également été **séparés du reste de l'échantillon**. L'isolement de cette classe de molécules pourrait permettre leur analyse via une technique séparative adaptée. Enfin, **l'ajout de la mobilité ionique** en tant que dimension séparative au couplage développé, pourrait permettre d'apporter des informations complémentaires sur l'isomérisation des chaînes alkyles, en distinguant les isomères de position notamment.

Plus globalement, il est nécessaire de **développer des outils de visualisation et de traitement des données multidimensionnelles**. De plus, l'automatisation d'une partie du traitement est nécessaire afin de rendre **les couplages plus accessibles** mais avant tout **utilisables en routine**. Cette

automatisation de l'exploitation des données pourrait se faire via des concepts d'intelligence artificielle comme l'apprentissage autonome, appelé Machine Learning.



# Annexes

---

1.	ANNEXES CHAPITRE 3 .....	- 240 -
2.	ANNEXES CHAPITRE 4 .....	- 241 -
3.	ANNEXES CHAPITRE 5 .....	- 245 -
4.	ANNEXES CHAPITRE 6 .....	- 247 -

## 1. Annexes Chapitre 3

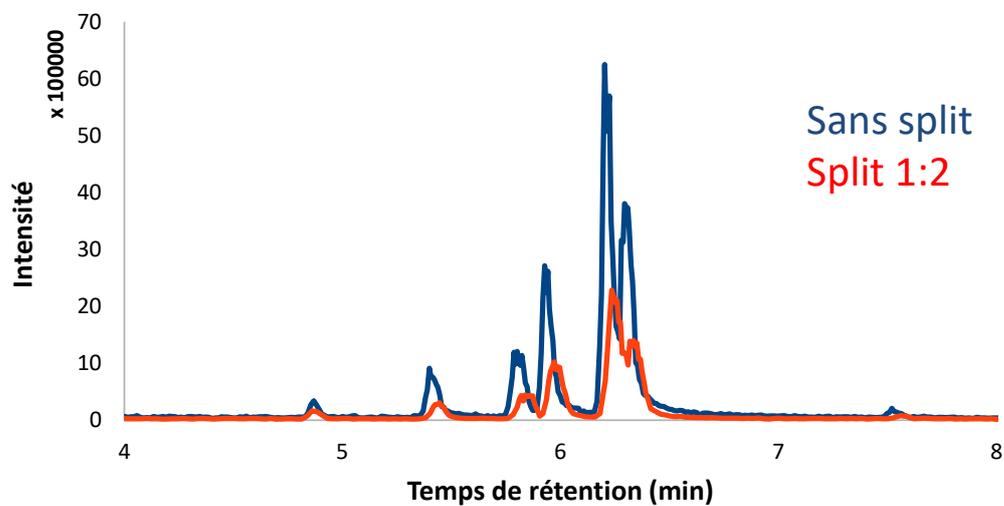


Figure S1 : Chromatogrammes BPC obtenus en APCI négatif sans split en amont de la source (en bleu) et avec un ratio de split de 0,5 (en rouge)

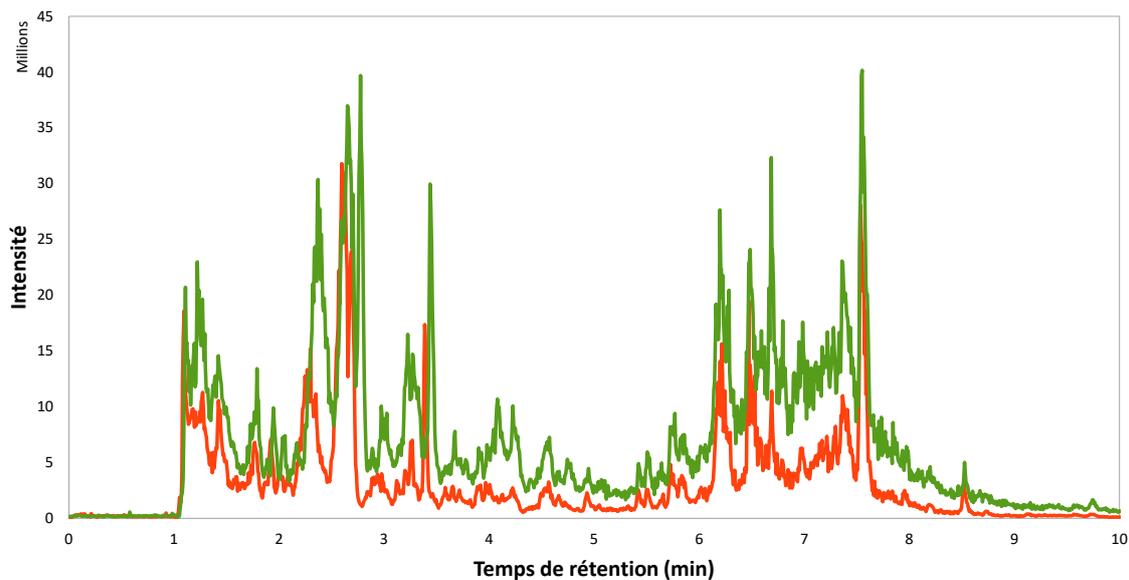


Figure S2 : Chromatogrammes BPC obtenus en APCI négatif d'un échantillon issu du prétraitement d'une biomasse sans hydroxyde d'ammonium (vert), et avec 50 mM d'hydroxyde d'ammonium ajouté post-colonne (rouge).

## 2. Annexes Chapitre 4

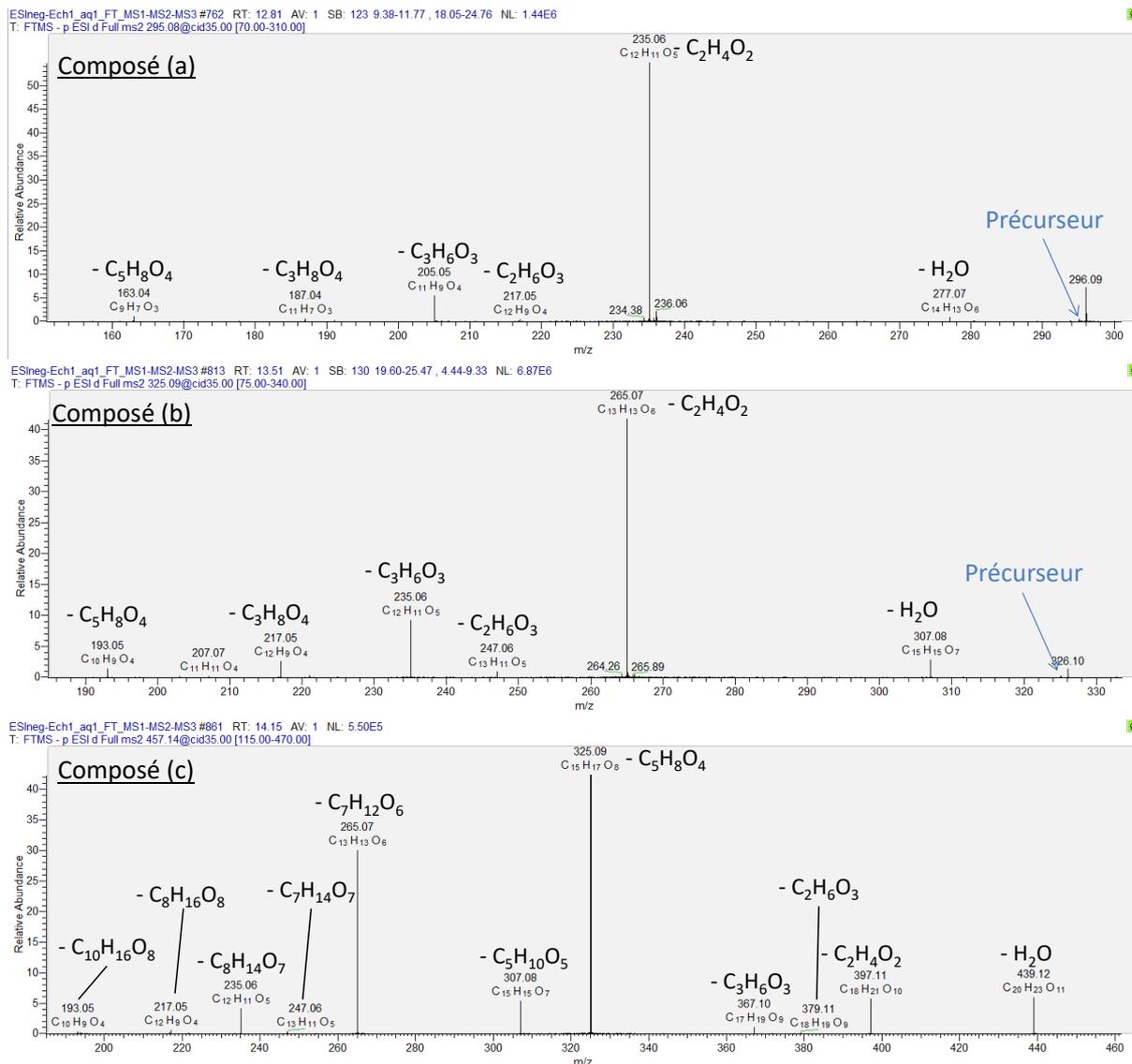


Figure S3 : Spectres de masse MS<sup>2</sup> des composés a, b et c présents dans la fraction AQ1

**Tableau S1 : Fragments obtenus en ESI négatif pour les composés les plus intenses dans AQ3**

m/z	t <sub>R</sub> (min)	Formule brute de l'ion	Pertes MS <sup>2</sup>	Pertes MS <sup>3</sup>	Pertes MS <sup>4</sup>	Pertes MS <sup>5</sup>	Pertes MS <sup>6</sup>	Pertes MS <sup>7</sup>	Proposition d'identification
197,0456	12,1	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%) -CO <sub>2</sub> (50%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)					Acide syringique (DBE 5)
163,0400	13,2	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%)						Acide coumarique (DBE 6)
193,0502	14,2	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%) -CO <sub>2</sub> (75%) -(*CH <sub>3</sub> +CO <sub>2</sub> ) (5%)	-CO <sub>2</sub> (100%)					Acide férulique (DBE 6)
187,0974	17,0	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	-H <sub>2</sub> O (100%) -(H <sub>2</sub> O+CO <sub>2</sub> ) (30%)						Acide aliphatiques (DBE 2)
327,0873	13,0	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -(2×CO <sub>2</sub> ) (30%)	-CO <sub>2</sub> (100%)					Composés di-aromatiques (DBE entre 10 et 12)
389,1242	13,2	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	-H <sub>2</sub> O (100%) -(CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O) (10%) -C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (5%) -CO <sub>2</sub> (5%) -(CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O+CH <sub>2</sub> O) (5%)	-CO <sub>2</sub> (100%) -(CO <sub>2</sub> +CH <sub>2</sub> O) (5%)	-CH <sub>2</sub> O (100%) -•CH <sub>3</sub> (40%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)		
357,0978	13,5	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -2×CO <sub>2</sub> (15%) -(2×CO <sub>2</sub> +CH <sub>3</sub> )(10%)	-(CO <sub>2</sub> +•CH <sub>3</sub> ) (100%) -CO <sub>2</sub> (30%)					
387,1083	13,8	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -(2×CO <sub>2</sub> +•CH <sub>3</sub> ) (5%) -(2×CO <sub>2</sub> ) (5%)	-•CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> (100%) -CO <sub>2</sub> (25%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)				
371,1133	14,4	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub>	-H <sub>2</sub> O (100%) -CO <sub>2</sub> (40%) -CH <sub>2</sub> O (25%) -(H <sub>2</sub> O+CO <sub>2</sub> ) (5%)	-CO <sub>2</sub> (100%) -CH <sub>2</sub> O (30%) -(CO <sub>2</sub> +•CH <sub>3</sub> ) (20%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%) -CO (20%)	-•CH <sub>3</sub> (100%) -CO (10%)	-CO (100%)	
401,124	17,7	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	-H <sub>2</sub> O (100%) -CH <sub>2</sub> O (30%) -CO <sub>2</sub> (20%) -C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (5%) -C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> (5%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)				
353,103	17,8	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO <sub>2</sub> (100%)	-CO (100%)			
537,1395	15,8	C <sub>28</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -2×CO <sub>2</sub> (30%) -C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> (5%)	-CO <sub>2</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)		Composés tri-aromatiques (DBE=16)
477,1192	18,5	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (10%) -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> (10%)	-•CH <sub>3</sub> (100%) -CH <sub>2</sub> O (10%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)				
523,1248	18,8	C <sub>27</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	-2×CO <sub>2</sub> (100%) -CO <sub>2</sub> (95%)	-•CH <sub>3</sub> (100%) -C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (60%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)				
731,1973	21,5	C <sub>38</sub> H <sub>35</sub> O <sub>15</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> (45%)						Composés Tétra-aromatiques (DBE entre 21 et 22)
699,2073	22,2	C <sub>38</sub> H <sub>35</sub> O <sub>13</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%)						
741,2182	22,4	C <sub>40</sub> H <sub>37</sub> O <sub>14</sub>	-CO <sub>2</sub> (100%) -2×CO <sub>2</sub> (20%) -C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> (15%)	-CO <sub>2</sub> (100%) -C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> (15%)					

Tableau S2 : Fragments obtenus en ESI négatif pour les composés les plus intenses dans ORG3

m/z	t <sub>R</sub> (min)	Formule brute de l'ion	Pertes MS <sup>2</sup>	Pertes MS <sup>3</sup>	Pertes MS <sup>4</sup>	Pertes MS <sup>5</sup>	Pertes MS <sup>6</sup>	Proposition d'identification
121,0293	10,1	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	-CO (100%)					Hydroxybenzaldéhyde (DBE 5)
151,0400	11,8	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO <sub>2</sub> (100%)				Vanilline (DBE 5)
181,0505	12,8	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (100%)			Syringaldéhyde (DBE 5)
195,0661	13,8	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (100%)	-CO (100%)		Acétosyringone (DBE 5)
177,0556	14,5	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%) -(•CH <sub>3</sub> +CO) (60%)	-CO (100%)				Coniféraldéhyde (DBE 6)
207,0661	14,8	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (100%)	-CO (100%)		Sinapaldéhyde (DBE 5)
273,0765	12,6	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	-(CO+H <sub>2</sub> O) (100%) -H <sub>2</sub> O (60%) -(•CH <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O) (30%) -CO (25%) -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (20%) -C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (20%)	-•CH <sub>3</sub> (100%) -CO (20%)				Composés di-aromatiques (DBE ente 8 et 12)
303,0871	13,2	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	-(CO+H <sub>2</sub> O) (100%) -H <sub>2</sub> O (95%) -(•CH <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O) (60%) -•CH <sub>3</sub> (50%) -CO (30%) -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (10%) -C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (5%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (20%)		
333,0975	13,4	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	-(CO+H <sub>2</sub> O) (100%) -H <sub>2</sub> O (95%) -•CH <sub>3</sub> (65%) -CO (20%) -(•CH <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O) (20%) -C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> (10%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (20%)	
273,0765	17,3	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (100%)	-CO (100%)		
271,061	17,5	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	-(CO+CO <sub>2</sub> ) (100%) -CO (40%)	-H <sub>2</sub> O (100%) -CO <sub>2</sub> (50%)				
301,0716	17,7	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	-(CO+CO <sub>2</sub> +CH <sub>3</sub> ) (100%) -•CH <sub>3</sub> (80%) -(CO+C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O) (45%) -(CO+CO <sub>2</sub> ) (30%) -CO (20%)	-CHO (100%) -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (30%) -HO (20%)				
299,0923	20,8	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (100%) -H <sub>2</sub> O (15%)	-CO (100%) -CO <sub>2</sub> (25%)		
329,0664	21,1	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-CO (100%) -(CO+CO <sub>2</sub> ) (25%)	-CO <sub>2</sub> (100%)	-CO <sub>2</sub> (100%) -CO (70%)	
509,1454	18,6	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>	-H <sub>2</sub> O (100%) -C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (40%) -(C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> +CH <sub>2</sub> O) (20%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)			Composés tri-aromatiques (DBE ente 12 et 18)
507,1299	21,9	C <sub>27</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	-•CH <sub>3</sub> (100%) -C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (85%) -(2×•CH <sub>3</sub> +CO) (45%) -(•CH <sub>3</sub> +C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) (40%) -C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> (20%)	-(CO+•CH <sub>3</sub> ) (100%) -•CH <sub>3</sub> (80%)				
657,1983	21,4	C <sub>36</sub> H <sub>33</sub> O <sub>12</sub>	-C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (100%) -C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (35%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%) -(•CH <sub>3</sub> +CO) (30%)		Composés tétra-aromatiques (DBE ente 18 et 24)
683,2144	22,0	C <sub>38</sub> H <sub>35</sub> O <sub>12</sub>	-C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (100%) -C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> (90%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)	-•CH <sub>3</sub> (100%)		

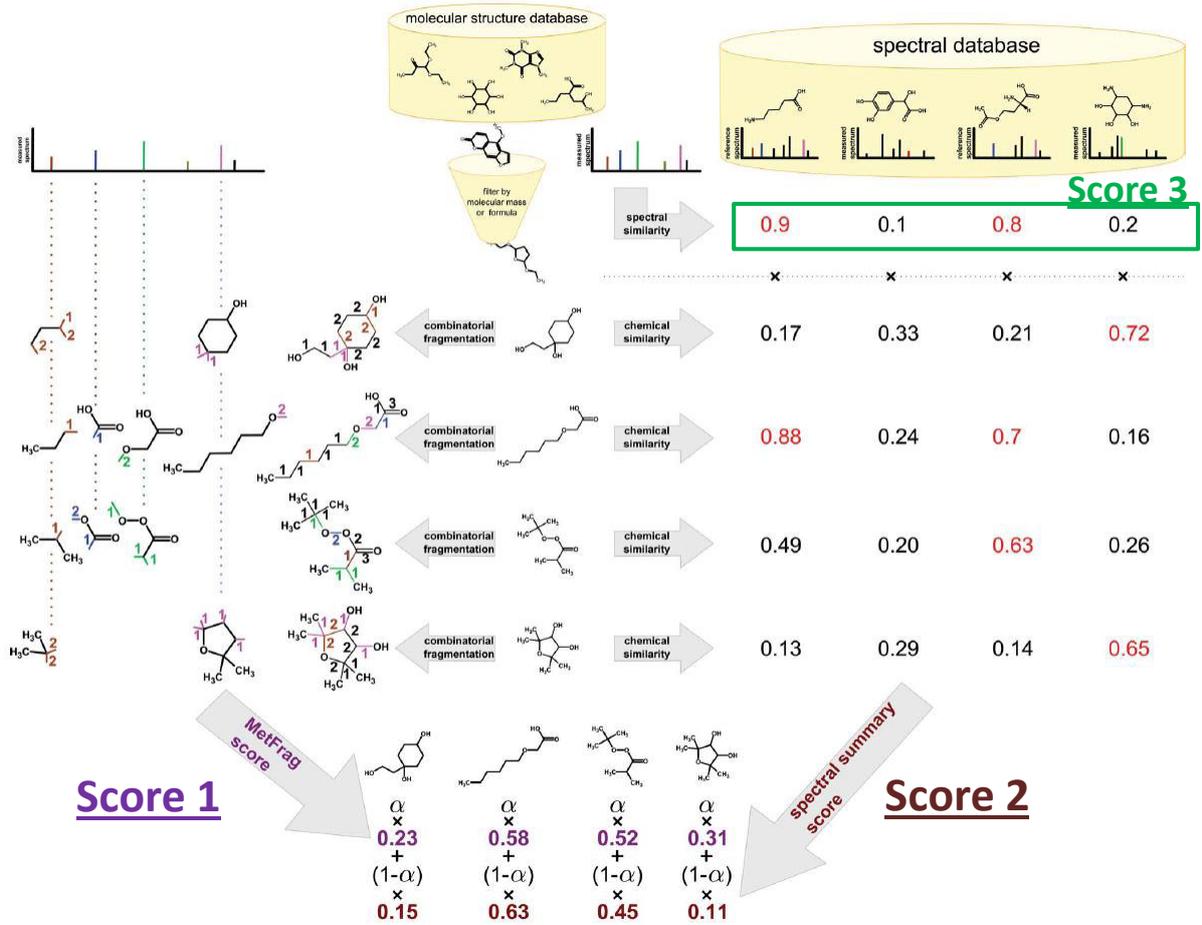


Figure S4 : Méthodologie de scoring de MetFrag (version beta) [207]

### 3. Annexes Chapitre 5

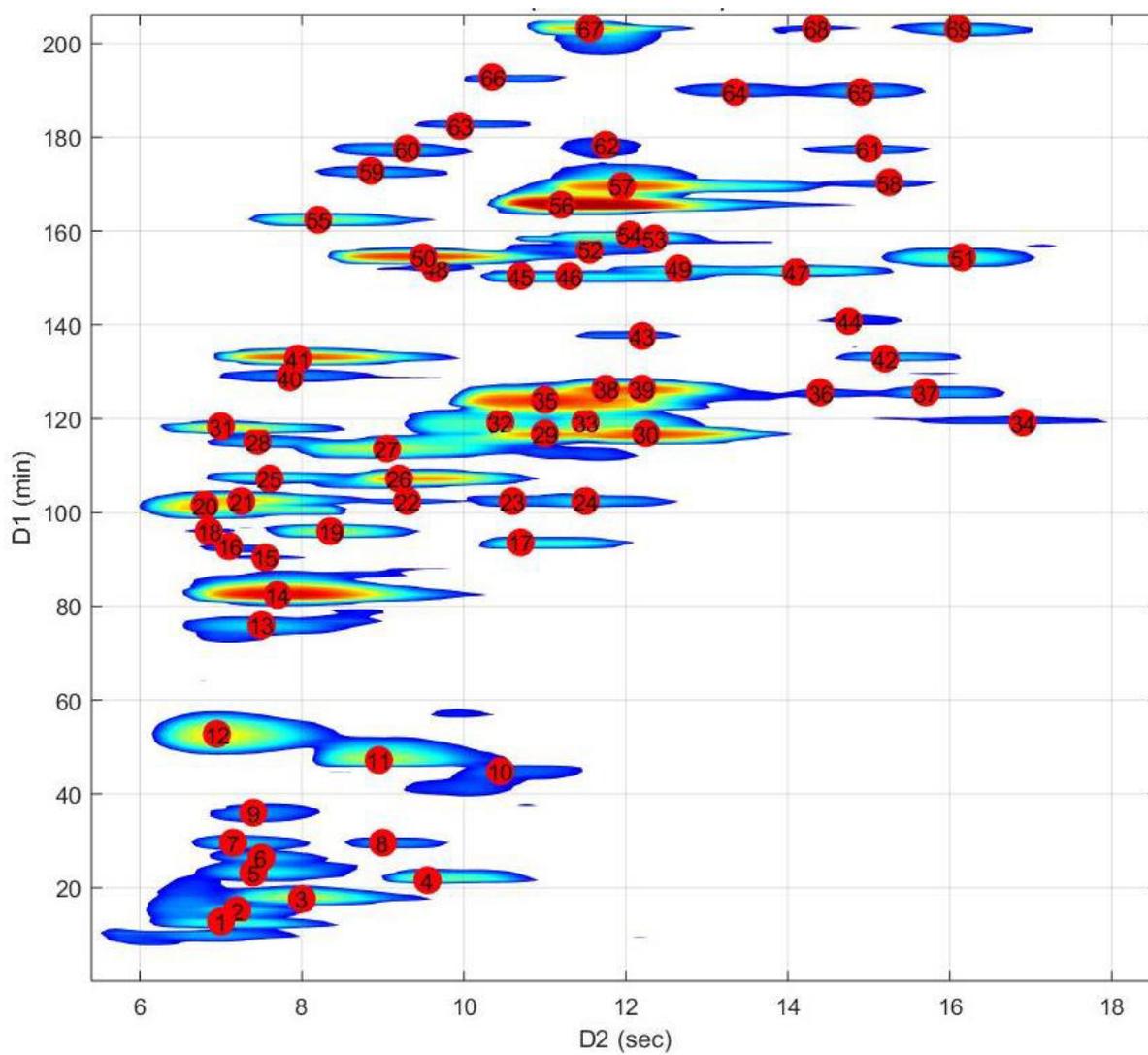


Figure S5 : Numérotation des pics chromatographiques dans la fenêtre d'élution d'intérêt

Tableau S3 : Temps de rétention des pics labellisés et identification de l'ion majoritaire sous chaque pic

ID	D1 (min)	D2 (sec)	m/z	Formule de l'ion	DBE
1	12,8	7	179,0562	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	1
2	15,2	7,2	195,0511	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	1
3	17,6	8	133,0142	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	2
4	21,6	9,55	128,0375	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> N	3
5	23,2	7,4	339,0936	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	3
6	26,4	7,5	207,5111	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	2
8	29,6	9	207,5112	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	2
7	29,6	7,15	267,0720	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub>	2
9	36	7,4	383,0834	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	4
10	44,8	10,45	381,1042	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	4
11	47,2	8,95	191,0199	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	3
12	52,8	6,95	325,0783	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	3
13	76	7,5	281,0882	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	2
14	82,4	7,7	339,0934	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	3
15	90,4	7,55	307,0675	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub>	4
16	92,8	7,1	341,1091	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2
17	93,6	10,7	321,0831	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	4
19	96	8,35	307,0674	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub>	4
18	96	6,85	317,0881	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	5
20	101,6	6,8	355,0880	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	3
21	102,4	7,25	341,1091	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2
22	102,4	9,3	341,1091	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2
23	102,4	10,6	367,0882	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	4
24	102,4	11,5	367,0885	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	4
26	107,2	9,2	321,0830	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	4
25	107,2	7,6	341,1091	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2
27	113,6	9,05	367,0884	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	4
28	115,2	7,45	355,0875	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	3
29	116,8	11	323,0987	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	3
30	116,8	12,25	381,1040	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	4
31	118,4	7	457,1205	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> O <sub>15</sub>	4
34	119,2	16,9	253,0719	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	6
33	119,2	11,5	369,1040	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	3
32	119,2	10,45	369,1042	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	3
35	124	11	381,1041	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	4
37	125,6	15,7	205,1129		
36	125,6	14,4	205,1130		
38	126,4	11,75	381,1041	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	4
39	126,4	12,2	381,1042	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	4
40	128,8	7,85	459,1350	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> O <sub>15</sub>	3
42	132,8	15,2	363,0935	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	5
41	132,8	7,95	471,1489	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> O <sub>15</sub>	4
43	137,6	12,2	349,0780	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	5
44	140,8	14,75	411,1145	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> O <sub>20</sub>	4
45	150,4	10,7	499,1304	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	5
46	150,4	11,3	499,1302	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	5
47	151,2	14,1	363,0936	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	5
49	152	12,65	363,0938	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	5
48	152	9,65	457,1201	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> O <sub>15</sub>	4
51	154,4	16,15	411,1146	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> O <sub>20</sub>	4
50	154,4	9,5	499,1304	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub>	5
52	156	11,55	501,1463	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	4
53	158,4	12,35	501,1463	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	4
54	159,2	12,05	501,1463	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	4
55	162,4	8,2	549,1675	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>18</sub>	3
56	165,6	11,2	513,1455	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	5
57	169,6	11,95	513,1458	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	5
58	170,4	15,25	411,1147	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> O <sub>20</sub>	4
59	172,8	8,85	503,1617	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	3
60	177,6	9,3	503,1620	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	3
61	177,6	15	555,1570	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	6
62	178,4	11,75	513,1459	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	5
63	182,4	9,95	503,1619	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	3
65	189,6	14,9	543,1569	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	5
64	189,6	13,35	543,1567	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	5
66	192,8	10,35	631,1730	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> O <sub>20</sub>	6
68	203,2	14,35	543,1568	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	5
69	203,2	16,1	543,1568	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>	5
67	203,2	11,55	645,1883	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> O <sub>20</sub>	6

## 4. Annexes Chapitre 6

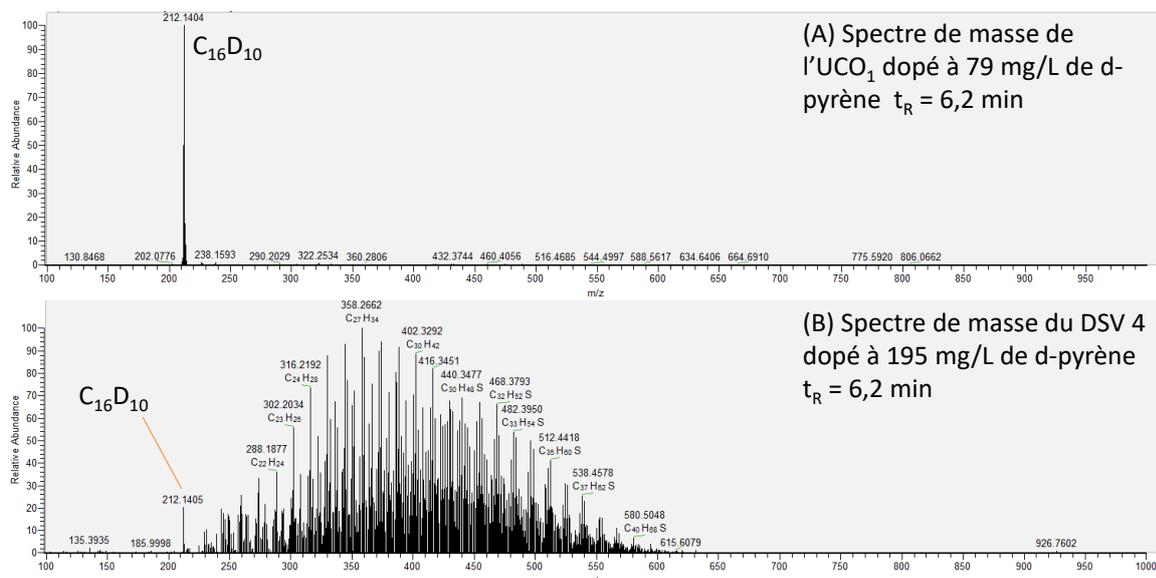


Figure S6 : Spectres de masse obtenus par analyse SFC/HRMS (A) de l'UCO<sub>1</sub> et (B) du DSV 4 dopés avec du d-pyrène

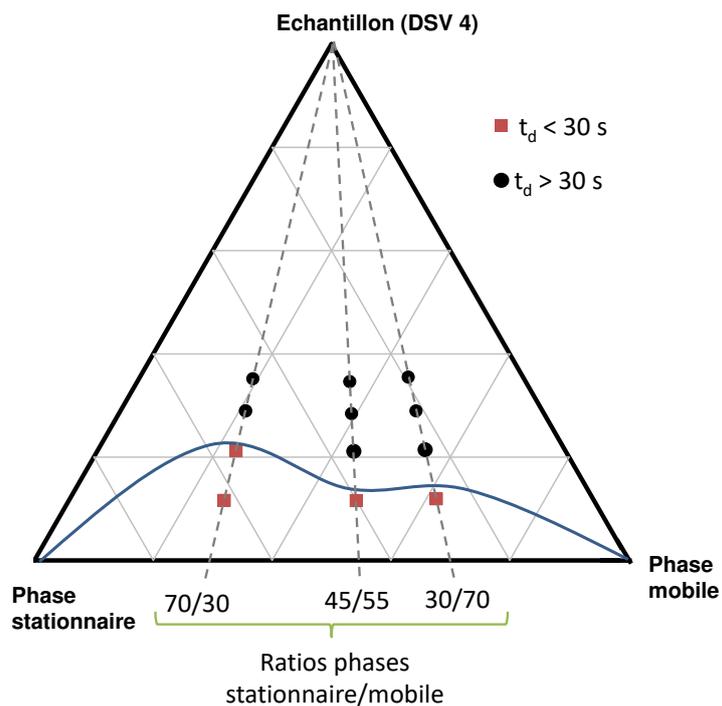


Figure S7 : Diagramme ternaire représentant les ratios massiques du DSV 4, de la phase stationnaire et de la phase mobile pour le système solvant HEPT/ACN/DMSO 45/45/10 (v/v/v).

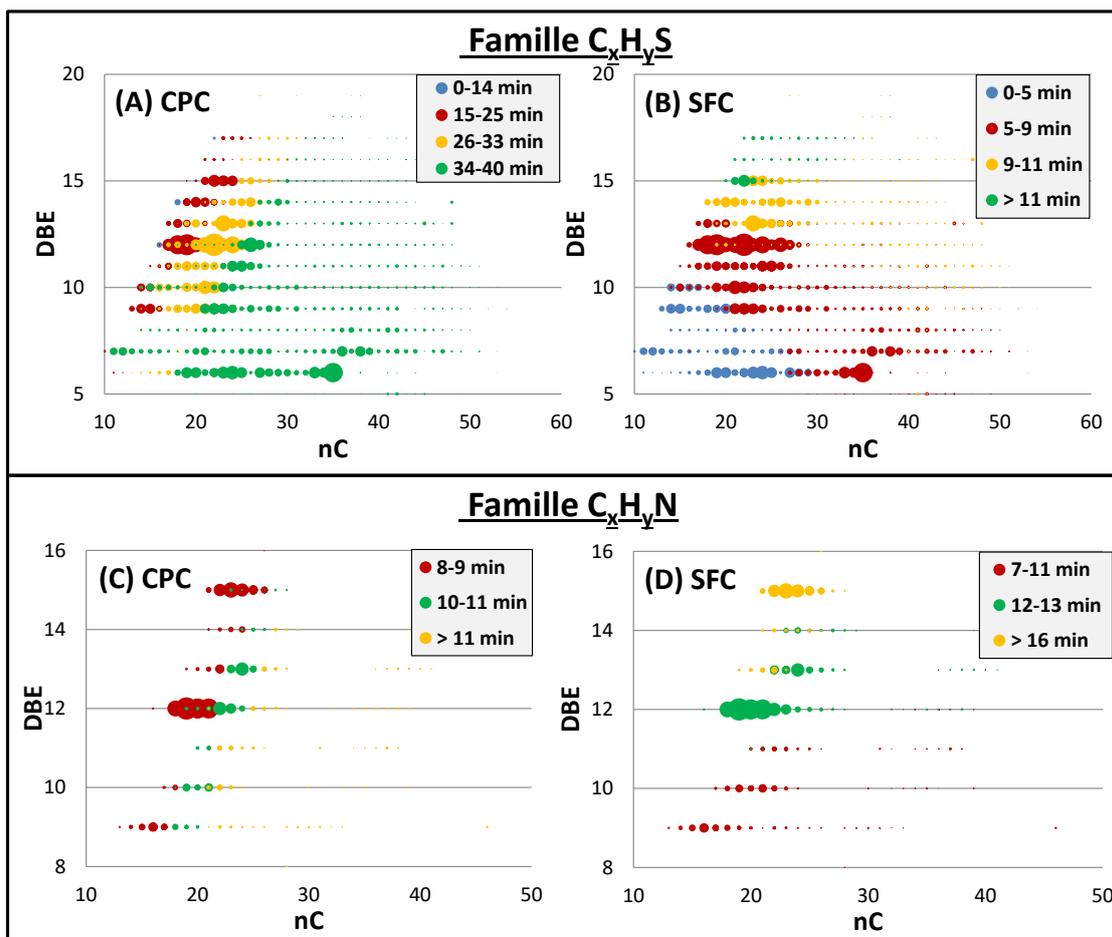


Figure S8 : DBE en fonction du nombre d'atomes de carbone pour les composés de type  $C_xH_yS$  et  $C_xH_yN$  détectés dans le DSV 4. Les échelles de couleur représentent les temps de rétention en (A,C) CPC et (B,D) SFC ; la taille des points correspond à l'aire des ions extraits en APPI(+).

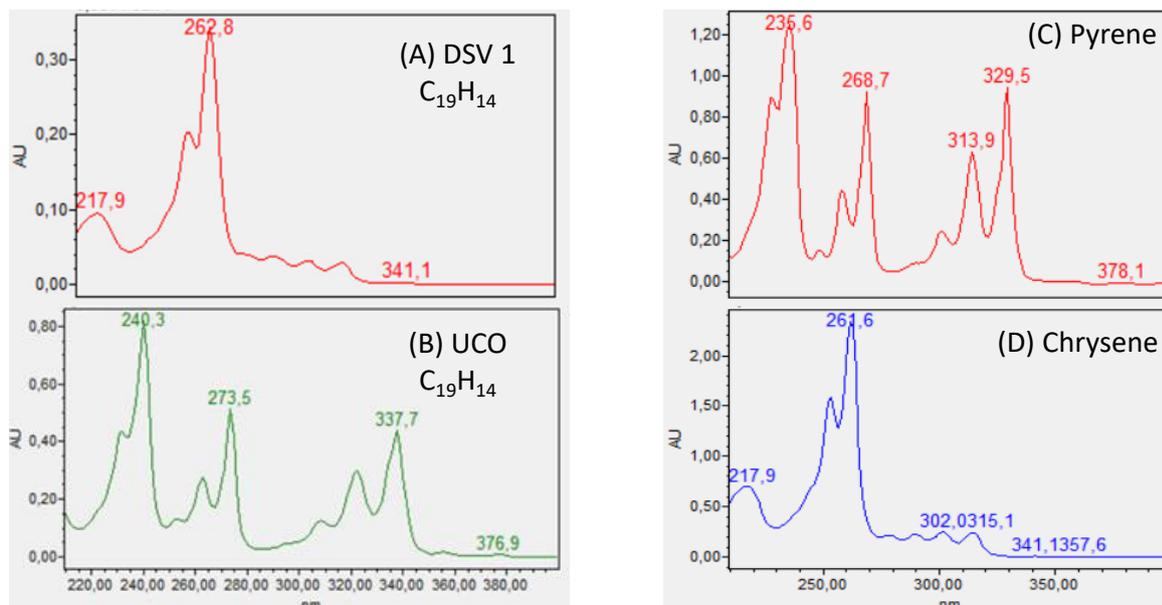


Figure S9 : Spectres UV des composés avec un DBE de 13 détectés dans (A) le DSV 4 et (B) l'UCO<sub>1</sub>, comparés aux étalons du (C) pyrène et (D) chrysène.

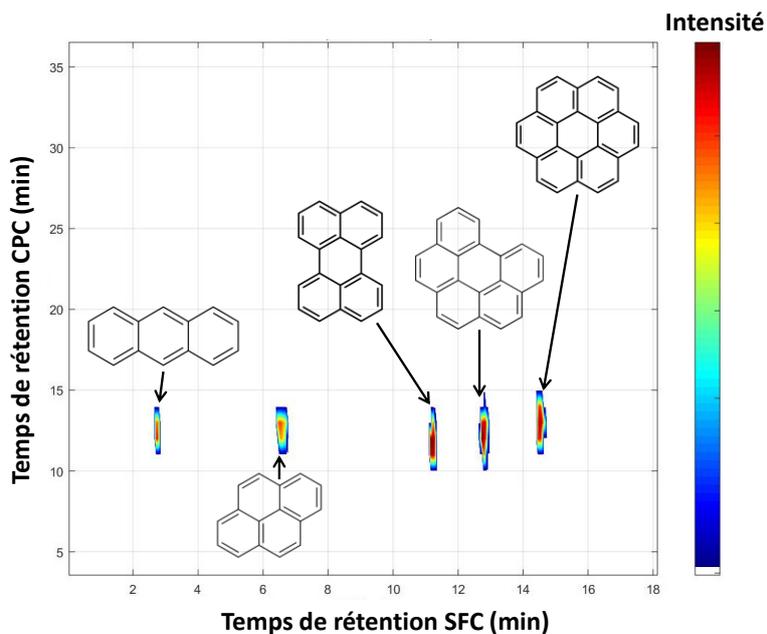


Figure S10 : Cartographie 2D d'un mélange d'étalons à 50 mg/L.

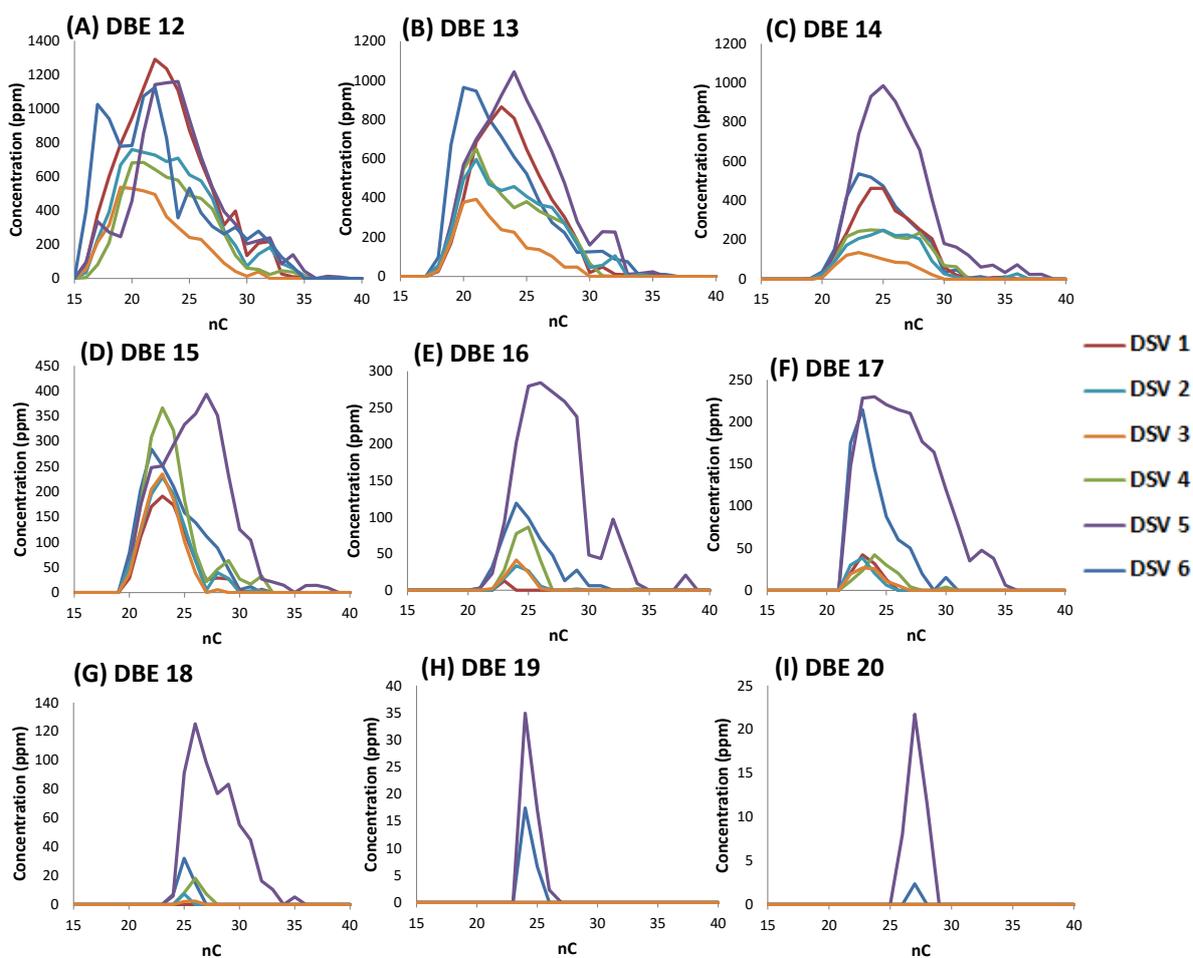


Figure S11 : Concentration des HAP dans les six DSV en fonction du nombre d'atomes de carbone pour les DBE de 12 à 20

## 5. Références

- [1] N. Abas, A. Kalair, N. Khan, Review of fossil fuels and future energy technologies, *Futures* 69 (2015) 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2015.03.003>.
- [2] J. Mohtasham, Review Article-Renewable Energies, *Energy Procedia* 74 (2015) 1289–1297. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.07.774>.
- [3] I. Dincer, C. Acar, A review on clean energy solutions for better sustainability, *Int. J. Energy Res.* 39 (2015) 585–606. <https://doi.org/10.1002/er.3329>.
- [4] V. Grammont, *Les biocarburants à partir de ressources lignocellulosiques: Présentation des filières et identification des risques*, 2006.
- [5] F.H. Isikgor, C.R. Becer, Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers, *Polym. Chem.* 6 (2015) 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>.
- [6] A.V. Bridgwater, Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading, *Biomass and Bioenergy* 38 (2012) 68–94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.048>.
- [7] P. Gallezot, Conversion of biomass to selected chemical products, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 1538–1558. <https://doi.org/10.1039/c1cs15147a>.
- [8] D. Meier, B. van de Beld, A.V. Bridgwater, D.C. Elliott, A. Oasmaa, F. Preto, State-of-the-art of fast pyrolysis in IEA bioenergy member countries, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 20 (2013) 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.061>.
- [9] A. Demirbas, A. Bafail, A.-S. Nizami, Heavy oil upgrading: Unlocking the future fuel supply, *Petroleum Science and Technology* 34 (2016) 303–308. <https://doi.org/10.1080/10916466.2015.1136949>.
- [10] C.S. Hsu, P.R. Robinson, *Practical Advances in Petroleum Processing: Volume 1*, Springer, New York, 2009.
- [11] N.A. Alawani, H. Muller, S.K. Panda, A.A. Al-Hajji, O.R. Koseoglu, Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Hydrocracking Recycle Streams, *Energy Fuels* 34 (2019) 179–187. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b03382>.
- [12] P. Bajpai (Ed.), *Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production*, Springer Berlin Heidelberg, New York NY, 2016.
- [13] P. Harmsen, W. Huijgen, L. Bermudez Lopez, R. Bakker, *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*, 2010.
- [14] B. Du, L.N. Sharma, C. Becker, S.-F. Chen, R.A. Mowery, G.P. van Walsum, C.K. Chambliss, Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 430–440. <https://doi.org/10.1002/bit.22829>.
- [15] T. Sfetsas, C. Michailof, A. Lappas, Q. Li, B. Kneale, Qualitative and quantitative analysis of pyrolysis oil by gas chromatography with flame ionization detection and comprehensive two-

- dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3317–3325. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.034>.
- [16] J.H. Marsman, J. Wildschut, F. Mahfud, H.J. Heeres, Identification of components in fast pyrolysis oil and upgraded products by comprehensive two-dimensional gas chromatography and flame ionisation detection, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.047>.
- [17] C. Luo, D.L. Brink, H.W. Blanch, Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol, *Biomass and Bioenergy* 22 (2002) 125–138. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(01\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(01)00061-7).
- [18] Y. Liu, Q. Shi, Y. Zhang, Y. He, K.H. Chung, S. Zhao, C. Xu, Characterization of Red Pine Pyrolysis Bio-oil by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (2012) 4532–4539. <https://doi.org/10.1021/ef300501t>.
- [19] H.B. Klinke, B.K. Ahring, A.S. Schmidt, A.B. Thomsen, Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw, *Bioresour. Technol.* 82 (2002) 15–26. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00152-3).
- [20] B. Omais, J. Crepier, N. Charon, M. Courtiade, A. Quignard, D. Thiébaud, Oxygen speciation in upgraded fast pyrolysis bio-oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Analyst* 138 (2013) 2258–2268. <https://doi.org/10.1039/c2an35597c>.
- [21] M. Staš, D. Kubička, J. Chudoba, M. Pospíšil, Overview of Analytical Methods Used for Chemical Characterization of Pyrolysis Bio-oil, *Energy Fuels* 28 (2013) 385–402. <https://doi.org/10.1021/ef402047y>.
- [22] M. Staš, J. Chudoba, M. Auersvald, D. Kubička, S. Conrad, T. Schulzke, M. Pospíšil, Application of orbitrap mass spectrometry for analysis of model bio-oil compounds and fast pyrolysis bio-oils from different biomass sources, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 124 (2017) 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.02.002>.
- [23] M. Staš, J. Chudoba, D. Kubička, M. Pospíšil, Chemical Characterization of Pyrolysis Bio-oil: Application of Orbitrap Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 29 (2015) 3233–3240. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b00407>.
- [24] I. Miettinen, M. Mäkinen, T. Vilppo, J. Jänis, Compositional Characterization of Phase-Separated Pine Wood Slow Pyrolysis Oil by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 29 (2015) 1758–1765. <https://doi.org/10.1021/ef5025966>.
- [25] J. Hertzog, V. Carré, Y. Le Brech, C.L. Mackay, A. Dufour, O. Mašek, F. Aubriet, Combination of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization and laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotronic resonance mass spectrometry for the investigation of complex mixtures - Application to the petroleomic analysis of bio-oils, *Anal. Chim. Acta* 969 (2017) 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.022>.
- [26] J. Hertzog, V. Carré, Y. Le Brech, A. Dufour, F. Aubriet, Toward Controlled Ionization Conditions for ESI-FT-ICR-MS Analysis of Bio-Oils from Lignocellulosic Material, *Energy Fuels* 30 (2016) 5729–5739. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b00655>.

- [27] N. Charon, J. Ponthus, D. Espinat, F. Broust, G. Volle, J. Valette, D. Meier, Multi-technique characterization of fast pyrolysis oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 116 (2015) 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.10.012>.
- [28] K.S. Boes, R.H. Narron, S. Park, N.R. Vinueza, Mass Spectrometry Exposes Undocumented Lignin-Carbohydrate Complexes in Biorefinery Pretreatment Stream, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 6 (2018) 10654–10659. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01986>.
- [29] S.-F. Chen, R.A. Mowery, V.A. Castleberry, G.P. van Walsum, C.K. Chambliss, High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.136>.
- [30] A. Le Masle, D. Angot, C. Gouin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *J. Chromatogr. A* 1340 (2014) 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.020>.
- [31] J. Crepier, A. Le Masle, N. Charon, F. Albrieux, S. Heinisch, Development of a supercritical fluid chromatography method with ultraviolet and mass spectrometry detection for the characterization of biomass fast pyrolysis bio oils, *J. Chromatogr. A* 1510 (2017) 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.003>.
- [32] J. Crepier, A. Le Masle, N. Charon, F. Albrieux, P. Duchene, S. Heinisch, Ultra-high performance supercritical fluid chromatography hyphenated to atmospheric pressure chemical ionization high resolution mass spectrometry for the characterization of fast pyrolysis bio-oils, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1086 (2018) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.005>.
- [33] S.P.S. Chundawat, R. Vismeh, L.N. Sharma, J.F. Humpula, L. da Costa Sousa, C.K. Chambliss, A.D. Jones, V. Balan, B.E. Dale, Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 8429–8438. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.027>.
- [34] A.B. Ibáñez, S. Bauer, Analytical method for the determination of organic acids in dilute acid pretreated biomass hydrolysate by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *Biotechnol. Biofuels* 7 (2014) 145. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0145-3>.
- [35] E. Kiyota, P. Mazzafera, Sawaya, Alexandra C H F, Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7015–7020. <https://doi.org/10.1021/ac301112y>.
- [36] B.C. Owen, L.J. Hauptert, T.M. Jarrell, C.L. Marcum, T.H. Parsell, M.M. Abu-Omar, J.J. Bozell, S.K. Black, H.I. Kenttämä, High-performance liquid chromatography/high-resolution multiple stage tandem mass spectrometry using negative-ion-mode hydroxide-doped electrospray ionization for the characterization of lignin degradation products, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6000–6007. <https://doi.org/10.1021/ac300762y>.
- [37] J. Prothmann, P. Spéigel, M. Sandahl, C. Turner, Identification of lignin oligomers in Kraft lignin using ultra-high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage tandem

- mass spectrometry (UHPLC/HRMSn), *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7803–7814.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1400-4>.
- [38] T.M. Jarrell, C.L. Marcum, H. Sheng, B.C. Owen, C.J. O'Lenick, H. Maraun, J.J. Bozell, H.I. Kenttämää, Characterization of organosolv switchgrass lignin by using high performance liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry using hydroxide-doped negative-ion mode electrospray ionization, *Green Chem* 16 (2014) 2713–2727.  
<https://doi.org/10.1039/C3GC42355G>.
- [39] H. Sheng, W. Tang, J. Gao, J.S. Riedeman, G. Li, T.M. Jarrell, M.R. Hurt, L. Yang, P. Murria, X. Ma, J.J. Nash, H.I. Kenttämää, (-)ESI/CAD MSn Procedure for Sequencing Lignin Oligomers Based on a Study of Synthetic Model Compounds with  $\beta$ -O-4 and 5-5 Linkages, *Anal. Chem.* 89 (2017) 13089–13096. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01911>.
- [40] K. Morreel, H. Kim, F. Lu, O. Dima, T. Akiyama, R. Vanholme, C. Niculaes, G. Goeminne, D. Inzé, E. Messens, J. Ralph, W. Boerjan, Mass spectrometry-based fragmentation as an identification tool in lignomics, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8095–8105. <https://doi.org/10.1021/ac100968g>.
- [41] C.L. Marcum, T.M. Jarrell, H. Zhu, B.C. Owen, L.J. Hauptert, M. Easton, O. Hosseinaei, J. Bozell, J.J. Nash, H.I. Kenttämää, A Fundamental Tandem Mass Spectrometry Study of the Collision-Activated Dissociation of Small Deprotonated Molecules Related to Lignin, *ChemSusChem* 9 (2016) 3513–3526. <https://doi.org/10.1002/cssc.201600678>.
- [42] A. Dubuis, A. Le Masle, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon, Centrifugal partition chromatography as a fractionation tool for the analysis of lignocellulosic biomass products by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1597 (2019) 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.031>.
- [43] A. Dubuis, A. Le Masle, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon, Off-line comprehensive size exclusion chromatography  $\times$  reversed-phase liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for the analysis of lignocellulosic biomass products, *J. Chromatogr. A* 1609 (2020) 460505. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460505>.
- [44] C. Reymond, A. Dubuis, A. Le Masle, C. Colas, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon, Characterization of liquid-liquid extraction fractions from lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1610 (2020) 460569. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460569>.
- [45] D. Alexis, Déformulation de matrices complexes vers une méthodologie raisonnée adaptée aux matrices issues des procédés de valorisation de la biomasse, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon, 2019.
- [46] J. Schenk, G. Nagy, N.L.B. Pohl, A. Leghissa, J. Smuts, K.A. Schug, Identification and deconvolution of carbohydrates with gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy, *J. Chromatogr. A* 1513 (2017) 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.052>.
- [47] L. Senila, A. Gog, M. Senila, C. Roman, L. Silahi-Dumitrescu, Analysis of Carbohydrates Obtained from Wood by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *REV. CHIM* 62 (2011).
- [48] T.R.I. Cataldi, G. Margiotta, L. Iasi, B. Di Chio, C. Xiloyannis, S.A. Bufo, Determination of Sugar Compounds in Olive Plant Extracts by Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3902–3907.

- [49] G. Engling, C.M. Carrico, S.M. Kreidenweis, J.L. Collett Jr., D.E. Day, W.C. Malm, E. Lincoln, W. Min Hao, Y. Iinuma, H. Herrmann, Determination of levoglucosan in biomass combustion aerosol by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Atmospheric Environment* 40 (2006) 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.12.069>.
- [50] C. Panagiotopoulos, R. Sempéré, The molecular distribution of combined aldoses in sinking particles in various oceanic conditions, *Marine Chemistry* 95 (2005) 31–49.
- [51] C.M. Zook, W.R. LaCourse, Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates in Fruit Juices Following High Performance Anion Exchange Chromatography, *Current Separations* (1995) 48–52.
- [52] C. Bruggink, R. Maurer, H. Hermann, S. Cavalli, F. Hoefler, Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1085 (2005) 104–109.
- [53] L. Coulier, Y. Zha, R. Bas, P.J. Punt, Analysis of oligosaccharides in lignocellulosic biomass hydrolysates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with mass spectrometry (HPAEC-MS), *Bioresour. Technol.* 133 (2013) 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.085>.
- [54] C. Guignard, L. Jouve, M.B. Bogéat-Triboulot, E. Dreyer, J.-F. Hausman, L. Hoffmann, Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1085 (2005).
- [55] X.-B. Xu, D.-B. Liu, X.M. Guo, S.-J. Yu, P. Yu, Improvement of sugar analysis sensitivity using anion-exchange chromatography-electrospray ionization mass spectrometry with sheath liquid interface, *J. Chromatogr. A* 1366 (2014) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.019>.
- [56] C. Corradini, A. Cavazza, C. Bignardi, High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications, *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2012 (2012) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/487564>.
- [57] Shao-ping Li, Ding-tao Wu, Guang-ping Lv, Jing Zhao, Carbohydrates analysis in herbal glycomics, *Trends in analytical chemistry* 52 (2013) 155–169.
- [58] F.A. Agblevor, B.R. Hames, D. Schell, H.L. Chum, Analysis of biomass sugars using a novel HPLC method, *Appl Biochem Biotechnol* 136 (2007) 309–326. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9028-4>.
- [59] D.T. Li, G.R. Her, Structural analysis of chromophore-labeled disaccharides and oligosaccharides by electrospray ionization mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 644–652. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199807\)33:7<644:AID-JMS667>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199807)33:7<644:AID-JMS667>3.0.CO;2-F).
- [60] G. Qiuju, N. Ulrika, L.L. Ilag, C. Leck, Monosaccharide compositional analysis of marine polysaccharides by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 399 (2011) 2517–2529.

- [61] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784–1821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [62] C. Antonio, T. Larson, A. Gilday, I. Graham, E. Bergström, J. Thomas-Oates, Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis thaliana* leaf tissue, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1399–1407. <https://doi.org/10.1002/rcm.3519>.
- [63] T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2533–2542. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2060-6>.
- [64] C. Remoroza, S. Cord-Landwehr, A.G.M. Leijdekkers, B.M. Moerschbacher, H.A. Schols, H. Gruppen, Combined HILIC-ELSD/ESI-MS(n) enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers, *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.058>.
- [65] A. D'Attoma, Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés, Université Claude Bernard Lyon 1, 2013.
- [66] C. West, C. Elfakir, M. Lafosse, Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3201–3216. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.052>.
- [67] C. Antonio, C. Pinheiro, M.M. Chaves, C.P. Ricardo, M.F. Ortuño, J. Thomas-Oates, Analysis of carbohydrates in *Lupinus albus* stems on imposition of water deficit, using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.010>.
- [68] Y. Kato, Y. Numajiri, Chloride attachment negative-ion mass spectra of sugars by combined liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 562 (1991) 81–97. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80567-V](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80567-V).
- [69] Y. Liu, S. Uргаonkar, J.G. Verkade, D.W. Armstrong, Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1079 (2005) 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.011>.
- [70] E.C.H. Wan, J.Z. Yu, Determination of sugar compounds in atmospheric aerosols by liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.062>.
- [71] J. Matías, J. González, L. Royano, R.A. Barrena, Analysis of sugars by liquid chromatography-mass spectrometry in Jerusalem artichoke tubers for bioethanol production optimization, *Biomass and Bioenergy* 35 (2011) 2006–2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.056>.
- [72] K.S. Boes, R.H. Narron, Y. Chen, S. Park, N.R. Vinuesa, Characterization of biofuel refinery byproduct via selective electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Fuel* 188 (2017) 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.10.016>.

- [73] B. Domon, C.E. Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate J* 5 (1988) 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF01049915>.
- [74] J. Zaia, Mass spectrometry of oligosaccharides, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 161–227. <https://doi.org/10.1002/mas.10073>.
- [75] D.J. Harvey, Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1178–1190.
- [76] Lambert C. Ngoka/Jean Francois. Gal/Carlito B. Lebrilla, Effects of Cations and Charge Types on the Metastable Decay Rates of Oligosaccharides.
- [77] S. Bauer, Mass spectrometry for characterizing plant cell wall polysaccharides, *Front. Plant Sci.* 3 (2012) 45. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00045>.
- [78] S.-P. Huang, H.C. Hsu, C.Y. Liew, S.-T. Tsai, C.-K. Ni, Logically derived sequence tandem mass spectrometry for structural determination of Galactose oligosaccharides, *Glycoconj. J.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09915-1>.
- [79] R.E. Kirk, D.F. Othmer, *Encyclopedia of chemical technology*, Wiley, New York, NY, 2003.
- [80] IFP training, *Le pétrole, toutes les questions sur le pétrole*, IFPEN, 2016. <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Espace-Decouverte/Les-cles-pour-comprendre/Les-sources-d-energie/Le-petrole> (accessed 3 November 2017).
- [81] M.M. Ramírez-Corredores, *The science and technology of unconventional oils: Finding refining opportunities*, Elsevier; Academic Press an imprint of Elsevier, London United Kingdom, 2017.
- [82] R.S. Kraus, *Chapitre 78 - Le raffinage du pétrole*, 2009. <http://www.ilocis.org/fr/documents/ilo078.htm> (accessed 6 November 2017).
- [83] M. Sau, K. Basak, U. Manna, M. Santra, R.P. Verma, Effects of organic nitrogen compounds on hydrotreating and hydrocracking reactions, *Catalysis Today* 109 (2005) 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2005.08.007>.
- [84] I. Hita del Olmo, *VALORIZATION OF SCRAP TIRES PYROLYSIS OIL (STPO) THROUGH A 2-STAGE HYDROTREATING-HYDROCRACKING STRATEGY. PROCESS VARIABLES AND KINETIC MODELING*, Université de Pais Vasco, 2015.
- [85] R.F. Sullivan, M.M. Boduszynski, J.C. Fetzer, Molecular transformations in hydrotreating and hydrocracking, *Energy Fuels* 3 (1989) 603–612. <https://doi.org/10.1021/ef00017a013>.
- [86] G.L. Alexandrino, G.R. de Sousa, F. de A M Reis, F. Augusto, Optimizing loop-type cryogenic modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography using time-variable combination of the dual-stage jets for analysis of crude oil, *J. Chromatogr. A* 1536 (2018) 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.054>.
- [87] T. Dutriez, M. Courtiade, D. Thiébaud, H. Dulot, F. Bertoncini, J. Vial, M.-C. Hennion, High-temperature two-dimensional gas chromatography of hydrocarbons up to nC60 for analysis of vacuum gas oils, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2905–2912. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.065>.

- [88] 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. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.070>.
- [89] R. van der Westhuizen, M. Ajam, P. de Coning, J. Beens, A. de Villiers, P. Sandra, Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of synthetic and crude-derived jet fuels, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4478–4486. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.009>.
- [90] P. Vozka, H. Mo, P. Šimáček, G. Kilaz, Middle distillates hydrogen content via GC×GC-FID, *Talanta* 186 (2018) 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.059>.
- [91] W. Biggs, J. Fetzer, Analytical techniques for large polycyclic aromatic hydrocarbons: a review, *Trends in analytical chemistry* 15 (1996) 196–206.
- [92] G. Saravanabhavan, A. Helferty, P.V. Hodson, R.S. Brown, A multi-dimensional high performance liquid chromatographic method for fingerprinting polycyclic aromatic hydrocarbons and their alkyl-homologs in the heavy gas oil fraction of Alaskan North Slope crude, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.045>.
- [93] N.E. Oro, C.A. Lucy, High performance liquid chromatographic separations of gas oil samples and their hydrotreated products using commercial normal phases, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7788–7795. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.071>.
- [94] A. Andrade-Eiroa, V. Leroy, P. Dagaut, Y. Bedjanian, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in kerosene and bio-kerosene soot, *Chemosphere* 78 (2010) 1342–1349. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.005>.
- [95] E. Gilgenast, G. Boczkaj, A. Przyjazny, M. Kamiński, Sample preparation procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum vacuum residue and bitumen, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1059–1069. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5134-9>.
- [96] S.K. Panda, H. Muller, T.A. Al-Qunaysi, O.R. Koseoglu, Determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons by non-aqueous reversed phase liquid chromatography: Application and limitation in refining streams, *J. Chromatogr. A* 1533 (2018) 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.061>.
- [97] C. Zhang, X. Zhang, J. Yang, Z. Liu, Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in heavy products derived from coal and petroleum by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.048>.
- [98] N. Torben, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in automobile exhaust by means of high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography* 170 (1979) 147–156.
- [99] K.K. 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), *Organic Geochemistry* 95 (2016) 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.02.007>.

- [100] 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.001>.
- [101] J.S. Lübeck, L.M.V. Malmquist, J.H. Christensen, Supercritical fluid chromatography for the analysis of oxygenated polycyclic aromatic compounds in unconventional oils, *J. Chromatogr. A* 1589 (2019) 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.056>.
- [102] Y. Tang, S. Sun, L. Zhang, Z. Du, J. Zhuang, J. Pan, Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in tire rubber by ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 10 (2018) 4902–4908. <https://doi.org/10.1039/C8AY01580E>.
- [103] A.P. Wicker, D.D. Carlton, K. Tanaka, M. Nishimura, V. Chen, T. Ogura, W. Hedgepeth, K.A. Schug, On-line supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1086 (2018) 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.014>.
- [104] T. Yoshioka, Y. Nagatomi, K. Harayama, T. Bamba, Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee beverages and dark beer using novel high-sensitivity technique of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Biosci. Bioeng.* 126 (2018) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.01.014>.
- [105] Y. Zhang, Z. Xiao, S. Lv, Z. Du, X. Liu, Simultaneous determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in reclaimed water using solid-phase extraction followed by ultra-performance convergence chromatography with photodiode array detection, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 993–999. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500823>.
- [106] E. Lesellier, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by supercritical fluid chromatography (SFC), *Analisis* 27 (1999) 241–248. <https://doi.org/10.1051/analisis:1999113>.
- [107] 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: Keystone between Petroleomics, Metallopetroleomics, and Petrointeractomics, *Energy Fuels* 32 (2018) 4593–4605. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b03218>.
- [108] C.L. Hendrickson, J.P. Quinn, N.K. Kaiser, D.F. Smith, G.T. Blakney, T. Chen, A.G. Marshall, C.R. Weisbrod, S.C. Beu, 21 Tesla Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer: A National Resource for Ultrahigh Resolution Mass Analysis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 1626–1632. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1182-2>.
- [109] A.K. Huba, P.R. Gardinali, Characterization of a crude oil weathering series by ultrahigh-resolution mass spectrometry using multiple ionization modes, *Sci. Total Environ.* 563–564 (2016) 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.233>.
- [110] E. Niyonsaba, J.M. Manheim, R. Yerabolu, H.I. Kenttämä, Recent Advances in Petroleum Analysis by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 156–177. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05258>.

- [111] D.F. Smith, D.C. Podgorski, R.P. Rodgers, G.T. Blakney, C.L. Hendrickson, 21 Tesla FT-ICR Mass Spectrometer for Ultrahigh-Resolution Analysis of Complex Organic Mixtures, *Anal. Chem.* 90 (2018) 2041–2047. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04159>.
- [112] S.K. Panda, N.A. Alawani, A.R. Lajami, T.A. Al-Qunaysi, H. Muller, Characterization of aromatic hydrocarbons and sulfur heterocycles in Saudi Arabian heavy crude oil by gel permeation chromatography and ultrahigh resolution mass spectrometry, *Fuel* 235 (2019) 1420–1426.
- [113] Y. Cho, J.-G. Na, N.-S. Nho, S. Kim, S. Kim, Application of Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes Crude Oil Fractionation for Detailed Chemical Characterization of Heavy Crude Oils by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Equipped with Atmospheric Pressure Photoionization, *Energy Fuels* 26 (2011) 2558–2565. <https://doi.org/10.1021/ef201312m>.
- [114] J.D. Byer, K. Siek, K. Jobst, Distinguishing the C<sub>3</sub> vs SH<sub>4</sub> Mass Split by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6101–6104. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01137>.
- [115] A.G. Marshall, R.P. Rodgers, *Petroleomics: Chemistry of the underworld*, *PNAS* 105 (2008) 18090–18095.
- [116] W. Wang, Y. Liu, Z. Liu, S. Tian, Detailed Chemical Composition of Straight-Run Vacuum Gas Oil and Its Distillates as a Function of the Atmospheric Equivalent Boiling Point, *Energy Fuels* (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02803>.
- [117] T. Ghislain, P. Faure, R. Michels, Detection and monitoring of PAH and oxy-PAHs by high resolution mass spectrometry: comparison of ESI, APCI and APPI source detection, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23 (2012) 530–536. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0304-8>.
- [118] G.-W. Lien, C.-Y. Chen, C.-F. Wu, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization with tropylium post-column derivatization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3694–3700. <https://doi.org/10.1002/rcm.3267>.
- [119] N. Itoh, Y. Aoyagi, T. Yarita, Optimization of the dopant for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/dopant-assisted atmospheric-pressure photoionization/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 285–288. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.091>.
- [120] S. Sioud, M. Amad, Z.A. Al-Talla, Multicomponent mixed dopant optimization for rapid screening of polycyclic aromatic hydrocarbons using ultra high performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure photoionization high-resolution mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 1488–1496. <https://doi.org/10.1002/rcm.6250>.
- [121] D.R. Smith, D.B. Robb, M.W. Blades, Comparison of dopants for charge exchange ionization of nonpolar polycyclic aromatic hydrocarbons with reversed-phase LC-APPI-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.09.012>.
- [122] J. Santos, M. Pudenzi, A. Wisniewski Jr., M. Breitreitz, M. Eberlin, Optimization of Atmospheric Pressure Photoionization for the Crude Oil Analysis Using Ultra-High Resolution Mass Spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* (2018). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180214>.

- [123] Y.S. Ding, D.L. Ashley, C.H. Watson, Determination of 10 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5966–5973. <https://doi.org/10.1021/jf070649o>.
- [124] M. Smoker, K. Tran, R.E. Smith, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in shrimp, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12101–12104. <https://doi.org/10.1021/jf1029652>.
- [125] R. Yerabolu, R.R. Kotha, E. Niyonsaba, X. Dong, J.M. Manheim, J. Kong, J.S. Riedeman, M. Romanczyk, C.T. Johnston, G. Kilaz, H.I. Kenttämä, Molecular profiling of crude oil by using Distillation Precipitation Fractionation Mass Spectrometry (DPF-MS), *Fuel* 234 (2018) 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.07.028>.
- [126] M. Wang, S. Zhao, K.H. Chung, C. Xu, Q. Shi, Approach for selective separation of thiophenic and sulfidic sulfur compounds from petroleum by methylation/demethylation, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1083–1088. <https://doi.org/10.1021/ac503670k>.
- [127] S.K. Panda, W. Schrader, A. al-Hajji, J.T. Andersson, Distribution of Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles in Three Saudi Arabian Crude Oils as Determined by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 21 (2007) 1071–1077. <https://doi.org/10.1021/ef060511s>.
- [128] S.K. Panda, A.A. Al-Hajji, H. Müller, O.R. Koseoglu, Ligand exchange chromatography: A vital dimension for the reliable characterization of heterocycles in crude oils and refined products, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 1231–1239. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4576-9>.
- [129] V.V. Lobodin, W.K. Robbins, J. Lu, R.P. Rodgers, Separation and Characterization of Reactive and Non-Reactive Sulfur in Petroleum and Its Fractions, *Energy Fuels* 29 (2015) 6177–6186. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b00780>.
- [130] P. ARPINO, *Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III*, 2009 (accessed 26 October 2017).
- [131] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>.
- [132] J. A. Syage S.-S. Cai L. C. Short, Atmospheric Pressure Photoionization — The Second Source for LC-MS? <http://www.chromatographyonline.com/appi-second-source-lc-ms?id=&sk=&date=&pageID=3> (accessed 26 October 2017).
- [133] W.M. Niessen, *Liquid chromatography-Mass spectrometry*, Troisième édition, 2006.
- [134] R. Kostianen, T.J. Kauppila, Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 685–699. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.095>.
- [135] R. Dams, T. Benijts, W. Günther, W. Lambert, A. de Leenheer, Influence of the eluent composition on the ionization efficiency for morphine of pneumatically assisted electrospray, atmospheric-pressure chemical ionization and sonic spray, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1072–1077. <https://doi.org/10.1002/rcm.683>.
- [136] B.A. Huffman, M.L. Poltash, C.A. Hughey, Effect of polar protic and polar aprotic solvents on negative-ion electrospray ionization and chromatographic separation of small acidic molecules, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9942–9950. <https://doi.org/10.1021/ac302397b>.

- [137] R. Kostianen, A.P. Bruins, Effect of Solvent on Dynamic Range and Sensitivity in Pneumatically-assisted Electrospray (Ion Spray) Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1393–1399. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199608\)10:11<1393:AID-RCM654>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199608)10:11<1393:AID-RCM654>3.0.CO;2-V).
- [138] Paul Kebarle/Liang Tang, From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972–986.
- [139] A. Periat, I. Kohler, A. Bugey, S. Bieri, F. Versace, C. Staub, D. Guillarme, Hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry: effect of electrospray ionization source geometry on sensitivity, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.066>.
- [140] S. Cubbon, T. Bradbury, J. Wilson, J. Thomas-Oates, Hydrophilic interaction chromatography for mass spectrometric metabonomic studies of urine, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8911–8918. <https://doi.org/10.1021/ac071008v>.
- [141] C.R. Mallet, Z. Lu, J.R. Mazzeo, A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 49–58.
- [142] M. Kagan, M. Chlenov, C.M. Kraml, Normal-phase high-performance liquid chromatographic separations using ethoxynonafluorobutane as hexane alternative. II. Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry applications with methanol gradients, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 321–331.
- [143] J. Bones, K. Thomas, P.N. Nesterenko, B. Paull, On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS, *Talanta* 70 (2006) 1117–1128. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.02.026>.
- [144] S.P. Russell, P.A. Limbach, Evaluating the reproducibility of quantifying modified nucleosides from ribonucleic acids by LC-UV-MS, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 923-924 (2013) 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.010>.
- [145] Q. Wu, M. Wang, W.J. Sciarappa, J.E. Simon, LC/UV/ESI-MS analysis of isoflavones in Edamame and Tofu soybeans, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2763–2769. <https://doi.org/10.1021/jf035053p>.
- [146] Y.-Z. Cai, J. Xing, M. Sun, Z.-Q. Zhan, H. Corke, Phenolic antioxidants (hydrolyzable tannins, flavonols, and anthocyanins) identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* flowers, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9940–9948. <https://doi.org/10.1021/jf052137k>.
- [147] L.-Z. Lin, X.-G. He, M. Lindenmaier, G. Nolan, J. Yang, M. Cleary, S.-X. Qiu, G.A. Cordell, Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*, *Journal of Chromatography A* 876 (2000) 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00149-7).
- [148] B. Toussaint, C. Pitti, B. Streel, A. Ceccato, P. Hubert, J. Crommen, Quantitative analysis of N-acetylcysteine and its pharmacopeial impurities in a pharmaceutical formulation by liquid

- chromatography–UV detection–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 896 (2000) 191–199.
- [149] T.J. Kauppila, A.P. Bruins, R. Kostianen, Effect of the Solvent Flow Rate on the Ionization Efficiency in Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom* 16 (2005) 1399–1407. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.03.051>.
- [150] La photoionisation à pression atmosphérique (APPI), 2016. <http://masse-spec.fr/appi> (accessed 2 November 2017).
- [151] X. Zhao, J. Yinon, Identification of nitrate ester explosives by liquid chromatography–electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 977 (2002) 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01349-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01349-3).
- [152] Z. Wu, W. Gao, M.A. Phelps, Di Wu, D.D. Miller, J.T. Dalton, Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 839–847. <https://doi.org/10.1021/ac0351670>.
- [153] E. Lesellier, C. West, The many faces of packed column supercritical fluid chromatography--a critical review, *J. Chromatogr. A* 1382 (2015) 2–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.083>.
- [154] C. West, E. Lemasson, Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography-Part II: Adsorption on the stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1593 (2019) 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.002>.
- [155] C. West, M.A. Khalikova, E. Lesellier, K. Héberger, Sum of ranking differences to rank stationary phases used in packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1409 (2015) 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.071>.
- [156] A. Tarafder, Designs and methods for interfacing SFC with MS, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1091 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.003>.
- [157] G.L. Losacco, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry: Recent evolution and current trends, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118 (2019) 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.005>.
- [158] L.-B. Ouyang, New Correlations for Predicting the Density and Viscosity of Supercritical Carbon Dioxide Under Conditions Expected in Carbon Capture and Sequestration Operations, *The Open Petroleum Engineering Journal* (2011) 43-21.
- [159] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: From hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds, *J. Chromatogr. A* 1339 (2014) 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.006>.
- [160] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, The use of columns packed with sub-2  $\mu\text{m}$  particles in supercritical fluid chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014) 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.023>.
- [161] D. Guillarme, V. Desfontaine, S. Heinisch, J.-L. Veuthey, What are the current solutions for interfacing supercritical fluid chromatography and mass spectrometry?, *J. Chromatogr. B Analyt.*

- Technol. Biomed. Life Sci. 1083 (2018) 160–170.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.010>.
- [162] V. Pilařová, K. Plachká, M.A. Khalikova, F. Svec, L. Nováková, Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples?, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112 (2019) 212–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.023>.
- [163] D.B. Hibbert, Experimental design in chromatography: a tutorial review, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 910 (2012) 2–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>.
- [164] N. Lemonakis, A.-L. Skaltsounis, A. Tsarbopoulos, E. Gikas, Optimization of parameters affecting signal intensity in an LTQ-orbitrap in negative ion mode: A design of experiments approach, *Talanta* 147 (2016) 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.009>.
- [165] P. Paíga, L.M.S. Silva, C. Delerue-Matos, Optimization of the Ion Source-Mass Spectrometry Parameters in Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Pharmaceuticals Analysis by a Design of Experiments Approach, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 1703–1714.  
<https://doi.org/10.1007/s13361-016-1459-0>.
- [166] B. Andri, P. Lebrun, A. Dispas, R. Klinkenberg, B. Streel, E. Ziemons, R.D. Marini, P. Hubert, Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D3 and its related impurities, *J. Chromatogr. A* 1491 (2017) 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.090>.
- [167] C. Gonçalves, J.J. Carvalho, M.A. Azenha, M.F. Alpendurada, Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 6–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.089>.
- [168] S. Rudaz, S. Cherkaoui, J.-Y. Gauthier, P. Lantéri, J.-L. Veuthey, Experimental designs to investigate capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry enantioseparation with the partial-filling technique, *Electrophoresis* 22 (2001) 3316–3326.  
[https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200109\)22:15<3316:AID-ELPS3316>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200109)22:15<3316:AID-ELPS3316>3.0.CO;2-R).
- [169] R. Mirzaei, M. Yunesian, S. Nasserli, M. Gholami, E. Jalilzadeh, S. Shoeibi, H.S. Bidshahi, A. Mesdaghinia, An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology- central composite design, *J. Environ. Health Sci. Eng.* 15 (2017) 21. <https://doi.org/10.1186/s40201-017-0282-2>.
- [170] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, da Silva, E G P, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, dos Santos, W N L, Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 179–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
- [171] V. Tak, P.K. Kanaujia, D. Pardasani, R. Kumar, R.K. Srivastava, A.K. Gupta, D.K. Dubey, Application of Doehlert design in optimizing the determination of degraded products of nerve agents by ion-pair liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.079>.

- [172] T. Kind, O. Fiehn, Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC Bioinformatics* 8 (2007) 105. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105>.
- [173] S.S. Instruments, LCMS-IT-TOF Mass Spectrometer – Formula Predictor – LCMS | Shimadzu. <https://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcmsittof-7> (accessed 19 December 2017).
- [174] H. E. Revercomb/E. A. Mason, Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis. Review.
- [175] Y. Pu, M.E. Ridgeway, R.S. Glaskin, M.A. Park, C.E. Costello, C. Lin, Separation and Identification of Isomeric Glycans by Selected Accumulation-Trapped Ion Mobility Spectrometry-Electron Activated Dissociation Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 3440–3443. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00041>.
- [176] M. Bojczuk, D. Żyżelewicz, P. Hodurek, Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 1597–1609. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601221>.
- [177] S. Forcisi, F. Moritz, B. Kanawati, D. Tziotis, R. Lehmann, P. Schmitt-Kopplin, Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.017>.
- [178] M.D. Peris-Díaz, M.A. Sentandreu, E. Sentandreu, Multiobjective optimization of liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry analysis of underivatized human urinary amino acids through chemometrics, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4275–4284. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1083-x>.
- [179] J.M. Jarvis, A.M. McKenna, R.N. Hiltten, K.C. Das, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Characterization of Pine Pellet and Peanut Hull Pyrolysis Bio-oils by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (2012) 3810–3815. <https://doi.org/10.1021/ef300385f>.
- [180] E.A. Smith, S. Park, A.T. Klein, Y.J. Lee, Bio-oil Analysis Using Negative Electrospray Ionization: Comparative Study of High-Resolution Mass Spectrometers and Phenolic versus Sugaric Components, *Energy Fuels* 26 (2012) 3796–3802. <https://doi.org/10.1021/ef3003558>.
- [181] P.V. Abdelnur, B.G. Vaz, J.D. Rocha, de Almeida, Marlon B. B., M.A.G. Teixeira, R.C.L. Pereira, Characterization of Bio-oils from Different Pyrolysis Process Steps and Biomass Using High-Resolution Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 27 (2013) 6646–6654. <https://doi.org/10.1021/ef400788v>.
- [182] J. Prothmann, M. Sun, P. Spéigel, M. Sandahl, C. Turner, Ultra-high-performance supercritical fluid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPSFC/QTOF-MS) for analysis of lignin-derived monomeric compounds in processed lignin samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 7049–7061. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0663-5>.
- [183] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *The Journal of Chemical Physics* 49 (1968) 2240–2249. <https://doi.org/10.1063/1.1670391>.

- [184] J.V. Iribarne, B.A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *The Journal of Chemical Physics* 64 (1976) 2287. <https://doi.org/10.1063/1.432536>.
- [185] M. Wilm, Principles of electrospray ionization, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011) M111.009407. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009407>.
- [186] P. Kebarle, M. Peschke, On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 11–35. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00598-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00598-X).
- [187] D. Wolrab, P. Frühauf, C. Gerner, Direct coupling of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids and related compounds: Comparing electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization, *Anal. Chim. Acta* 981 (2017) 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.005>.
- [188] D.P.H. Smith, The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids, *IEEE Trans. on Ind. Applicat. IA-22* (1986) 527–535. <https://doi.org/10.1109/TIA.1986.4504754>.
- [189] J.W. Thompson, J.W. Eschelbach, R.T. Wilburn, J.W. Jorgenson, Investigation of electrospray ionization and electrostatic focusing devices using a three-dimensional electrospray current density profiler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.11.012>.
- [190] Gary J. Van Berkel\*, J. Martin E. Quirke, \*, Rudolfo A. Tigani, and, Anja S. Dilley, and Thomas R. Covey, Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 3. Electrochemically Ionizable Derivatives.
- [191] T. Henriksen, R.K. Juhler, B. Svensmark, N.B. Cech, The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.11.021>.
- [192] M. Girod, X. Dagany, R. Antoine, P. Dugourd, Relation between charge state distributions of peptide anions and pH changes in the electrospray plume. A mass spectrometry and optical spectroscopy investigation, *International Journal of Mass Spectrometry* 308 (2011) 41–48.
- [193] A.A.F. Zielinski, C.W.I. Haminiuk, T. Beta, Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC–DAD–Q-TOF–MS/MS, *LWT - Food Science and Technology* 65 (2016) 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.020>.
- [194] J. Hertzog, V. Carré, A. Dufour, F. Aubriet, Semi-Targeted Analysis of Complex Matrices by ESI FT-ICR MS or How an Experimental Bias may be Used as an Analytical Tool, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 543–557. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1865-y>.
- [195] W. Ostrowski, A. Wojakowska, M. Grajzer, M. Stobiecki, Mass spectrometric behavior of phenolic acids standards and their analysis in the plant samples with LC/ESI/MS system, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 967 (2014) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.07.005>.
- [196] I. Parveen, M.D. Threadgill, B. Hauck, I. Donnison, A. Winters, Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves

- and stems of *Miscanthus × giganteus* using LC-ESI-MSn, *Phytochemistry* 72 (2011) 2376–2384. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.015>.
- [197] P.K. Kanaujia, D.V. Naik, D. Tripathi, R. Singh, M.K. Poddar, L.S.K. Konathala, Y.K. Sharma, Pyrolysis of *Jatropha Curcas* seed cake followed by optimization of liquid-liquid extraction procedure for the obtained bio-oil, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 118 (2016) 202–224. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.02.005>.
- [198] Y. Wei, H. Lei, L. Wang, L. Zhu, X. Zhang, Y. Liu, S. Chen, B. Ahring, Liquid–Liquid Extraction of Biomass Pyrolysis Bio-oil, *Energy Fuels* 28 (2014) 1207–1212. <https://doi.org/10.1021/ef402490s>.
- [199] S.-F. Chen, *High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Quantitative Assessment of Degradation Products and Extractives in Pretreated Lignocellulose*, 2007.
- [200] L.M. Amundson, V.A. Gallardo, N.R. Vinueza, B.C. Owen, J.N. Reece, S.C. Habicht, M. Fu, R.C. Shea, A.B. Mossman, H.I. Kenttämä, Identification and Counting of Oxygen Functionalities and Alkyl Groups of Aromatic Analytes in Mixtures by Positive-Mode Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry Coupled with High-Performance Liquid Chromatography, *Energy Fuels* 26 (2012) 2975–2989. <https://doi.org/10.1021/ef2019098>.
- [201] T.-Q. Yuan, S.-N. Sun, F. Xu, R.-C. Sun, Characterization of lignin structures and lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative <sup>13</sup>C and 2D HSQC NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 10604–10614. <https://doi.org/10.1021/jf2031549>.
- [202] F. Hufsky, K. Scheubert, S. Böcker, Computational mass spectrometry for small-molecule fragmentation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 53 (2014) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.008>.
- [203] T. Kind, H. Tsugawa, T. Cajka, Y. Ma, Z. Lai, S.S. Mehta, G. Wohlgemuth, D.K. Barupal, M.R. Showalter, M. Arita, O. Fiehn, Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search, *Mass Spectrom. Rev.* (2017). <https://doi.org/10.1002/mas.21535>.
- [204] M. Vinaixa, E.L. Schymanski, S. Neumann, M. Navarro, R.M. Salek, O. Yanes, Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 78 (2016) 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>.
- [205] I. Blaženović, T. Kind, J. Ji, O. Fiehn, Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics, *Metabolites* 8 (2018). <https://doi.org/10.3390/metabo8020031>.
- [206] F. Hufsky, S. Böcker, Mining molecular structure databases: Identification of small molecules based on fragmentation mass spectrometry data, *Mass Spectrom. Rev.* 36 (2017) 624–633. <https://doi.org/10.1002/mas.21489>.
- [207] F. Hufsky, K. Scheubert, S. Böcker, New kids on the block: Novel informatics methods for natural product discovery, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 807–817. <https://doi.org/10.1039/c3np70101h>.
- [208] E.L. Schymanski, C. Ruttkies, M. Krauss, C. Brouard, T. Kind, K. Dührkop, F. Allen, A. Vaniya, D. Verdegem, S. Böcker, J. Rousu, H. Shen, H. Tsugawa, T. Sajed, O. Fiehn, B. Ghesquière, S.

- Neumann, Critical Assessment of Small Molecule Identification 2016: Automated methods, *J. Cheminform.* 9 (2017) 22. <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0207-1>.
- [209] I. Blaženović, T. Kind, H. Torbašinović, S. Obrenović, S.S. Mehta, H. Tsugawa, T. Wermuth, N. Schauer, M. Jahn, R. Biedendieck, D. Jahn, O. Fiehn, Comprehensive comparison of in silico MS/MS fragmentation tools of the CASMI contest: Database boosting is needed to achieve 93% accuracy, *J. Cheminform.* 9 (2017) 32. <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0219-x>.
- [210] Y. Djoumbou-Feunang, A. Pon, N. Karu, J. Zheng, C. Li, D. Arndt, M. Gautam, F. Allen, D.S. Wishart, CFM-ID 3.0: Significantly Improved ESI-MS/MS Prediction and Compound Identification, *Metabolites* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/metabo9040072>.
- [211] H.B. Klinke, A.B. Thomsen, B.K. Ahring, Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2004) 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>.
- [212] P. Persson, J. Andersson, Lo Gorton, S. Larsson, N.-O. Nilvebrant, L.J. Jönsson, Effect of Different Forms of Alkali Treatment on Specific Fermentation Inhibitors and on the Fermentability of Lignocellulose Hydrolysates for Production of Fuel Ethanol, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5318–5325. <https://doi.org/10.1021/jf025565o>.
- [213] F. Buendia-Kandia, G. Mauviel, E. Guedon, E. Rondags, D. Petitjean, A. Dufour, Decomposition of Cellulose in Hot-Compressed Water: Detailed Analysis of the Products and Effect of Operating Conditions, *Energy Fuels* 32 (2018) 4127–4138. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02994>.
- [214] M. Grembecka, A. Lebiedzińska, P. Szefer, Simultaneous separation and determination of erythritol, xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, fructose, glucose, sucrose and maltose in food products by high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detector, *Microchemical Journal* 117 (2014) 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.06.012>.
- [215] B.A. Sarvin, A.P. Seregin, O.A. Shpigun, I.A. Rodin, A.N. Stavrianidi, A novel strategy for isolation and determination of sugars and sugar alcohols from conifers, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1092 (2018) 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.005>.
- [216] R. Vismeh, J.F. Humpala, S.P.S. Chundawat, V. Balan, B.E. Dale, A.D. Jones, Profiling of soluble neutral oligosaccharides from treated biomass using solid phase extraction and LC-TOF MS, *Carbohydrate Polymers* 94 (2013) 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.005>.
- [217] P.P.K.G. Costa, T.D. Mendes, T.F.C. Salum, T.F. Pacheco, S.C. Braga, J.R.M. de Almeida, S.B. Gonçalves, M.C.T. Damaso, C.M. Rodrigues, Development and validation of HILIC-UHPLC-ELSD methods for determination of sugar alcohols stereoisomers and its application for bioconversion processes of crude glycerin, *J. Chromatogr. A* 1589 (2019) 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.044>.
- [218] Y. Nakamichi, T. Fouquet, S. Ito, M. Watanabe, A. Matsushika, H. Inoue, Structural and functional characterization of a bifunctional GH30-7 xylanase B from the filamentous fungus *Talaromyces cellulolyticus*, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 4065–4078. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007207>.

- [219] B. Plancot, G. Vanier, F. Maire, M. Bardor, P. Lerouge, J.M. Farrant, J. Moore, A. Driouich, M. Viché-Gibouin, C. Afonso, C. Loutelier-Bourhis, Structural characterization of arabinoxylans from two African plant species *Eragrostis nindensis* and *Eragrostis tef* using various mass spectrometric methods, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 908–916. <https://doi.org/10.1002/rcm.6859>.
- [220] A. Baglai, A.F.G. Gargano, J. Jordens, Y. Mengerink, M. Honing, S. van der Wal, P.J. Schoenmakers, Comprehensive lipidomic analysis of human plasma using multidimensional liquid- and gas-phase separations: Two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry vs. liquid chromatography-trapped-ion-mobility-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1530 (2017) 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.014>.
- [221] V. D'Atri, T. Causon, O. Hernandez-Alba, A. Mutabazi, J.-L. Veuthey, S. Cianferani, D. Guillarme, Adding a new separation dimension to MS and LC-MS: What is the utility of ion mobility spectrometry?, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 20–67. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700919>.
- [222] S. Stephan, J. Hippler, T. Köhler, A.A. Deeb, T.C. Schmidt, O.J. Schmitz, Contaminant screening of wastewater with HPLC-IM-qTOF-MS and LC+LC-IM-qTOF-MS using a CCS database, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6545–6555. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9820-5>.
- [223] H. Zhang, J.-M. Jiang, D. Zheng, M. Yuan, Z.-Y. Wang, H.-M. Zhang, C.-W. Zheng, L.-B. Xiao, H.-X. Xu, A multidimensional analytical approach based on time-decoupled online comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of ginsenosides from white and red ginsengs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 163 (2019) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.036>.
- [224] J. Hofmann, H.S. Hahm, P.H. Seeberger, K. Pagel, Identification of carbohydrate anomers using ion mobility-mass spectrometry, *Nature* 526 (2015) 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature15388>.
- [225] H. Li, B. Bendiak, W.F. Siems, D.R. Gang, H.H. Hill, Carbohydrate structure characterization by tandem ion mobility mass spectrometry (IMMS)<sup>2</sup>, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2760–2769. <https://doi.org/10.1021/ac303273z>.
- [226] J.P. Williams, M. Grabenauer, R.J. Holland, C.J. Carpenter, M.R. Wormald, K. Giles, D.J. Harvey, R.H. Bateman, J.H. Scrivens, M.T. Bowers, Characterization of simple isomeric oligosaccharides and the rapid separation of glycan mixtures by ion mobility mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* 298 (2010) 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2009.08.006>.
- [227] M. Zhu, B. Bendiak, B. Clowers, H.H. Hill, Ion mobility-mass spectrometry analysis of isomeric carbohydrate precursor ions, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1853–1867. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2865-y>.
- [228] M. Schroeder, S.W. Meyer, H.M. Heyman, A. Barsch, L.W. Sumner, Generation of a Collision Cross Section Library for Multi-Dimensional Plant Metabolomics Using UHPLC-Trapped Ion Mobility-MS/MS, *Metabolites* 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/metabo10010013>.
- [229] A. Tebani, I. Schmitz-Afonso, D.N. Rutledge, B.J. Gonzalez, S. Bekri, C. Afonso, Optimization of a liquid chromatography ion mobility-mass spectrometry method for untargeted metabolomics

- using experimental design and multivariate data analysis, *Anal. Chim. Acta* 913 (2016) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.011>.
- [230] X. Zhang, K. Kew, R. Reisdorph, M. Sartain, R. Powell, M. Armstrong, K. Quinn, C. Cruickshank-Quinn, S. Walmsley, S. Bokatzian, E. Darland, M. Rain, K. Imatani, N. Reisdorph, Performance of a High-Pressure Liquid Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry System for Metabolic Profiling, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6384–6391. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04628>.
- [231] P. Venter, M. Muller, J. Vestner, M.A. Stander, A.G.J. Tredoux, H. Pasch, A. de Villiers, Comprehensive Three-Dimensional LC × LC × Ion Mobility Spectrometry Separation Combined with High-Resolution MS for the Analysis of Complex Samples, *Anal. Chem.* 90 (2018) 11643–11650. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03234>.
- [232] B.W.J. Pirok, A.F.G. Gargano, P.J. Schoenmakers, Optimizing separations in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 68–98. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700863>.
- [233] 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.052>.
- [234] 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.028>.
- [235] J. Jáčová, A. Gardlo, D. Friedecký, T. Adam, J.-M.D. Dimandja, Sample-independent approach to normalize two-dimensional data for orthogonality evaluation using whole separation space scaling, *J. Chromatogr. A* 1511 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.076>.
- [236] 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. <https://doi.org/10.1021/ac071504j>.
- [237] M. Iguiniz, F. Rouvière, E. Corbel, N. Roques, S. Heinisch, Comprehensive two dimensional liquid chromatography as analytical strategy for pharmaceutical analysis, *J. Chromatogr. A* 1536 (2018) 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.070>.
- [238] C. Wu, K. Qian, C.C. Walters, A. Mennito, Application of atmospheric pressure ionization techniques and tandem mass spectrometry for the characterization of petroleum components, *International Journal of Mass Spectrometry* 377 (2015) 728–735. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.08.019>.
- [239] A.G. Marshall, R.P. Rodgers, *Petroleomics: The next grand challenge for chemical analysis*, *Acc. Chem. Res.* 37 (2004) 53–59. <https://doi.org/10.1021/ar020177t>.
- [240] J.C. Fetzer, *THE CHEMISTRY AND ANALYSIS OF LARGE PAHs, Polycyclic Aromatic Compounds* 27 (2007) 143–162. <https://doi.org/10.1080/10406630701268255>.

- [241] A. Bemgard, A. Colmsjo, B.-O. Lundmark, Gas chromatographic analysis of high-molecular-weight polynuclear aromatic hydrocarbons, *Journal of Chromatography* 595 (1992) 247–258.
- [242] J.F. Palmentier, A.J. Britten, G.M. Charbonneau, F.W. Karasek, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in lubricating oil base stocks using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 469 (1989) 241–251.
- [243] D. Thiébaud, Separations of petroleum products involving supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.074>.
- [244] A.K. Huba, K. Huba, P.R. Gardinali, Understanding the atmospheric pressure ionization of petroleum components: The effects of size, structure, and presence of heteroatoms, *Sci. Total Environ.* 568 (2016) 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.044>.
- [245] S.-S. Cai, J. Stevens, J.A. Syage, Ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters, *J. Chromatogr. A* 1227 (2012) 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.111>.
- [246] Sheng-Suan Cai, Jack A. Syage, Karl A. Hanold, and Michael P. Balogh, Ultra Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Photoionization–Tandem Mass Spectrometry for High-Sensitivity and High-Throughput Analysis of U.S. Environmental Protection Agency 16 Priority Pollutants Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2123–2128.
- [247] G.C. Klein, A. Angström, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Use of Saturates/Aromatics/Resins/Asphaltenes (SARA) Fractionation To Determine Matrix Effects in Crude Oil Analysis by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 20 (2006) 668–672. <https://doi.org/10.1021/ef050353p>.
- [248] P. Danial-Fortain, T. Gauthier, I. Merdrignac, H. Budzinski, Reactivity study of Athabasca vacuum residue in hydroconversion conditions, *Catalysis Today* 150 (2010) 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.10.002>.
- [249] A. Goyon, L. Sciascera, A. Clarke, D. Guillarme, R. Pell, Extending the limits of size exclusion chromatography: Simultaneous separation of free payloads and related species from antibody drug conjugates and their aggregates, *J. Chromatogr. A* 1539 (2018) 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.039>.
- [250] D.R. Stoll, X. Wang, P.W. Carr, Comparison of the practical resolving power of one- and two-dimensional high-performance liquid chromatography analysis of metabolomic samples, *Anal. Chem.* 80 (2008) 268–278. <https://doi.org/10.1021/ac701676b>.
- [251] E. Sommella, E. Salviati, F. Merciai, M. Manfra, A. Bertamino, F. Gasparrini, E. Novellino, P. Campiglia, Online comprehensive hydrophilic interaction chromatography × reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry for in depth peptidomic profile of microalgae gastro-intestinal digests, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 175 (2019) 112783. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112783>.
- [252] A.F.G. Gargano, J.B. Shaw, M. Zhou, C.S. Wilkins, T.L. Fillmore, R.J. Moore, G.W. Somsen, L. Paša-Tolić, Increasing the Separation Capacity of Intact Histone Proteoforms Chromatography

- Coupling Online Weak Cation Exchange-HILIC to Reversed Phase LC UVPD-HRMS, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 3791–3800. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00458>.
- [253] E. Lazzari, K. Arena, E.B. Caramão, M. Herrero, Quantitative analysis of aqueous phases of bio-oils resulting from pyrolysis of different biomasses by two-dimensional comprehensive liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1602 (2019) 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.016>.
- [254] M. Sun, M. Sandahl, C. Turner, Comprehensive on-line two-dimensional liquid chromatography × supercritical fluid chromatography with trapping column-assisted modulation for depolymerised lignin analysis, *J. Chromatogr. A* 1541 (2018) 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.008>.
- [255] Y. Chen, L. Montero, J. Luo, J. Li, O.J. Schmitz, Application of the new at-column dilution (ACD) modulator for the two-dimensional RP×HILIC analysis of *Buddleja davidii*, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 1483–1495. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02392-3>.
- [256] R. Gallego, K. Arena, P. Dugo, L. Mondello, E. Ibáñez, M. Herrero, Application of compressed fluid-based extraction and purification procedures to obtain astaxanthin-enriched extracts from *Haematococcus pluvialis* and characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 589–599. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02287-y>.
- [257] H. Pan, H. Zhou, S. Miao, J. Cao, J. Liu, L. Lan, Q. Hu, X. Mao, S. Ji, An integrated approach for global profiling of multi-type constituents: Comprehensive chemical characterization of *Lonicerae Japonicae Flos* as a case study, *J. Chromatogr. A* 1613 (2020) 460674. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460674>.
- [258] S. Stephan, C. Jakob, J. Hippler, O.J. Schmitz, A novel four-dimensional analytical approach for analysis of complex samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 3751–3759. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9460-9>.
- [259] X. Ouyang, P.E.G. Leonards, Z. Touseva, J. Slobodnik, J. de Boer, M.H. Lamoree, Rapid Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors by Effect-Directed Analysis Using LC × LC Fractionation, a High Throughput in Vitro Assay, and Parallel Identification by Time of Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2353–2360. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04311>.
- [260] J.H. Banoub, B. Benjelloun-Mlayah, F. Ziarelli, N. Joly, M. Delmas, Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2867–2888. <https://doi.org/10.1002/rcm.3159>.
- [261] C. Mukarakate, R.J. Evans, S. Deutch, T. Evans, A.K. Starace, J. ten Dam, M.J. Watson, K. Magrini, Reforming Biomass Derived Pyrolysis Bio-oil Aqueous Phase to Fuels, *Energy Fuels* 31 (2017) 1600–1607. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02463>.
- [262] T.M. Jarrell, C. Jin, J.S. Riedeman, B.C. Owen, X. Tan, A. Scherer, R.R. Tykwinski, M.R. Gray, P. Slater, H.I. Kenttämä, Elucidation of structural information achievable for asphaltenes via collision-activated dissociation of their molecular ions in MS<sub>n</sub> experiments: A model compound study, *Fuel* 133 (2014) 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.040>.

- [263] C.J. Gray, B. Thomas, R. Upton, L.G. Migas, C.E. Eyers, P.E. Barran, S.L. Flitsch, Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (2016) 1688–1709. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.003>.
- [264] C. Jin, D.J. Harvey, W.B. Struwe, N.G. Karlsson, Separation of Isomeric O-Glycans by Ion Mobility and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10604–10613. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01772>.
- [265] T. Zuo, C. Zhang, W. Li, H. Wang, Y. Hu, W. Yang, L. Jia, X. Wang, X. Gao, D. Guo, Offline two-dimensional liquid chromatography coupled with ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometry enabling four-dimensional separation and characterization of the multicomponents from white ginseng and red ginseng, *Journal of Pharmaceutical Analysis* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.001>.
- [266] J.M. Davis, J.C. Giddings, Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms, *Anal. Chem.* 55 (1983) 418–424.
- [267] E. Cho, M. Witt, M. Hur, M.-J. Jung, S. Kim, Application of FT-ICR MS Equipped with Quadrupole Detection for Analysis of Crude Oil, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12101–12107. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02644>.
- [268] Y. Qi, R. Luo, W. Schrader, D.A. Volmer, I.S. Butler, Application of phase correction to improve the characterization of photooxidation products of lignin using 7 Tesla Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *FACETS* 2 (2017) 461–475. <https://doi.org/10.1139/facets-2016-0069>.
- [269] Y. Qi, M.P. Barrow, H. Li, J.E. Meier, S.L. van Orden, C.J. Thompson, P.B. O'Connor, Absorption-mode: The next generation of Fourier transform mass spectra, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2923–2929. <https://doi.org/10.1021/ac3000122>.