

Couplage SFC-UV/MS

Sommaire du chapitre

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

Liste des figures et tableaux

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

Partie A : Couplage avec un analyseur simple quadripôle

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

1 Caractérisation du couplage

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

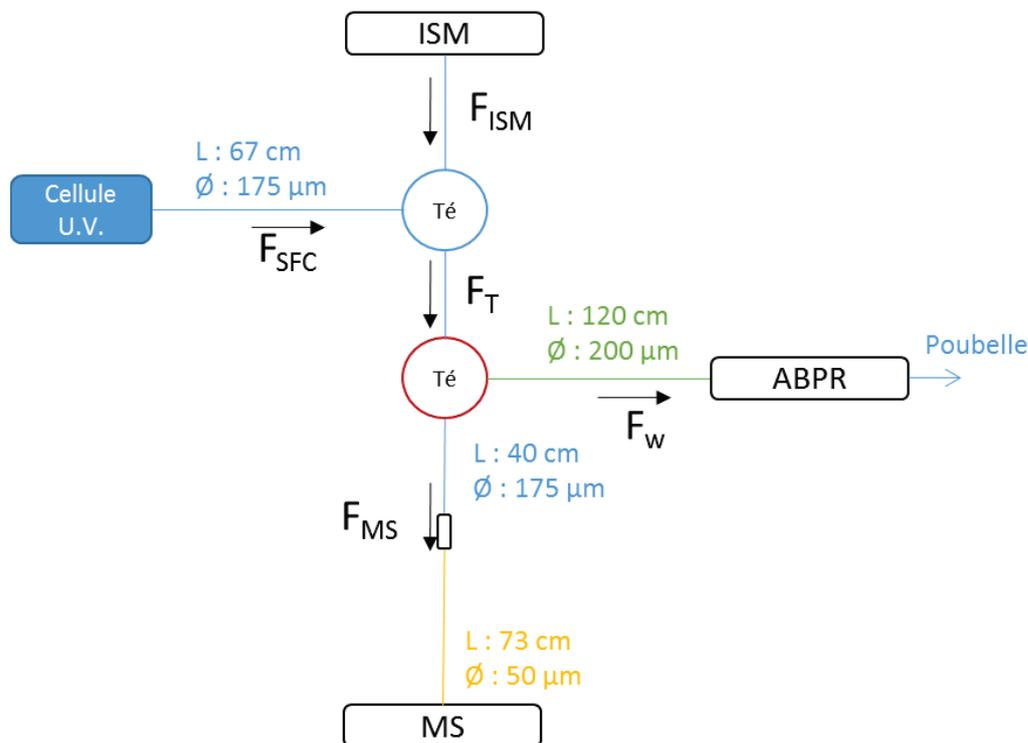


Figure IV-1 : Schéma du montage SFC- « make-up »/MS (avec LCMS 2020)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

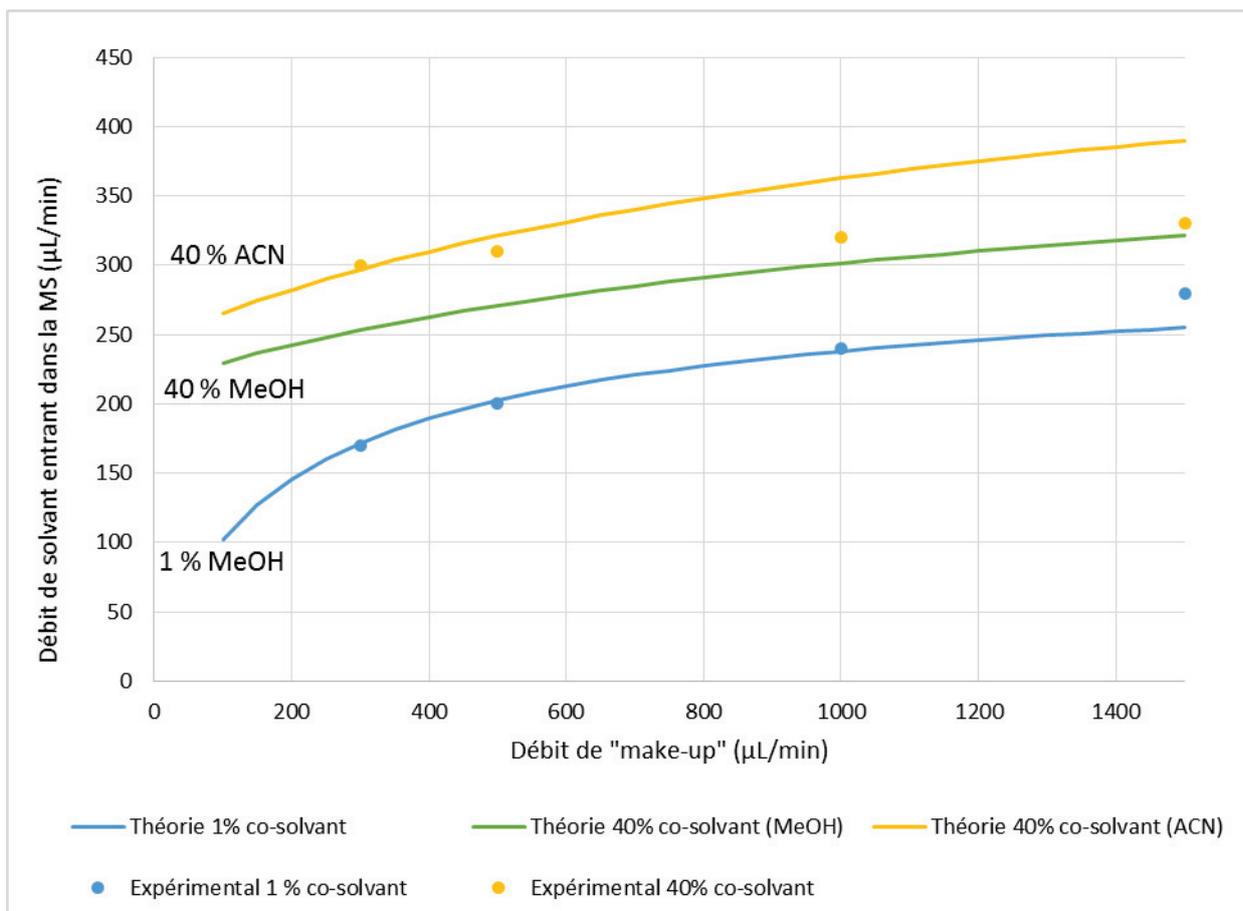


Figure IV-2 : Débit de solvant mesuré à l'entrée de la source MS en fonction de la composition en co-solvant de la phase mobile (1 ou 40 %), de la nature du solvant considéré (MeOH ou ACN) et du débit « make-up », (débit SFC : 1.4 mL/min, T°C : 30°C, BPR : 150 bars)

2 Optimisation des paramètres d'ionisation

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

2.1 Méthodologie d'optimisation

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

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

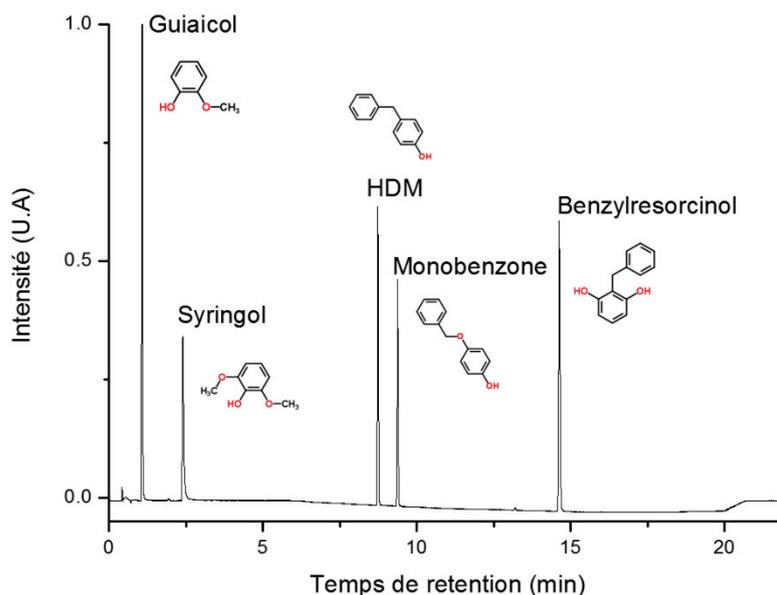


Figure IV-3 : Chromatogramme de mélange modèle à 210 nm. Phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, Co-solvant : ACN/H₂O (98/2), T° : 30 °C, P : 150 bars, Gradient linéaire : de 1 à 40 % en 14 min, débit : 1.4 mL/min)

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

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

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

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

2.1.1 Position de la source

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

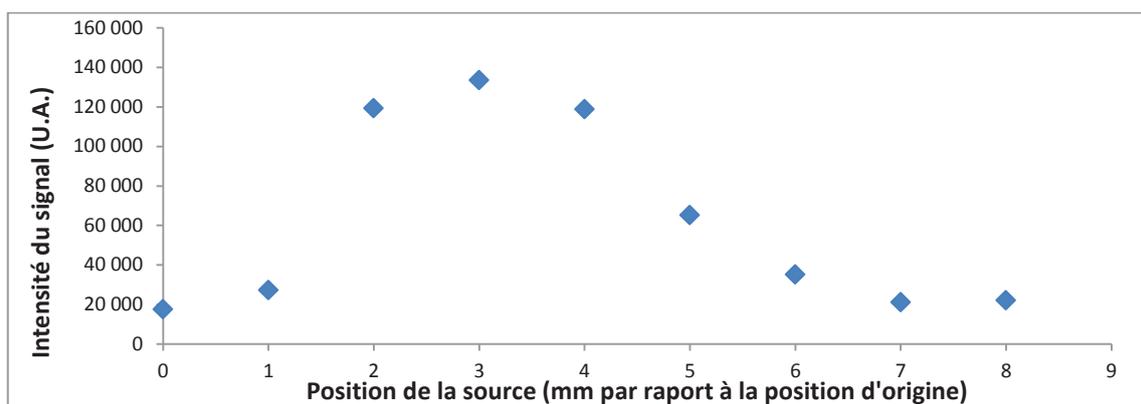


Figure IV-4 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction de la position de la source

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

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

2.1.2 Débit de gaz nébulisant

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

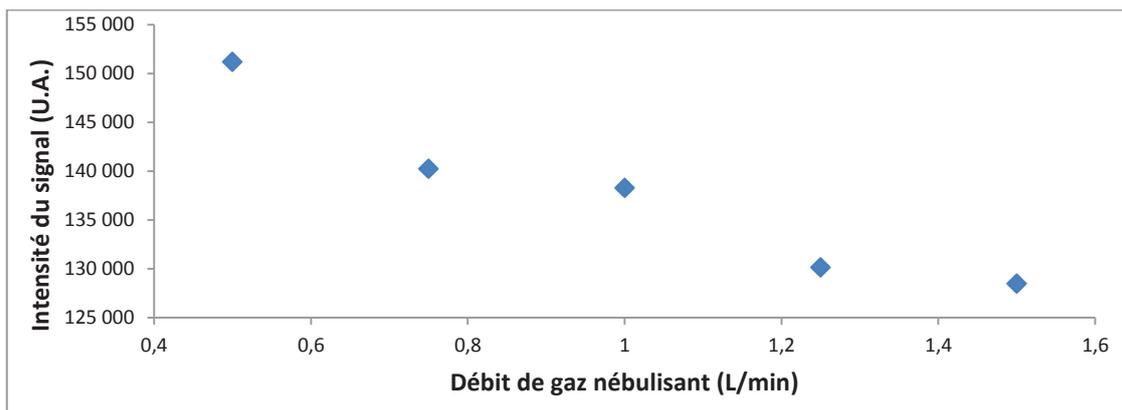


Figure IV-5 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction du débit de gaz nébulisant

2.1.3 Débit de gaz séchant

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

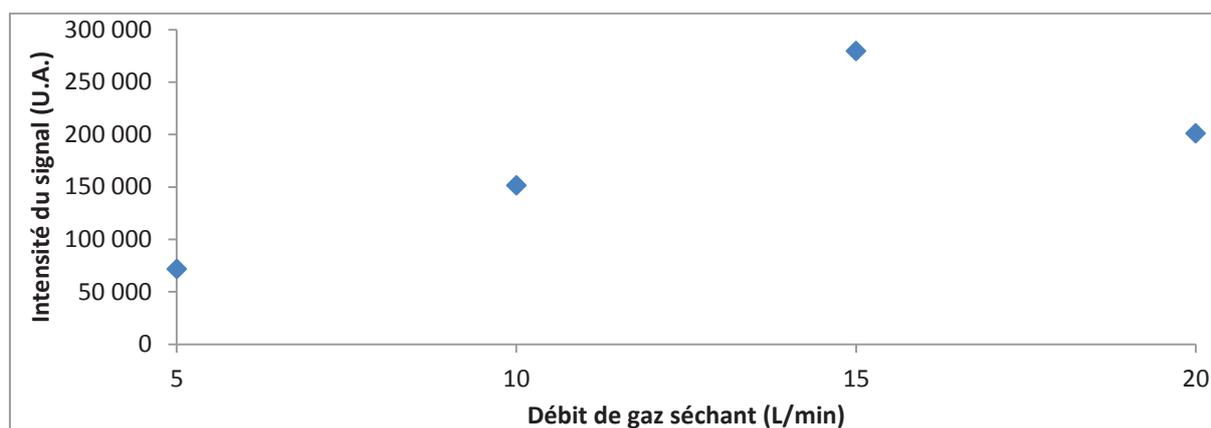


Figure IV-6 : Intensité du signal du syringol en SFC/ESI(-) MS en fonction du débit de gaz séchant

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

2.1.4 Tension de l'interface

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

2.1.5 Température de la source

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

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

2.1.6 Capillaire de transfert (température et tension)

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

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

2.1.7 Conclusion

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

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

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

2.1.8 Mode d'ionisation APCI

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

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

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

2.2 Conclusion

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

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

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

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

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

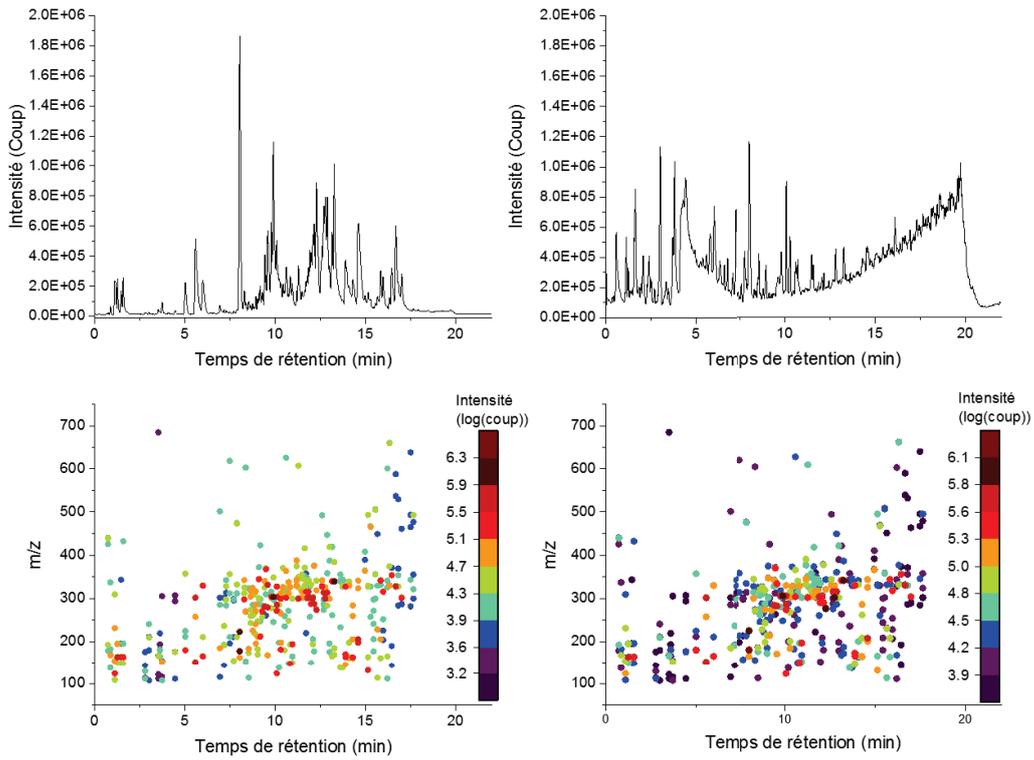
3 Analyse d'une huile de pyrolyse rapide de biomasse

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

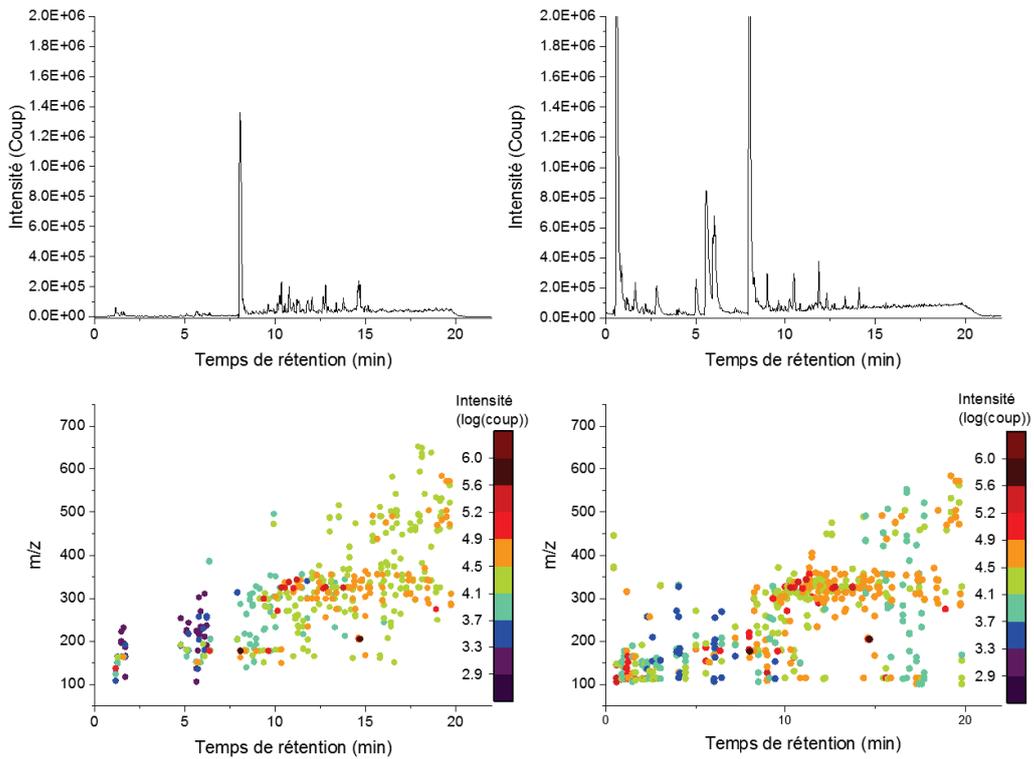
3.1 Analyse par SFC/ESI (-)-MS

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

ESI



APCI



Négatif

Positif

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

3.2 Analyse SFC/ESI (+)-MS

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

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

3.3 Analyse en SFC/APCI (-)-MS

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

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

3.4 Analyse en SFC/APCI (+)-MS

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

4 Conclusion

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

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

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

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

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

1 Optimisation du couplage SFC/IT-ToF

1.1 Paramètres communs ESI et APCI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Paramètres spécifique à l'APCI

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

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

1.2.1 Méthodologie d'optimisation

- Choix des expériences :

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

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

- Choix des critères et de la fonction de réponse

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

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

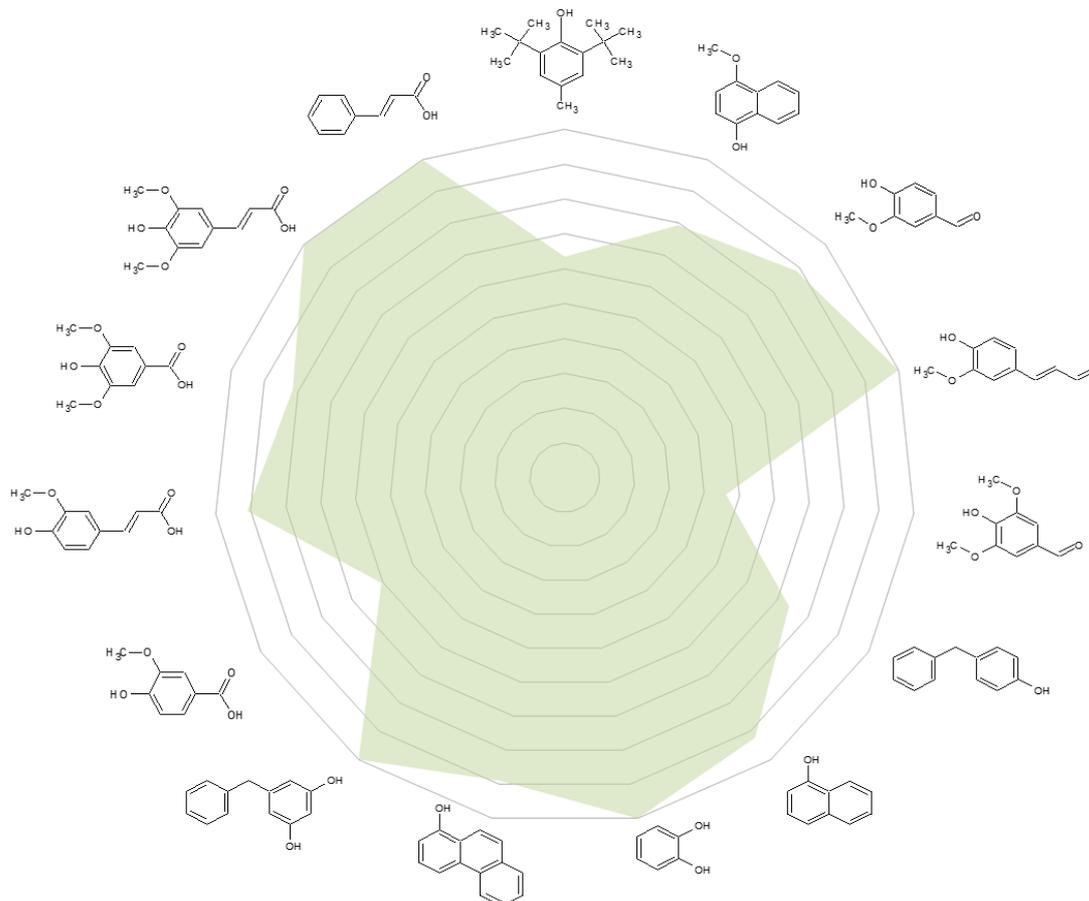


Figure IV-8 : Radar plot du rapport signal/bruit normalisé pour les molécules modèles détectées en APCI négatif avec 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (35/65, v/v) pour le make-up #2

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

1.2.2 Résultats en APCI (-)

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

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

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

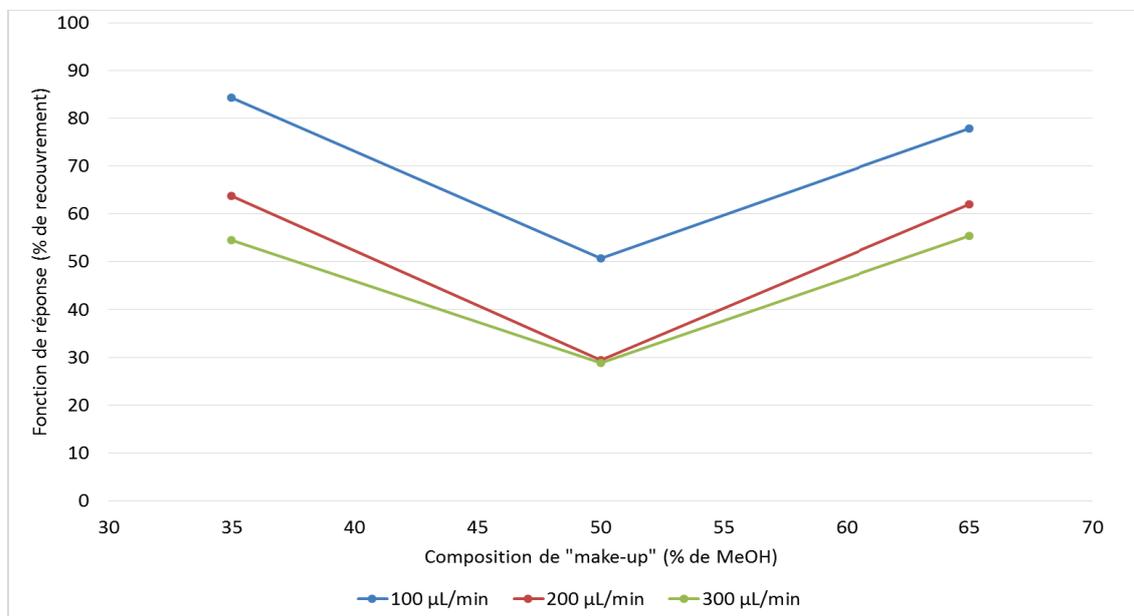


Figure IV-9 : Pourcentage de recouvrement du radar plot en fonction de la composition du solvant de make-up MeOH/H₂O et du débit

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

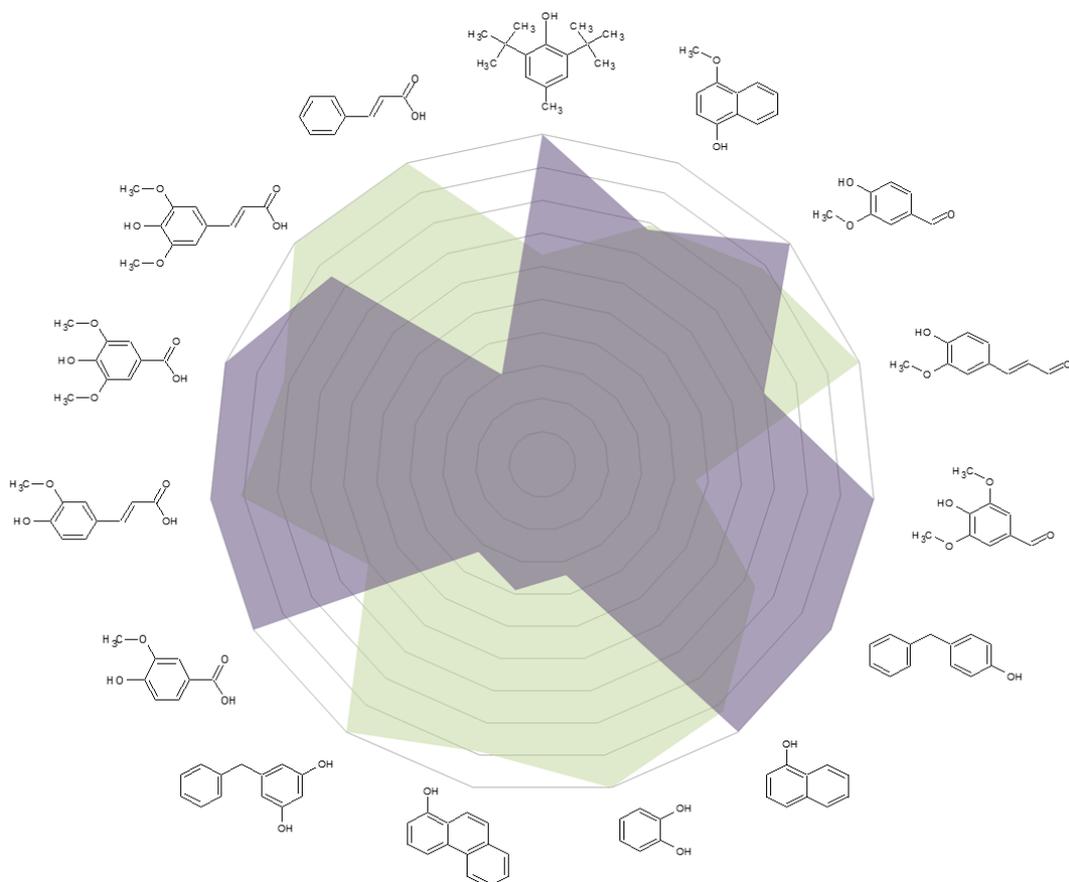


Figure IV-10 : Radar plot du ratio signal/bruit pour les molécules modèles détectées en APCI négatif avec 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de MeOH/H₂O (35/65, v/v) (en vert) (65/35, v/v) (en violet) pour le make-up #2

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

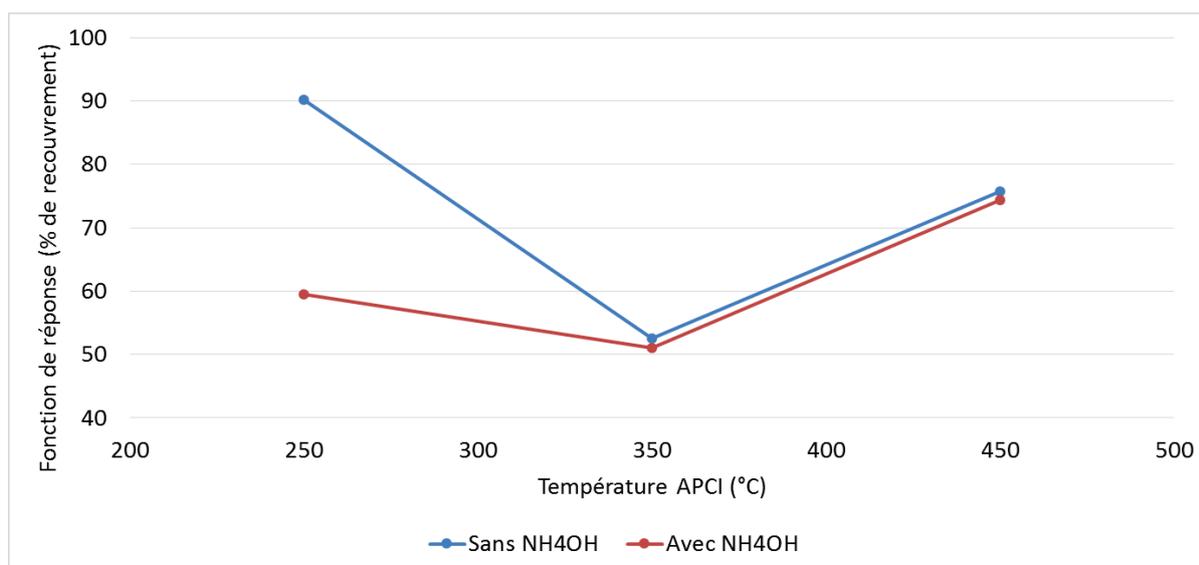


Figure IV-11 : Pourcentage de recouvrement du radar plot en fonction de la température du four APCI (250°C, 350°C, 450°C) avec (en rouge) ou sans (en bleu) additif (NH_4OH) en SFC-APCI (-)/MS

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

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

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

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

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

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

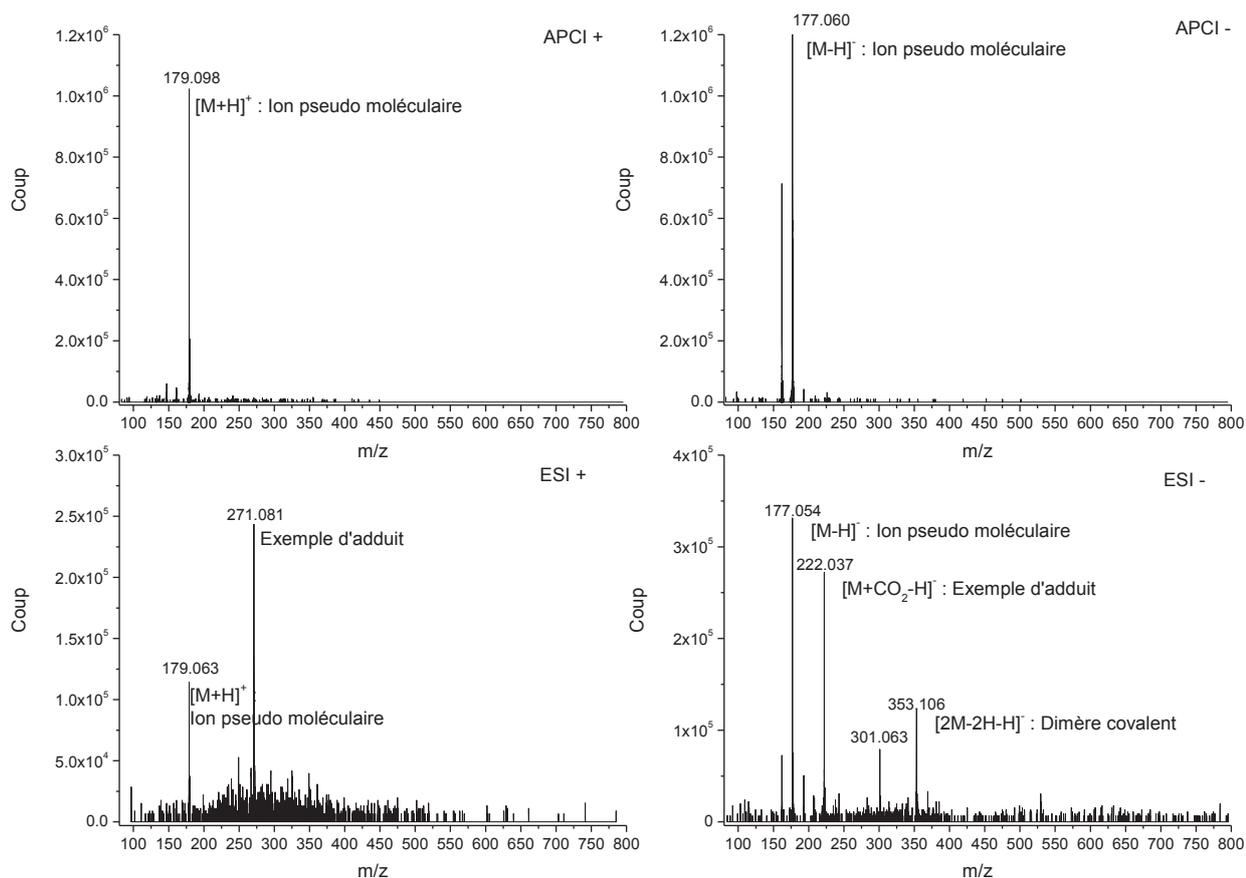


Figure IV-12 : Spectres de masses du Coniféraldéhyde obtenus dans les 4 modes d'ionisations en SFC-UV/MS

2 Méthodologie d'identification

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

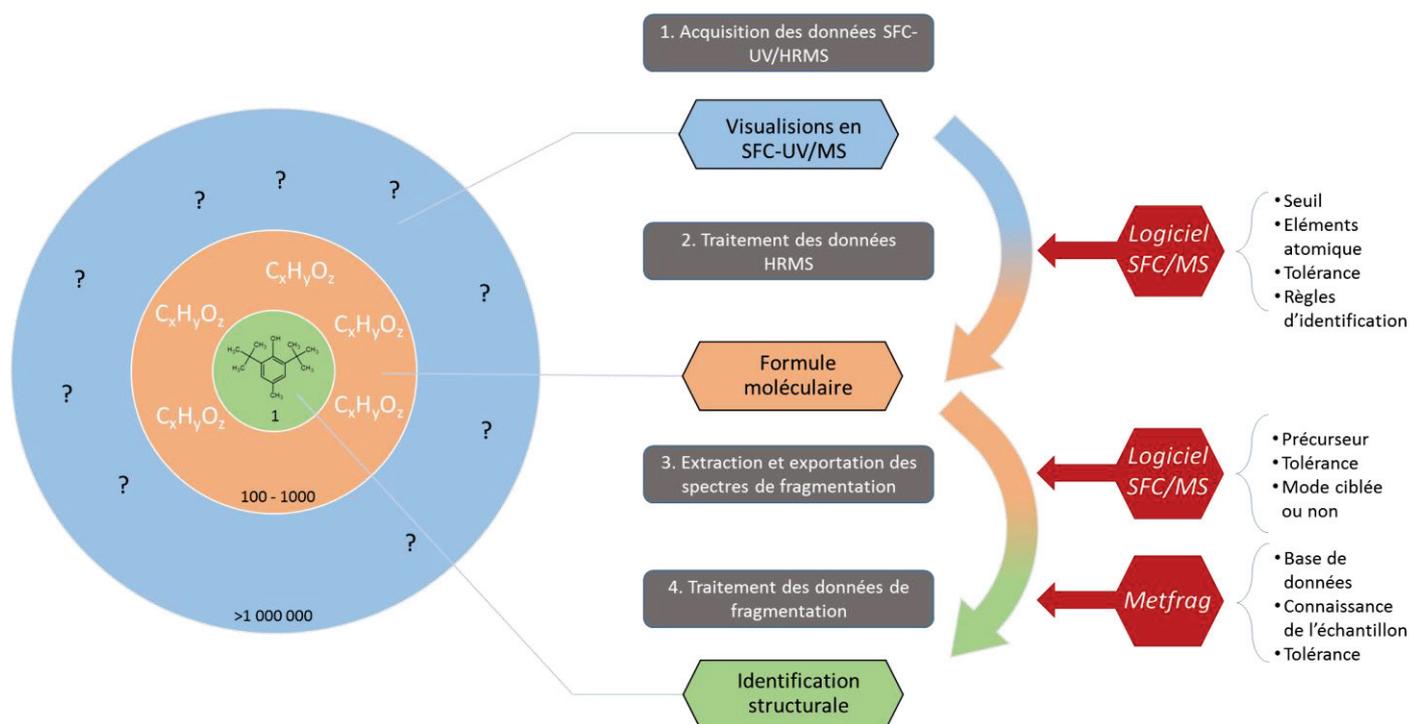


Figure IV-13 : Méthodologie appliquée pour le retraitement des données SFC/HRMS²

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

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

2.2 Traitement des données SFC/HRMS

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

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

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

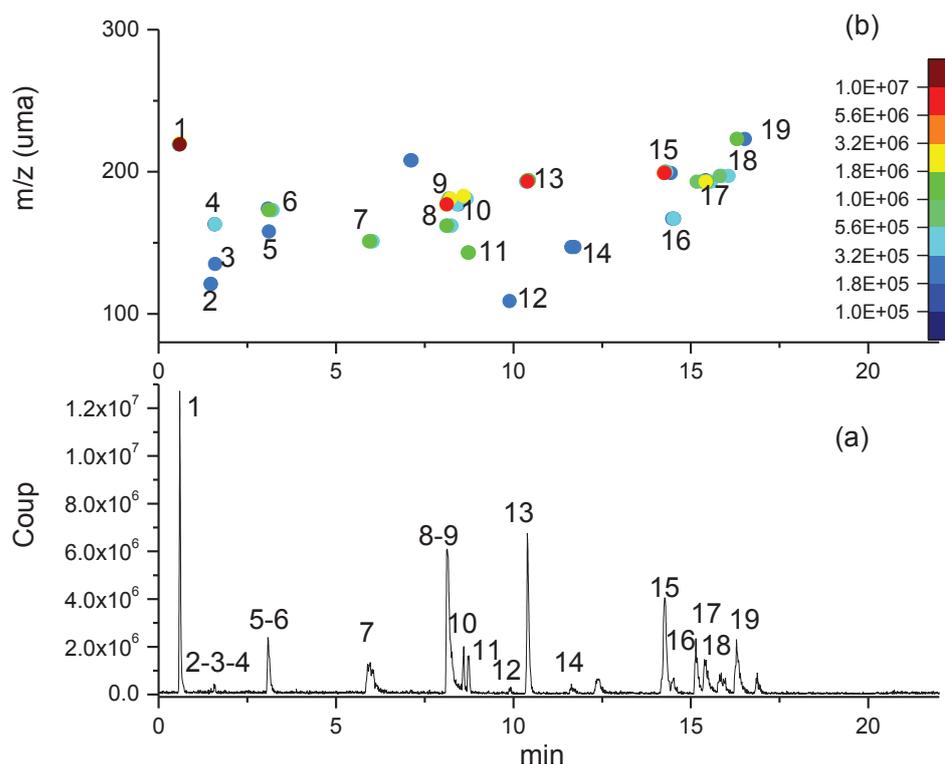


Figure IV-14 : Chromatogramme BPC (a) et mass map (b) du mélange de molécules modèles détectées en SFC-APCI(-)-IT-TOF/MS.

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

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

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

10	4-Benzylphénol	Hydroxy diphenyl methane	8.62	183.0841	C ₁₃ H ₁₂ O ₁	13.99
11	Naphtalén-1-ol	Naphtol	8.76	143.0516	C ₁₀ H ₈ O ₁	14.41
12	Benzène-1,2-diol	Catechol	9.90	109.0300	C ₆ H ₆ O ₂	-2.77
13	9-Phénanthrénol	Phénantrol	10.44	193.0691	C ₁₄ H ₁₀ O ₁	17.67
14	(2E)-3-Phénylprop-2-énoïque acide	Trans-cinnamique acide	11.62	147.0435	C ₉ H ₈ O ₂	-11.24
15	4-benzylbenzène-1,3-diol	Benzyl resorcinol	14.30	199.0779	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	-9.81
16	4-Hydroxy-3-méthoxybenzoïque acide	Vanillique acide	14.55	167.0380	C ₈ H ₈ O ₄	-14.86
17	(E)-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)prop-2-énoïque acide	Ferulique acide	15.42	193.0539	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-8.97
18	4-Hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque acide	Syringique acide	15.88	197.0459	C ₉ H ₁₀ O ₅	1.79
19	3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)prop-2-énoïque acide	Sinapique acide	16.28	223.0656	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	15.25

2.3 Traitement des données de fragmentation

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

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

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

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

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

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

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

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

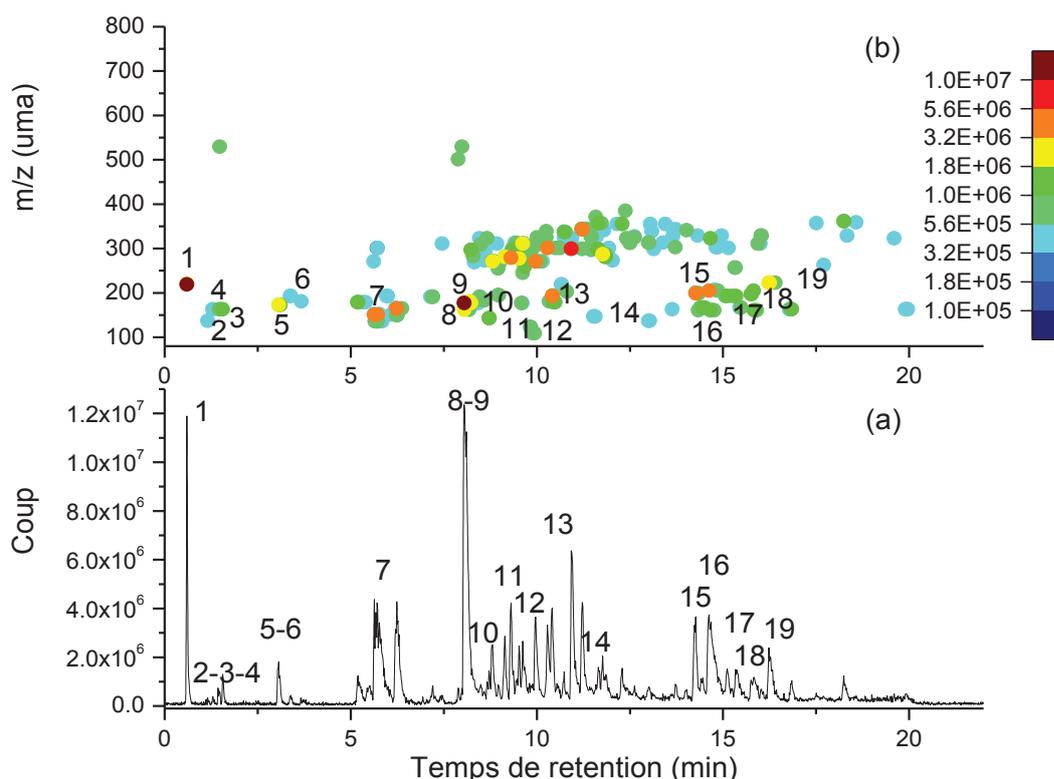


Figure IV-15 : Chromatogramme (a) et mass map (b) en SFC-APCI (-)IT-ToF/MS de l'huile de pyrolyse rapide dopée avec le mélange de molécules modèles (200 mg/kg par composé)

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

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

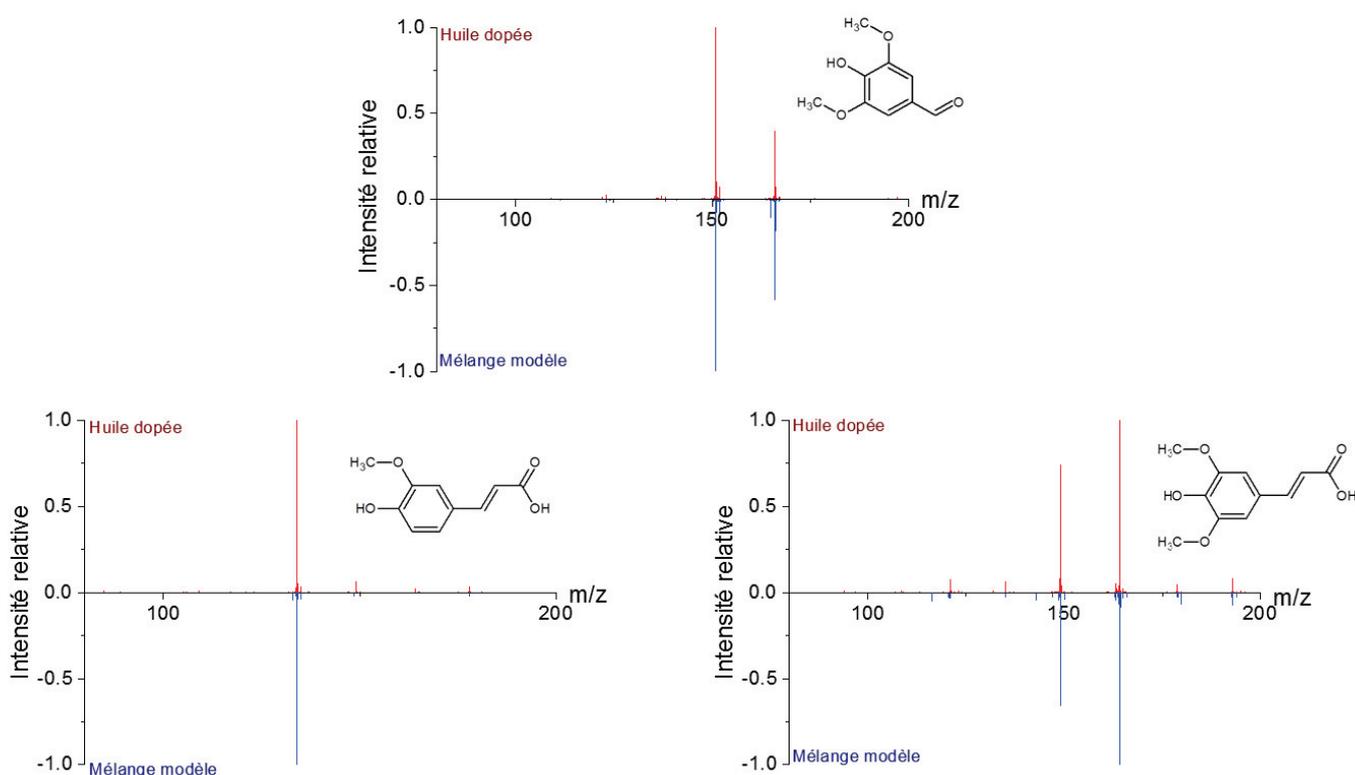


Figure IV-16 : Comparaison des spectres de fragmentations de trois composés différents pics dans le mélange modèle (en bleu) et dopés dans l'huile (en rouge)

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

3.1 « Mass map » de l'huile de pyrolyse

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

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

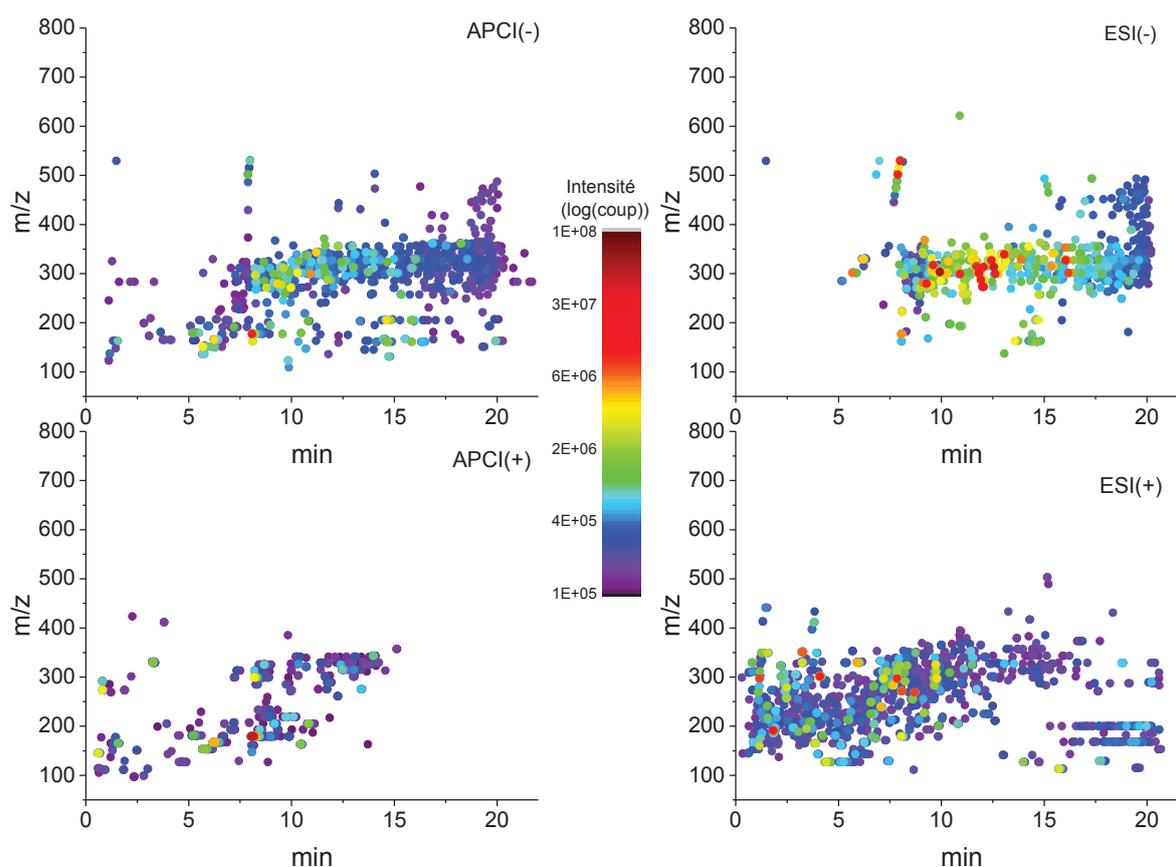


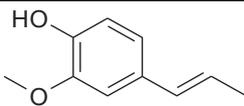
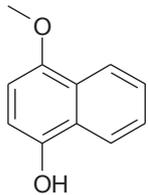
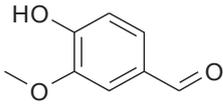
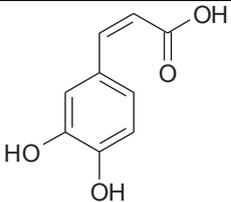
Figure IV-17 : Mass map d'une huile de pyrolyse rapide en SFC/HRMS

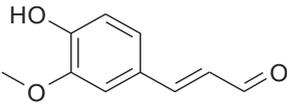
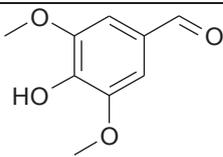
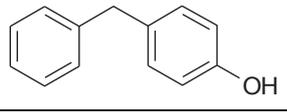
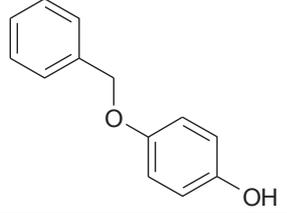
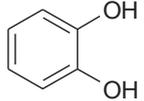
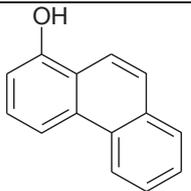
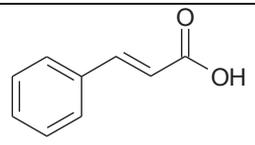
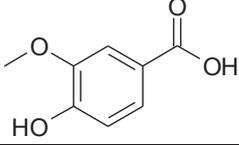
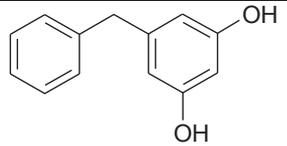
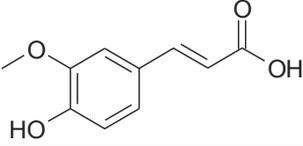
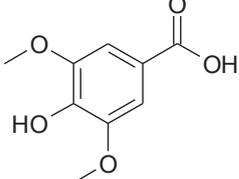
3.2 Recherche de molécules modèles dans l'huile de pyrolyse

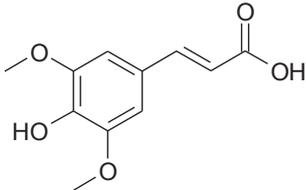
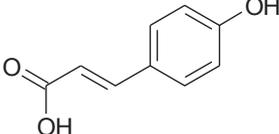
L'objectif est de vérifier à l'aide des informations acquises via l'injection des molécules modèles si elles font partie de la matrice bio huile ou non. Pour cela, les masses précises des différentes molécules modèles ont été recherchées dans les données acquises avec l'huile non dopée. En cas de correspondance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

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

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

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

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

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

3.3 Méthodologie d'identification appliquée à l'huile

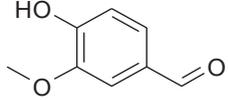
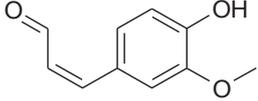
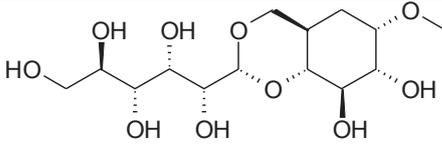
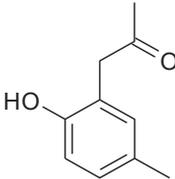
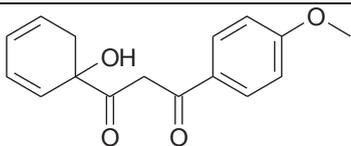
A partir d'analyses non ciblées de l'huile de pyrolyse rapide, la méthodologie développée avec les molécules modèles (traitement des spectres MS² à l'aide de MetFrag) a été testée sur des pics intenses en APCI négatif. Comme pour les molécules modèles, une extraction des spectres MS² correspondant aux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

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

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

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

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

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

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

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

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

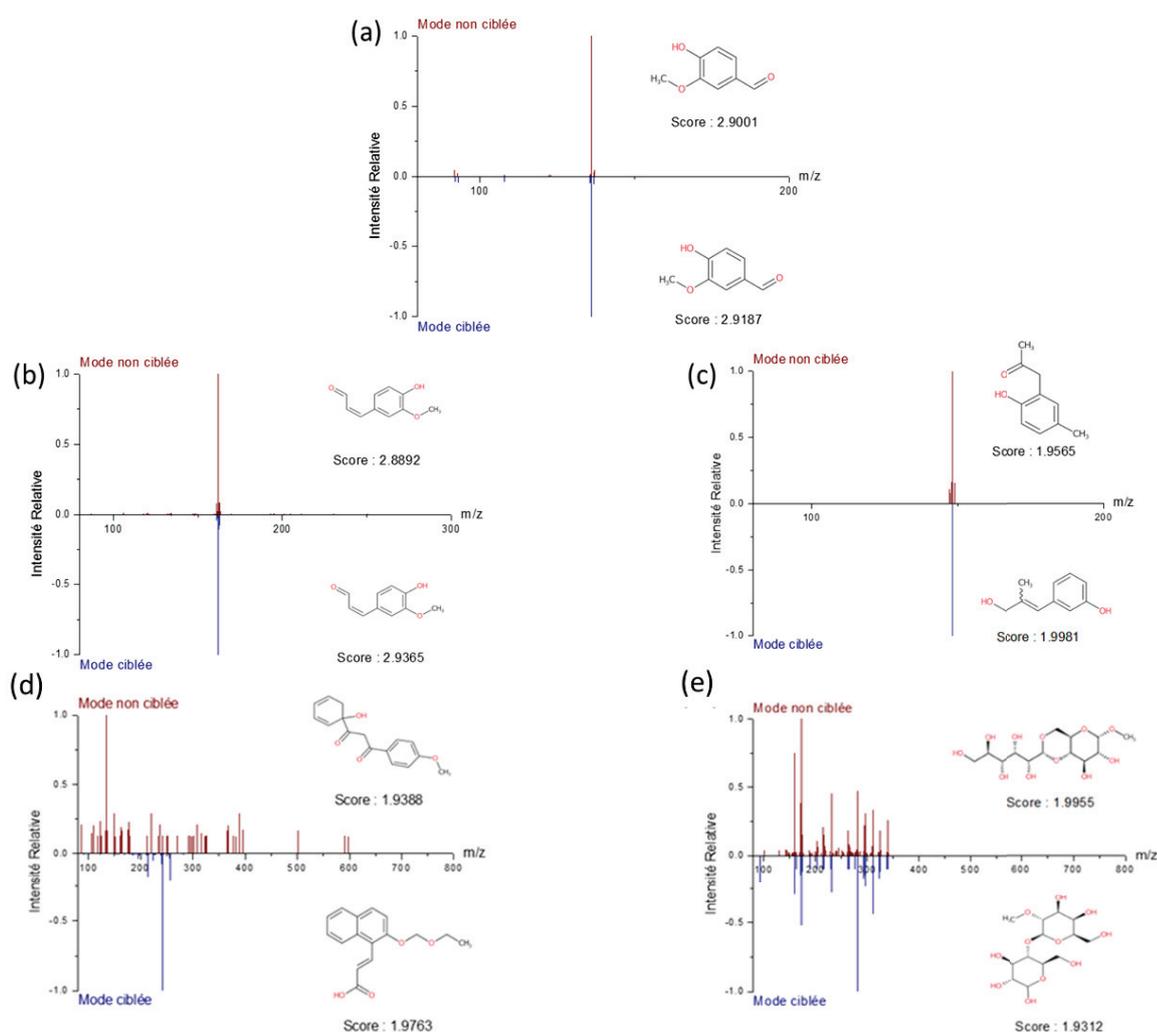


Figure IV-18 : Comparaison de spectres de fragmentation en mode ciblé (en bleu) et non ciblé (en rouge). (a) $t_r = 5.82$ min, (b) $t_r = 8.06$ min, (c) $t_r = 1.58$ min, (d) $t_r = 9.96$ min et (e) $t_r = 12.28$ min

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

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

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

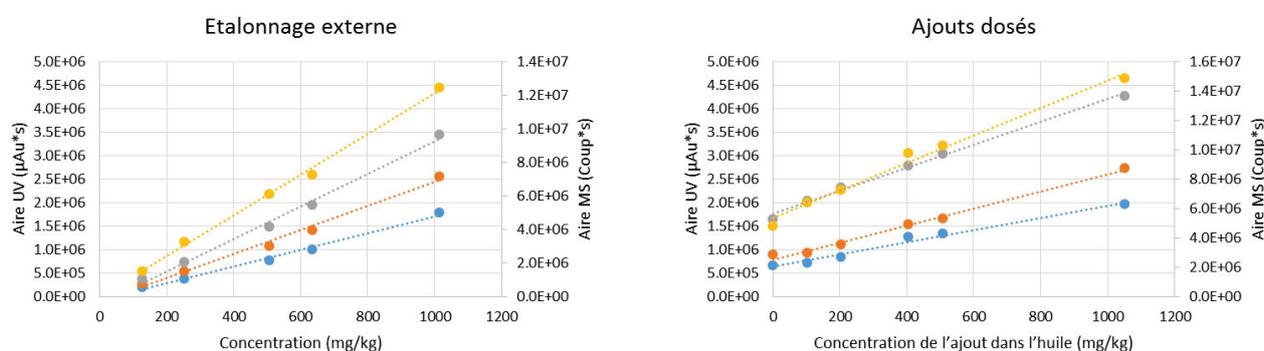


Figure IV-19 : Courbes d'étalonnage de la Vanilline en UV à 210 nm (en gris), à 254 nm (en orange), à 280 nm (en bleu) et en MS (APCI (-)) pour l'ion 151.04 (en jaune) par étalonnage externe (à gauche) et ajouts dosés (à droite)

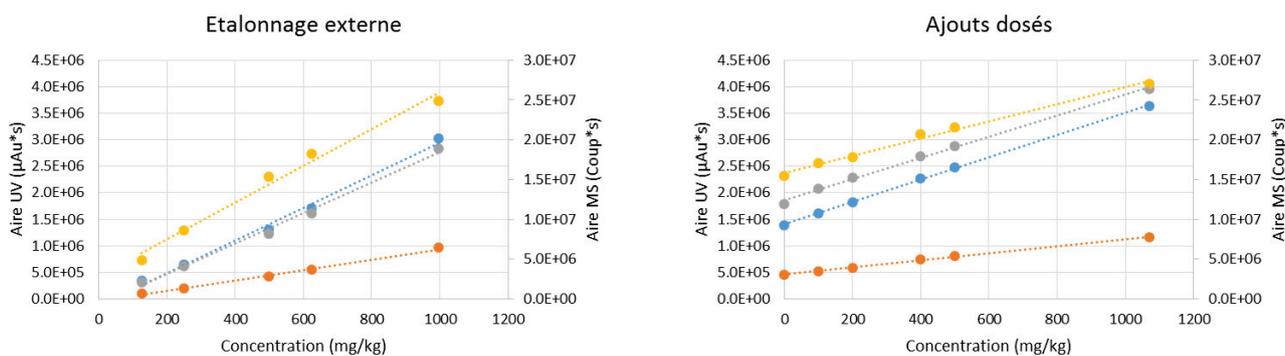


Figure IV-20 : Courbes d'étalonnage du Coniféraldéhyde en UV à 210 nm (en gris), à 254 nm (en orange), à 280 nm (en bleu) et en MS (APCI (-)) pour l'ion 177.06 (en jaune)

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

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

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

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

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

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

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

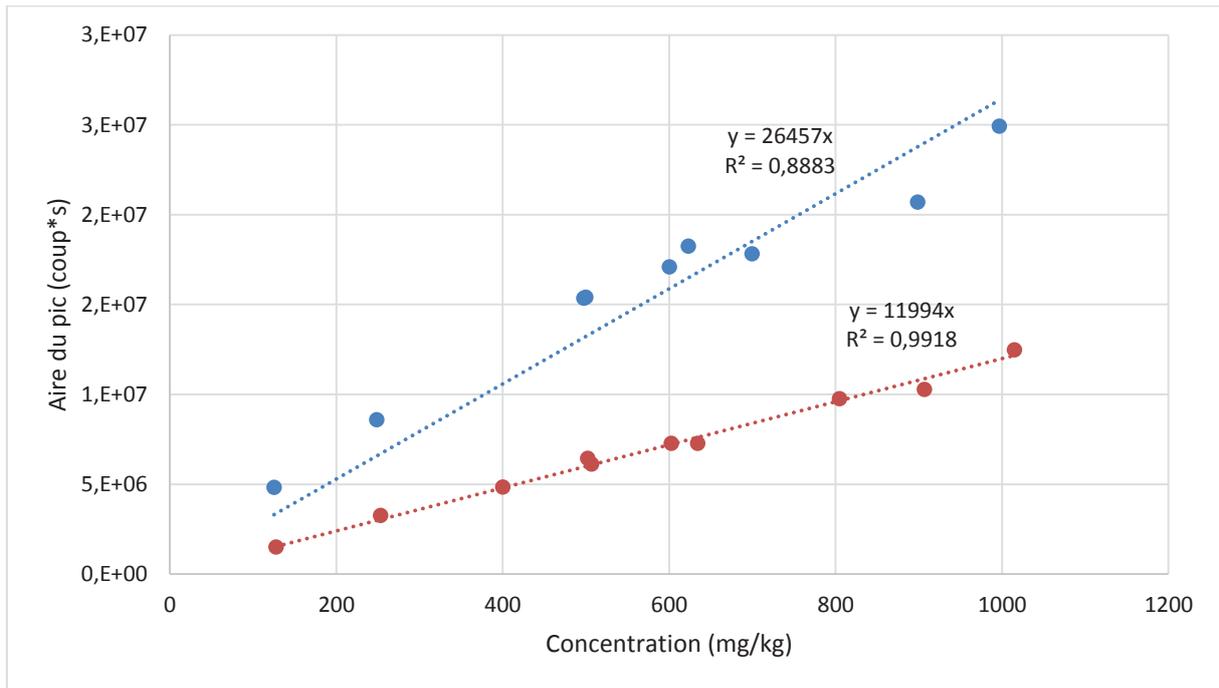


Figure IV-21 : Droite d'étalonnage de la vanilline(en rouge) et du coniféraldéhyde (en bleu) par étalonnage externe et ajout dosé.

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

Conclusion

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

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

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

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

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

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

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

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