

Développement de la méthode SFC-UV

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

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

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

Doi :10.1016/j.chroma.2017.06.003

Sommaire du chapitre

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

Liste des figures et tableaux

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

Introduction

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

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

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

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

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

1 Echantillons et appareillage

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

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

2 Méthodologie d'optimisation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

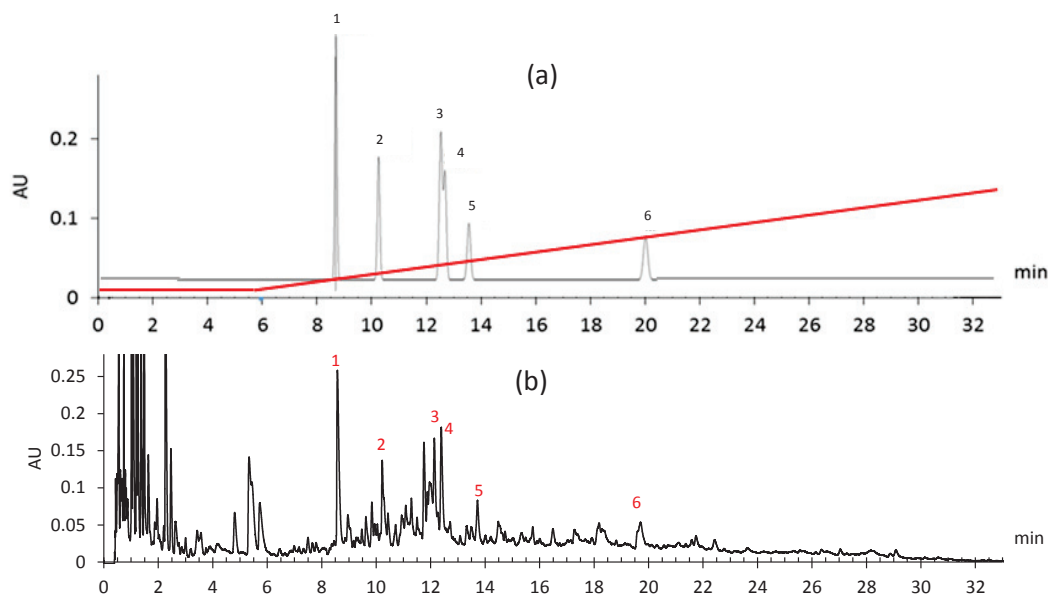


Figure III-1 : Comparaison de chromatogrammes (a) simulé et (b) expérimental d'une séparation d'huile de pyrolyse rapide avec une pente de gradient $s = 0.005$
(Phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, Co-solvant : ACN/H₂O (98/2), Température : 30°C, BPR : 150 bars)

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

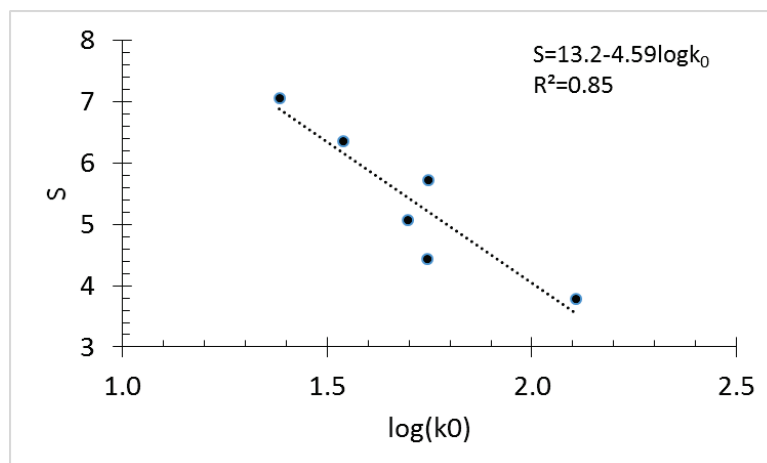


Figure III-2 : Corrélation entre les paramètres du modèle LSS (cf. Eq.6)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

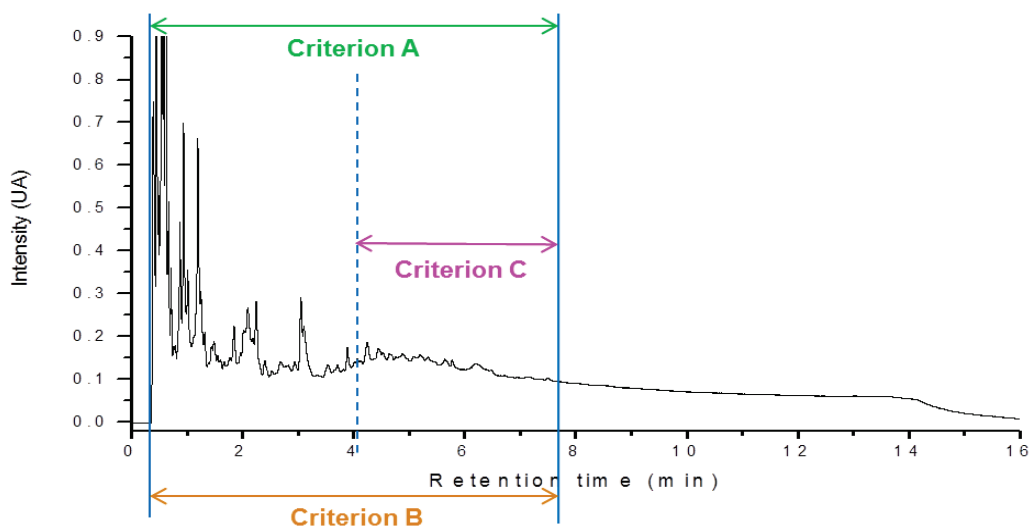


Figure III-3 : Exemple d'exploitation d'un chromatogramme avec les critères A, B et C

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

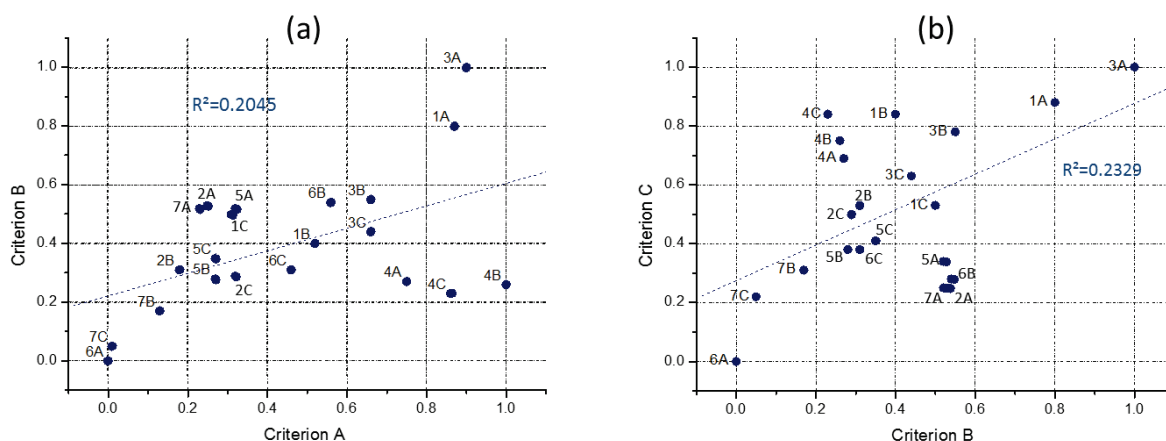


Figure III-4 : Corrélation des critères (a) A et B et (b) B et C pour les systèmes chromatographiques identifiés par le numéro de la colonne (cf. Tableau III-1) et la lettre du co-solvant (A : ACN, B : ACN/MeOH, C : MeOH)

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

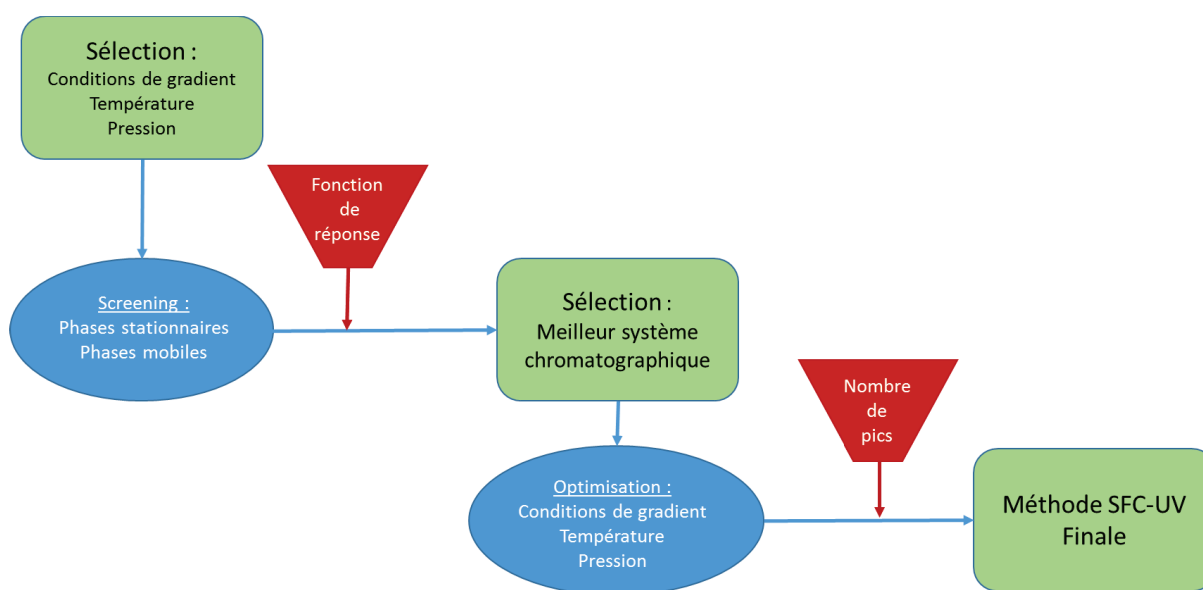


Figure III-5 : Méthodologie employée pour l'optimisation des paramètres clés en SFC-UV

2.1 Screening des phases stationnaires et mobiles

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

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

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

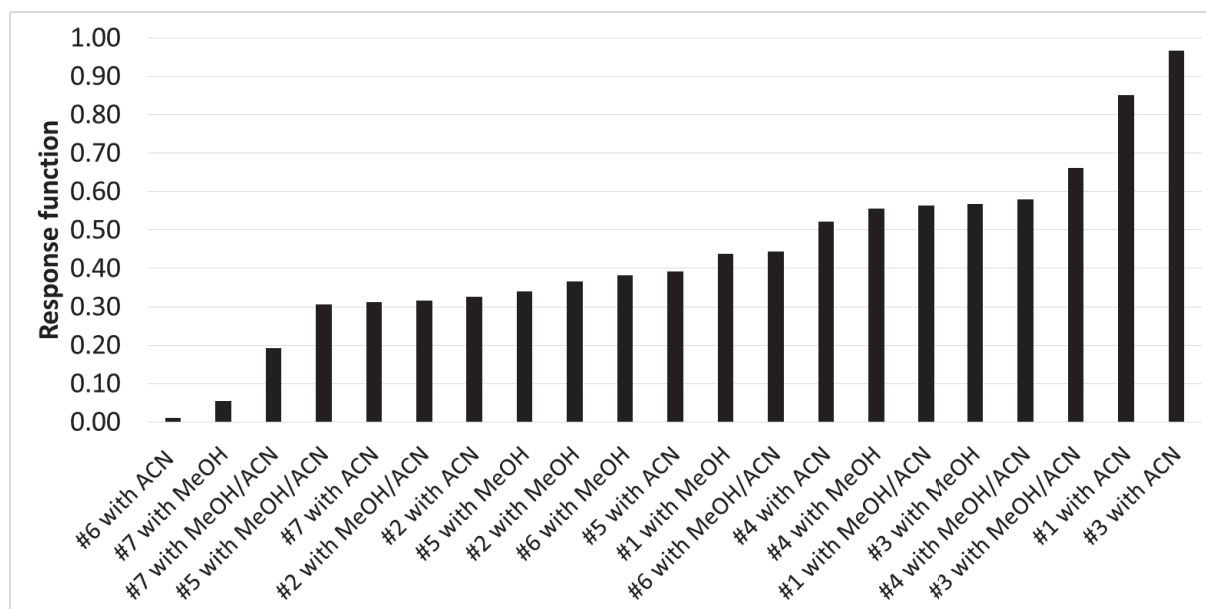


Figure III-6 : Fonction de réponse pour les différents systèmes chromatographiques testés. Voir Tableau III-1 pour la référence des phases stationnaires.

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

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

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

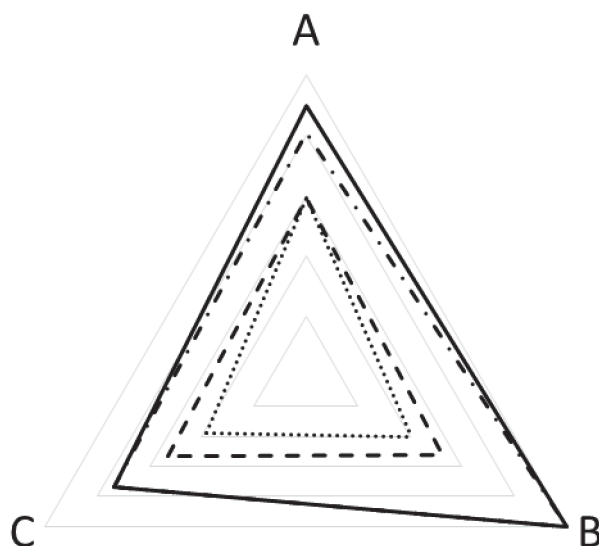


Figure III-7 : Evolution des critères A, B et C pour la colonne Acquity BEH-2EP en fonction du co-solvant. acétonitrile (— . . .), méthanol (.....), acétonitrile / méthanol (50/50; v/v) (— - -), acétonitrile/eau (98/2; v/v) (——)

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

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

2.2 Optimisation de la composition de la phase mobile

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

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

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

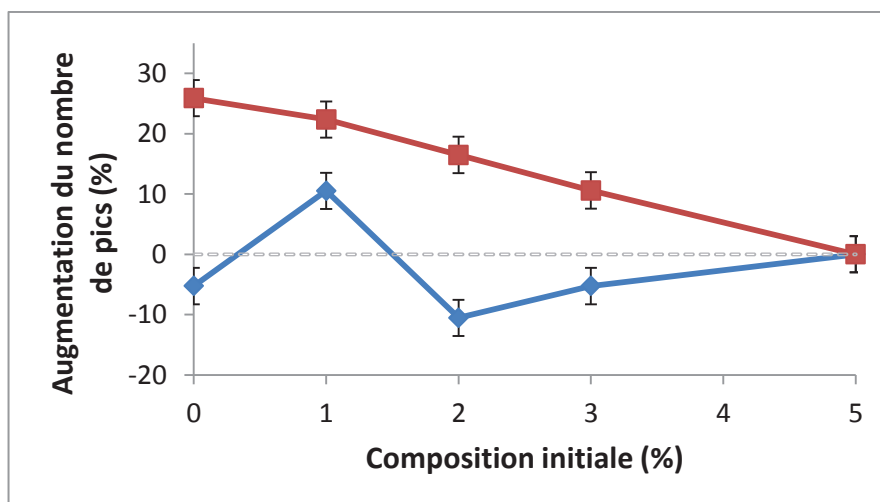


Figure III-8 : Augmentation du nombre de pics détecté à 210 nm en fonction de la composition initiale de la phase mobile. (Référence 5 %). Partie isocratique (◆) et partie gradient (■)

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

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

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

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

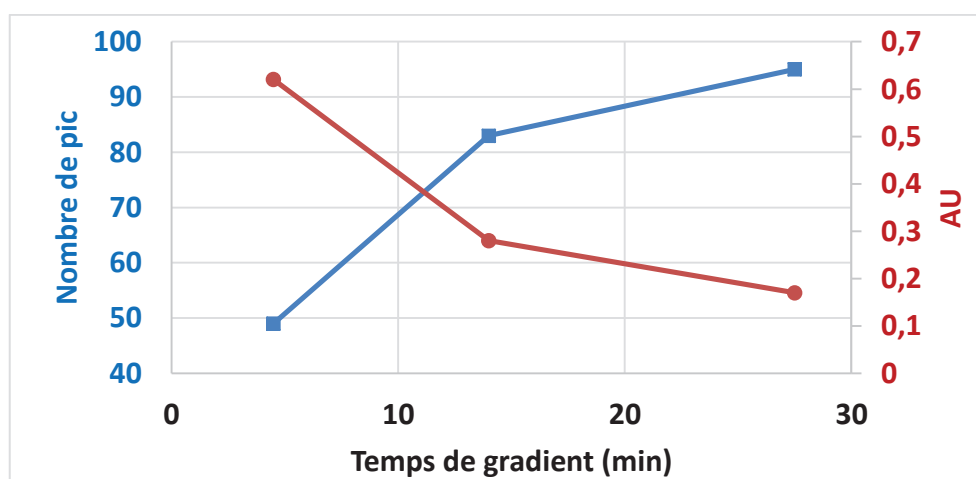


Figure III-9 : Nombre de pics (en bleu) et intensité d'un pic de référence (en rouge) observé à 210 nm en fonction du temps de gradient. Conditions: Acquity BEH 2-EP (3x100 mm; 1.7 μm), A: CO_2 ; B: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (98/2 v/v); de 99:1 (A:B) à 60:40 (A:B); Température: 30°C ; BPR: 150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

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

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

2.3 Optimisation de la température et de la BPR

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

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

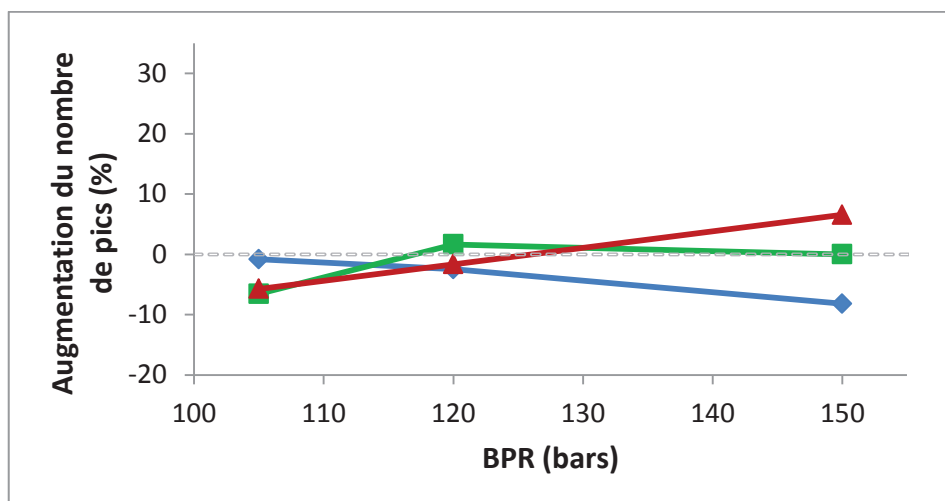


Figure III-10 : Variation du nombre de pics en fonction de la BPR et de la température à 20°C (◆), 30°C (■) et 60°C (▲) (référence 30 °C et 150 bars)

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

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

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

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

2.4 Méthode finale en SFC-UV

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

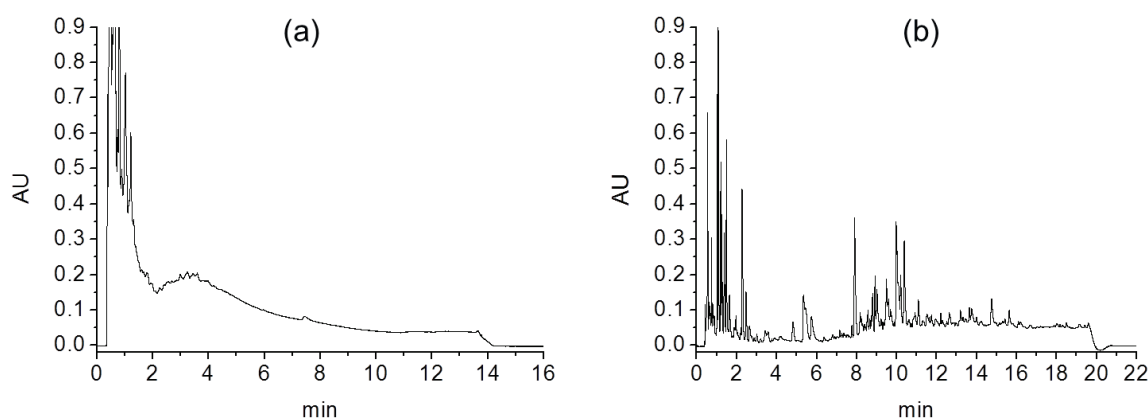


Figure III-11 : Chromatogrammes SFC-UV d'une huile de pyrolyse rapide sans optimisation (a) (phase stationnaire : Acquity Fluorophenyl, co-solvant : MeOH, température: 30°C, BPR : 150 bars) et (b) après optimisation (phase stationnaire : Acquity BEH 2-EP, co-solvant : ACN/H₂O (98/2), température: 30°C,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

3 Application à d'autres échantillons

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

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

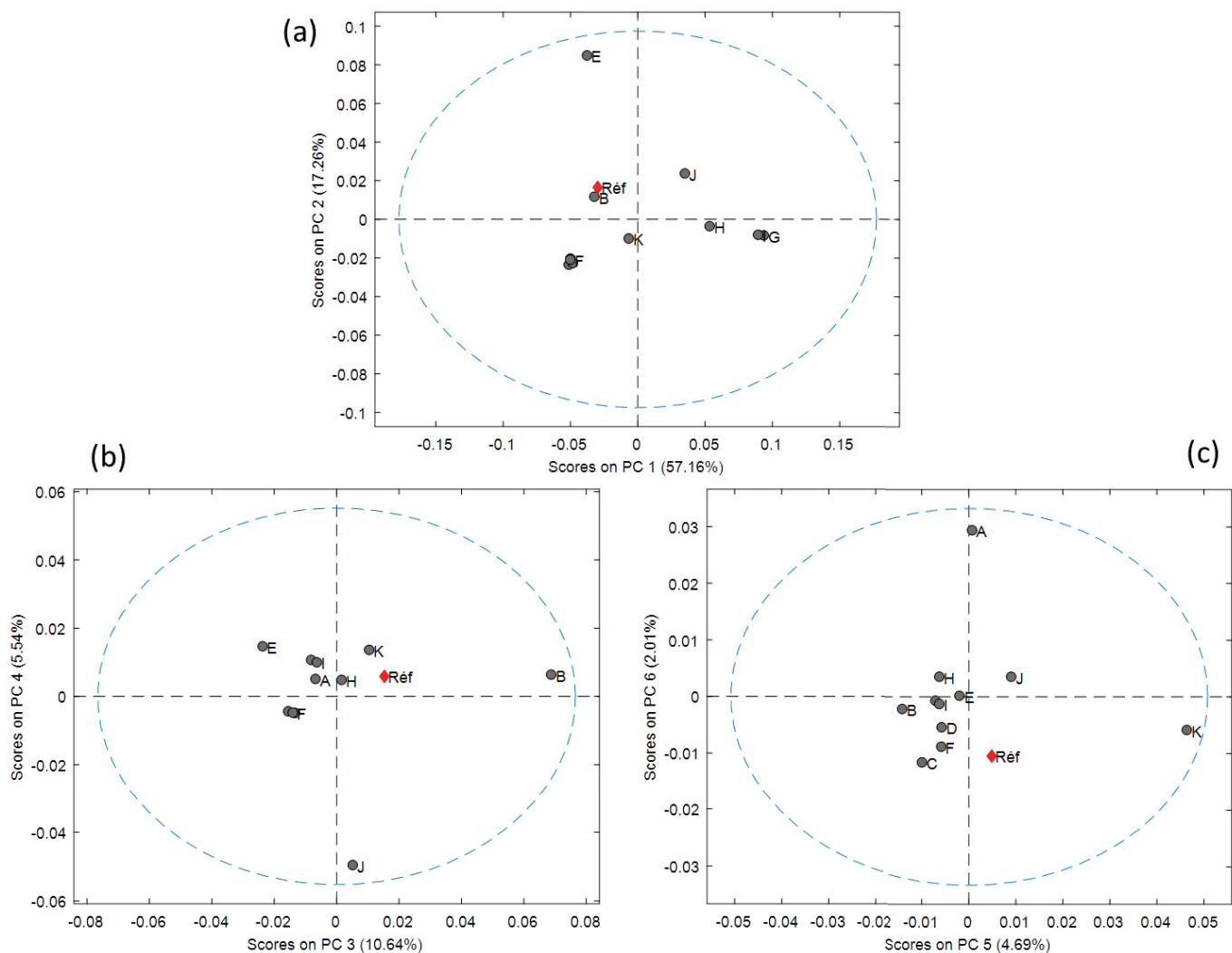


Figure III-12 : Représentation de 11 échantillons (Huiles A-K) et l'huile de référence (Réf en rouge) sur 3 plans bidimensionnels : CP1-CP2 (a), CP3-CP4 (b) et CP5-CP6 (c)

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

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

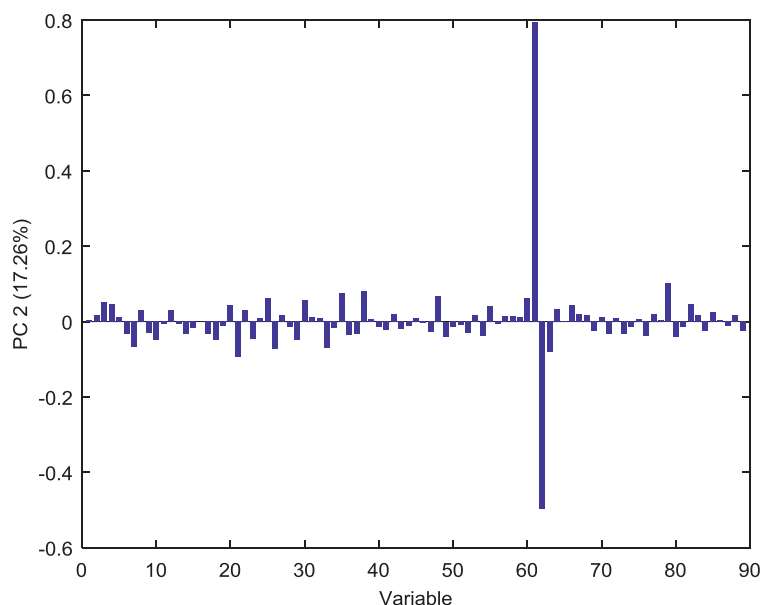


Figure III-13 : « Loading » de la composante principale 2.

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

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

4 Simplification de l'échantillon

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

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

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

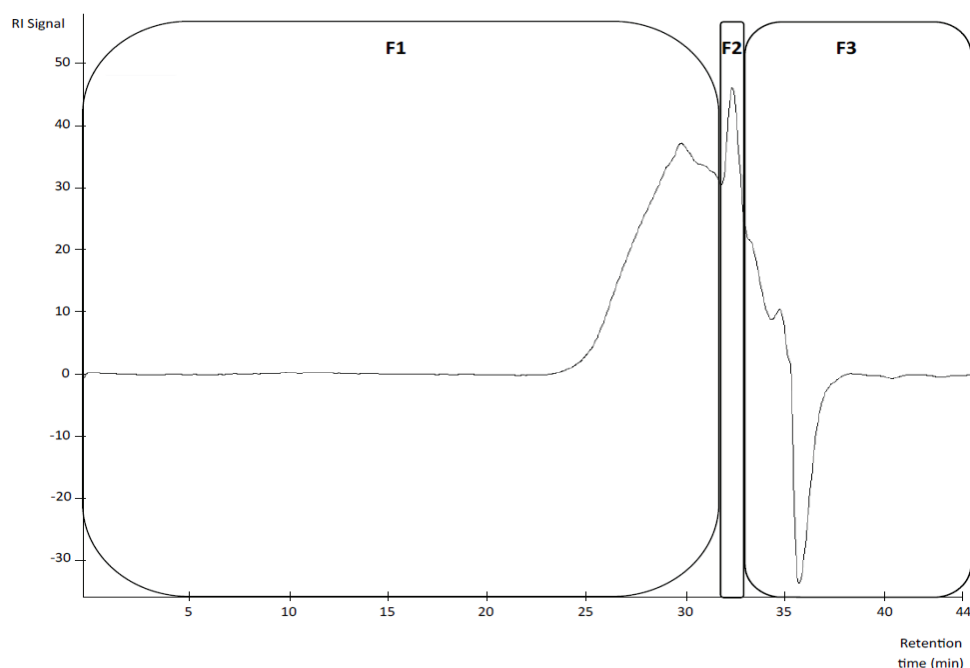


Figure III-14 : Chromatogramme SEC-RID de l'huile de pyrolyse rapide (500 μ L injecté à 200 g/L ; trois colonne en série 25x300 mm, granulométrie 10 μ m, 50 ; débit 8mL/min ; T° 30°C)

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

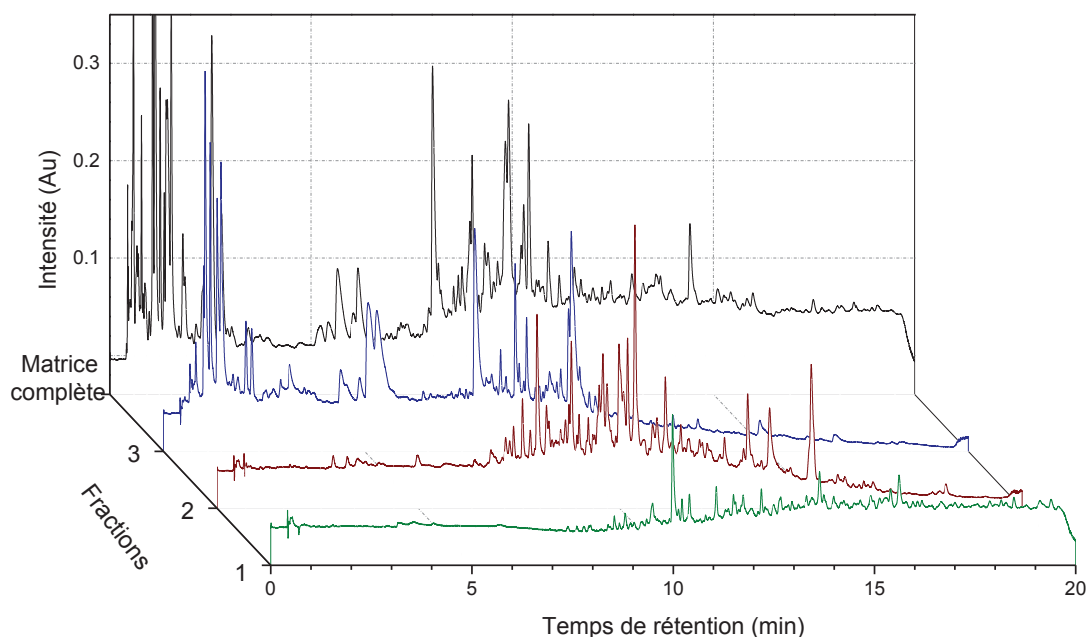


Figure III-15 : Chromatogrammes des fractions obtenues par SEC et analysées par SFC-UV

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

5 Compréhension des mécanismes de rétention

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

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

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

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

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

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

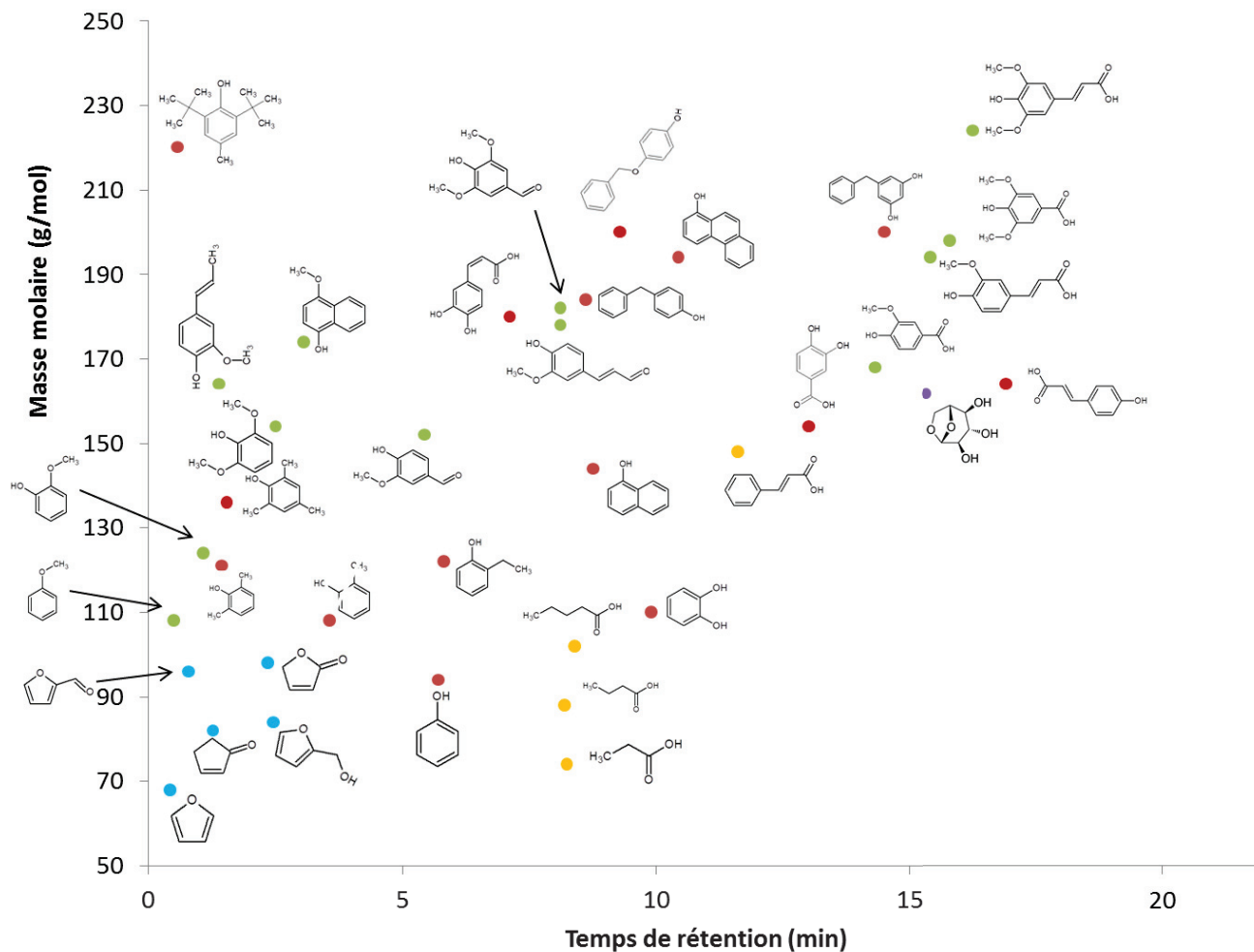


Figure III-16 : « Mass map » des molécules modèles classées par famille : furanique (en bleu), phénolique (en rouge), méthoxyphénolique (en vert), acide carboxylique (en jaune) et sucre (en violet)

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

Conclusion

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

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

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

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

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

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

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

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