

La chromatographie Supercritique (SFC)

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

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

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

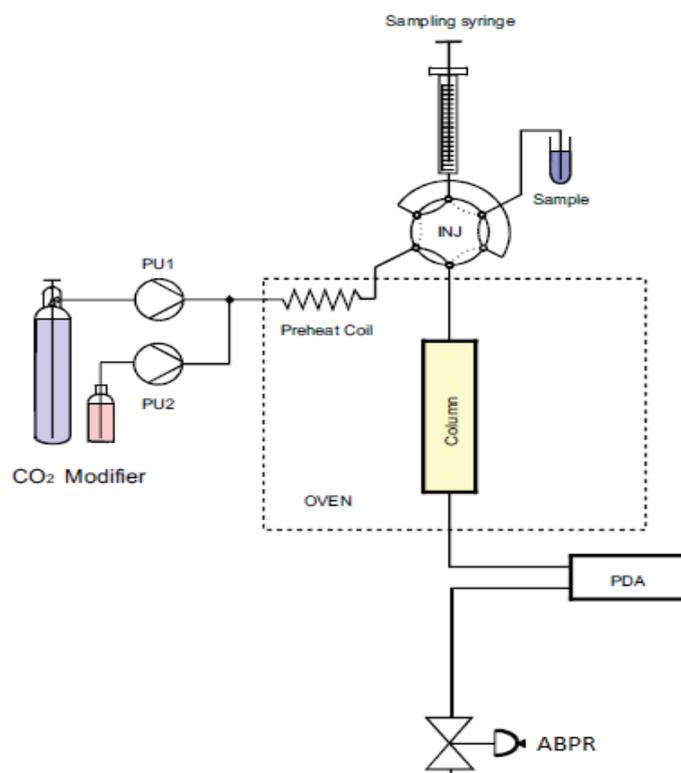


Figure I-14 : Schéma d'un appareil SFC « type LC » [49]

1 Les phases mobiles utilisées en SFC

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

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

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

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

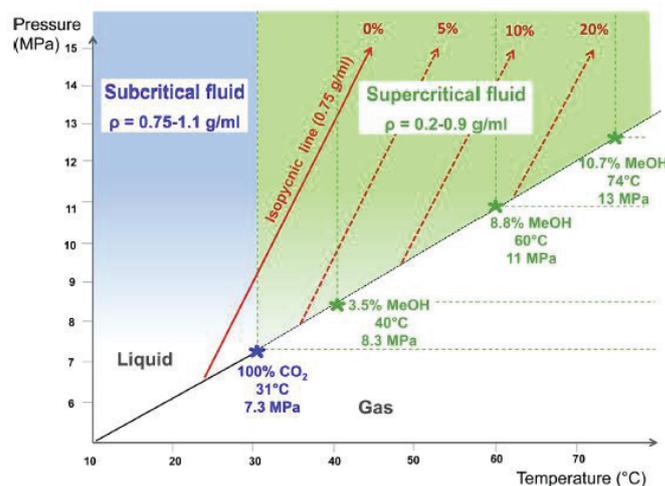


Figure I-15 : Diagramme de phases pour CO_2 pur (en bleu) et avec ajout de MeOH (en vert) [51]

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

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

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

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

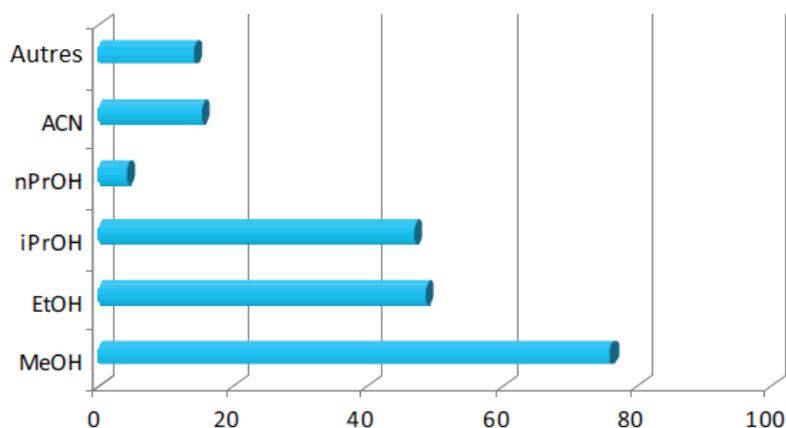


Figure I-16 : Proportion d'articles de recherche citant l'utilisation d'un co-solvant (réalisé en 2014) [55].

2 Les phases stationnaires utilisées en SFC

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

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

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

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

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

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

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

Le terme k représente le facteur de rétention

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

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

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

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

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

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

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

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

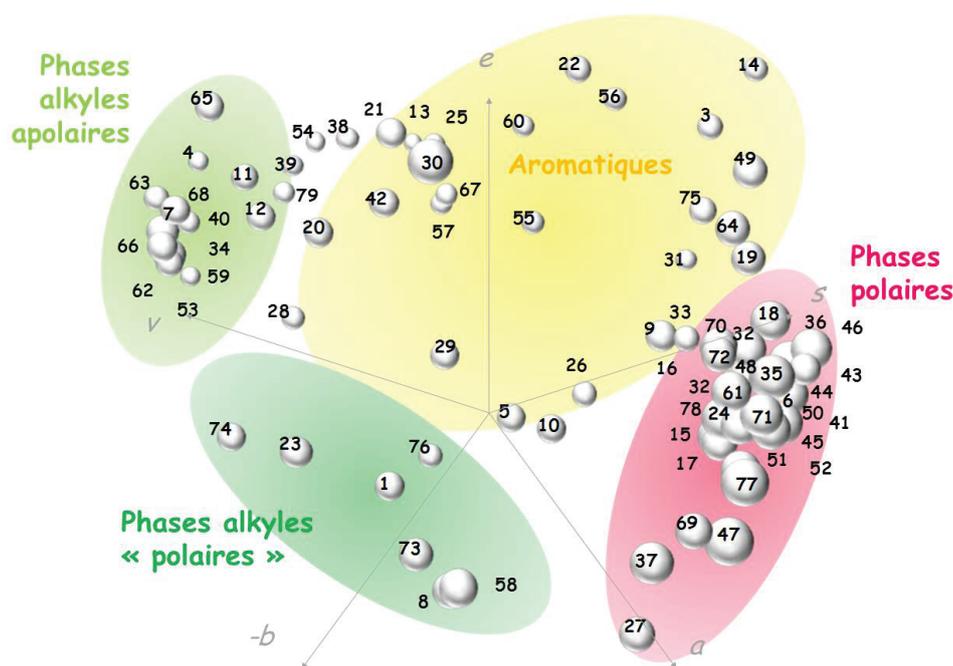


Figure I-17 : Classification de phases stationnaires par la méthode LSER. (*e* : interaction n et π ; *s* : dipôle-dipôle ; *a* : acide ; *b* : basique ; *v* : effets de cavité) [66]

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

3 L'optimisation de méthode en SFC

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

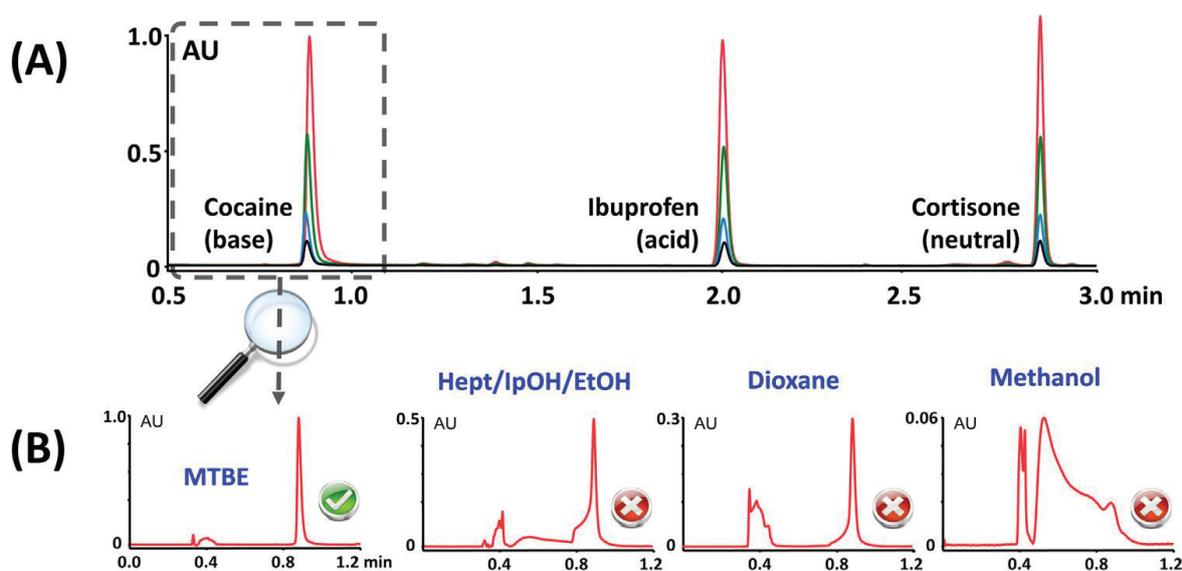


Figure I-18 : Effet du volume d'injection (A) avec 1 (noir), 2 (bleu), 5 (vert) et 10 (rouge) μL injecté de cocaïne, ibuprofène et cortisone à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chacun dans MTBE et du solvant de dilution (B) lors de l'injection de 10 μL de cocaïne à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans 4 solvants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

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

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

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

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

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

4 Les systèmes de détection envisageables

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

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

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

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

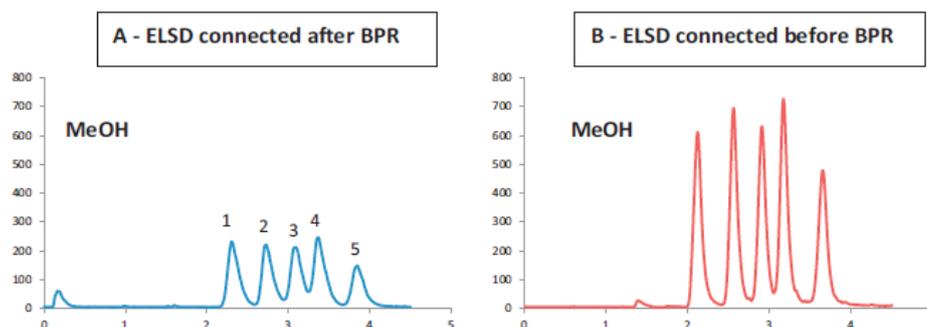


Figure I-19: Effets de l'emplacement du détecteur pour un couplage SFC-DEDL. Colonne Synergie Polar RP, débit : 3ml/min, BPR : 150 bars, T° : 30°C, CO_2 /co-solvant : 95/5, Mélange de plastifiants [80]

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

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

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

4.1 La détection UV

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

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

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

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

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

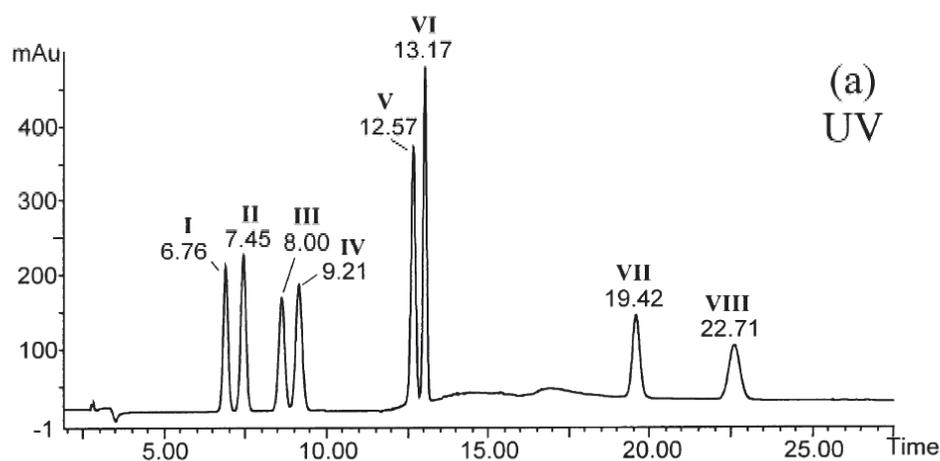


Figure I-20 : Chromatogramme UV (220 nm) d'un mélange de 4 composés antimycosiques (miconazole, éconazole, sulconazole et cétoconazoles). Colonne Chiralpak AD (25 x 0.46 cm, 5 μ m), T° : 35°C, P : 18 MPa, débit : 2.5 ml/min, Co-solvant : EtOH [82]

4.2 La détection par spectrométrie de masse

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

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

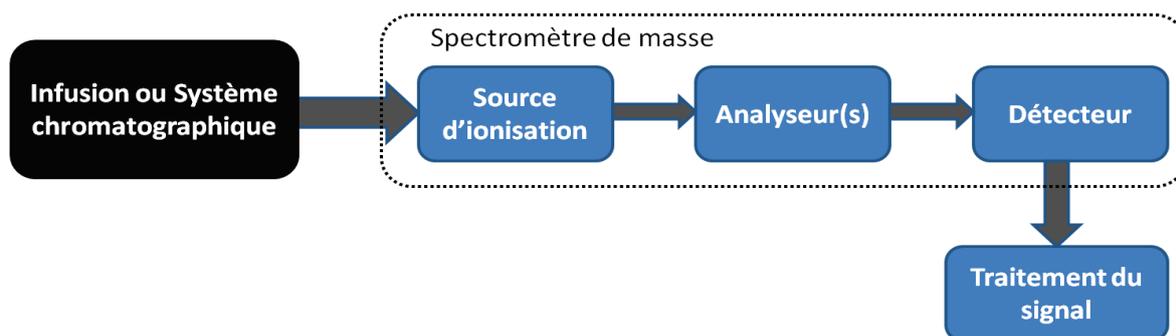


Figure I-21 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

5 Conclusion

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

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

Couplage SFC/MS

1 Spécificité du couplage SFC/MS

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

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

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

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

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

avec T = température et θ = constante.

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

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

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

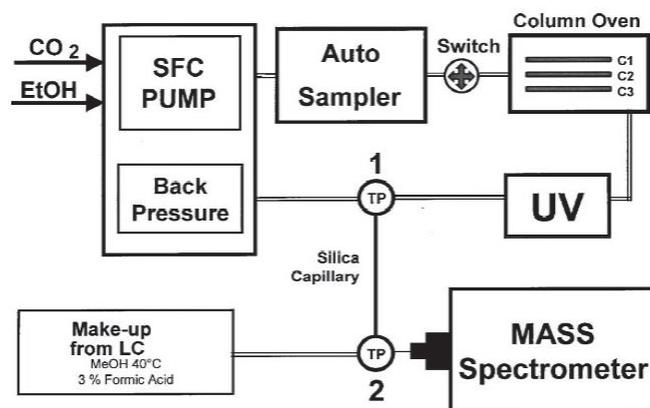


Figure I-22 : Schéma d'un appareillage SFC/MS [82].

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

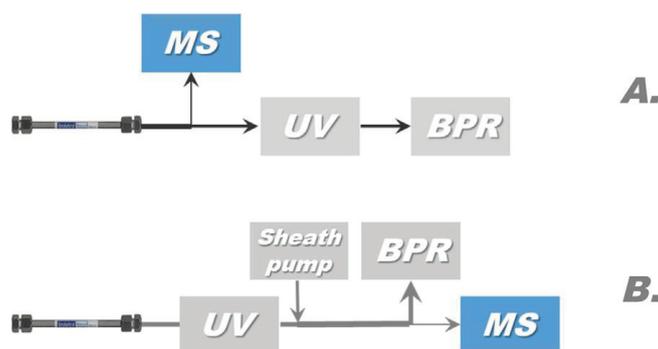


Figure I-23 : Schéma des configurations possibles pour le couplage SFC / Masse [97]

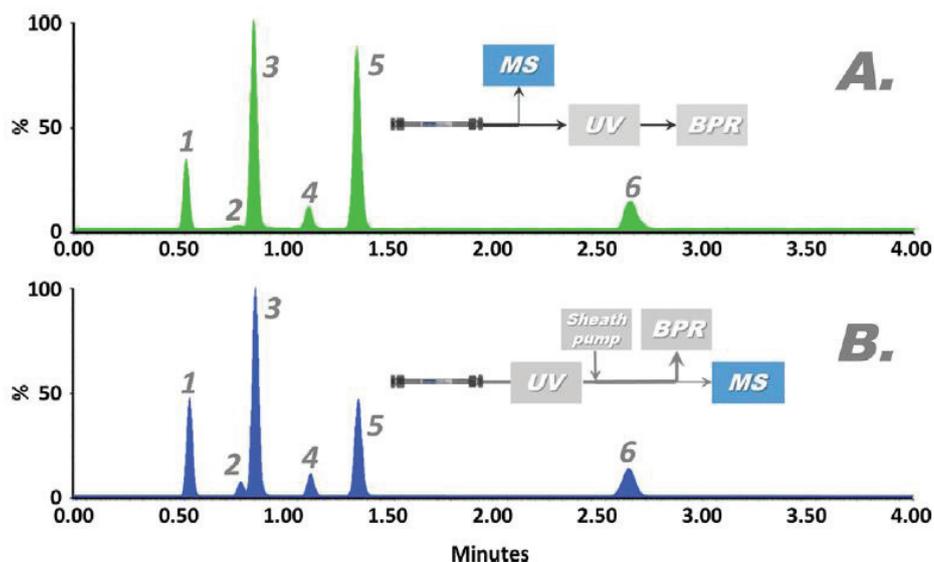


Figure I-24 : TIC chromatogramme pour un mélange de 6 composés pharmaceutiques avec les deux configurations de couplage [97].

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

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

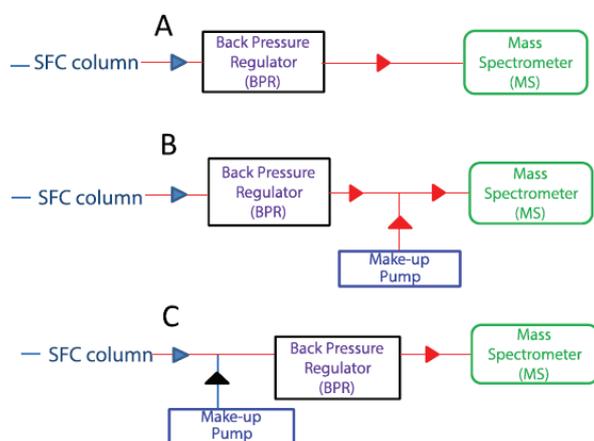


Figure I-25 : Configuration sans split pour l'interface entre SFC et MS [101]

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

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

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

2.1 Couplages SFC/MS utilisant l'ESI :

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

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

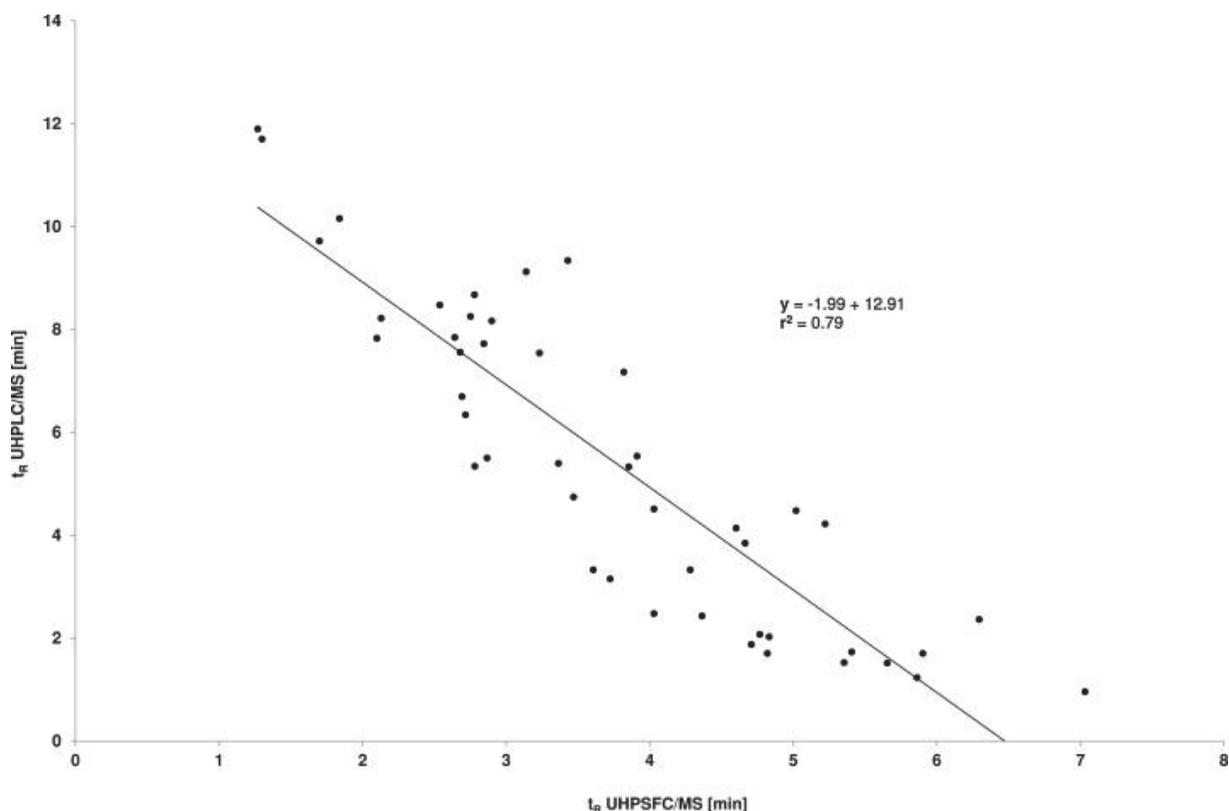


Figure I-26 : Corrélation entre temps de rétention en UHPLC/MS et UHPSFC/MS [107]

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

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

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

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

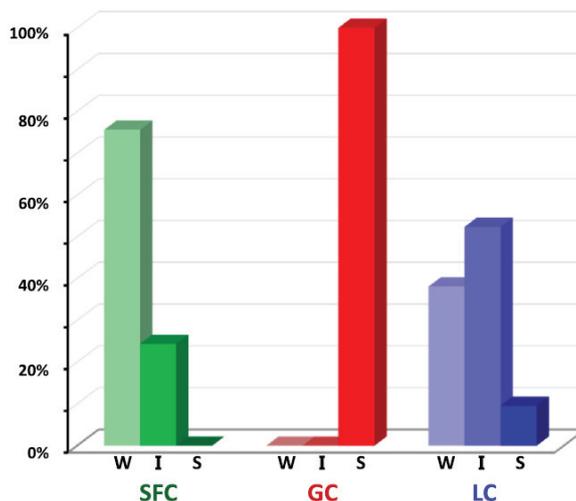


Figure I-27 : Mesure des effets de matrice en fonction de la technique analytique employée (W : 0% < effets < 20%, I : 20% < effets < 100%, S : effets < 100%) [110]

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

2.2 Couplages SFC/MS utilisant l'APCI

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

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

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

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

3 Conclusions

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

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

Retraitement des données HRMS et MS/MS

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

1 Exploitation des données HRMS

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

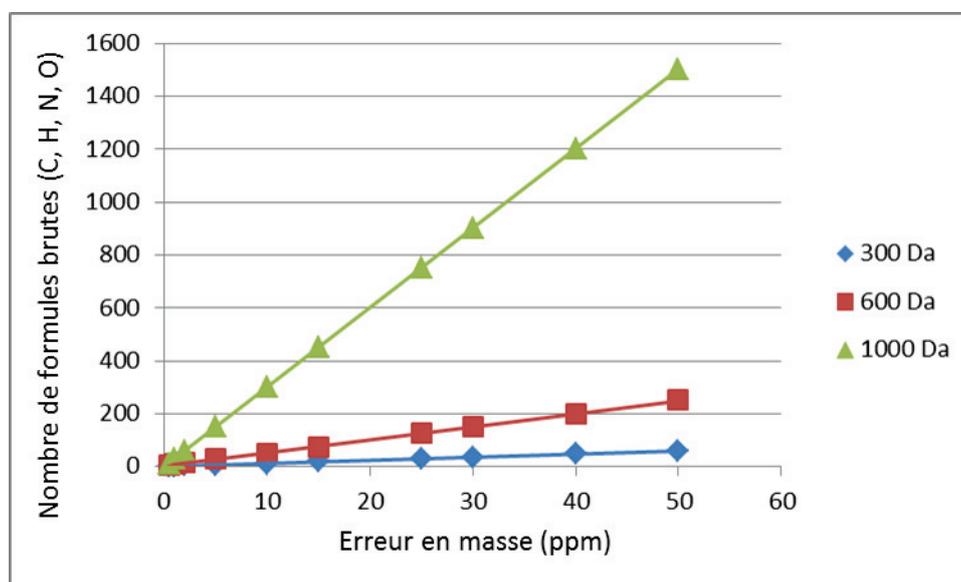


Figure I-28 : Evolution du nombre de formules brutes possibles en fonction de l'erreur en masse

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

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

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

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

2 Méthodologie de retraitement pour les données MS/MS

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

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

Méthodes d'activation

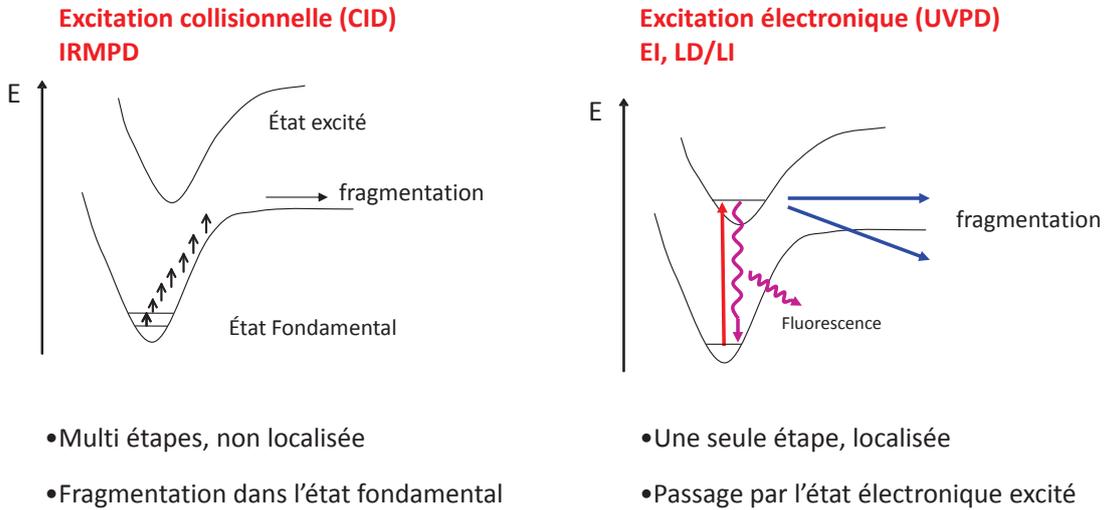


Figure I-29 : Comparaison entre fragmentation par CID et par EI, LD/LI

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

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

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