



Analyses multidimensionnelles au service des biocarburants et des molécules biosourcées

Alexis Dubuis, Agnès Le Masle, Ludovic Chahen, Nadège Charon, Emilie Destandeu

► To cite this version:

Alexis Dubuis, Agnès Le Masle, Ludovic Chahen, Nadège Charon, Emilie Destandeu. Analyses multidimensionnelles au service des biocarburants et des molécules biosourcées. *L'Actualité Chimique*, 2021, 468. hal-03600785

HAL Id: hal-03600785

<https://ifp.hal.science/hal-03600785>

Submitted on 21 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Analyses multidimensionnelles au service des biocarburants et des molécules biosourcées

Alexis Dubuis^{a,*}, Agnès Le Masle^a, Ludovic Chahen^a, Emilie Destandau^b, Nadège Charon^a

^a A. Dubuis : Doctorant IFP Energies nouvelles. A. Le Masle, L. Chahen, N. Charon : Ingénieurs de recherche dans la Direction Physique et Analyse à IFP Energies nouvelles.

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

alexis.dubuis@rd.loreal.com, agnes.le-masle@ifpen.fr, ludovic.chahen@ifpen.fr,
nadege.charon@ifpen.fr

*Auteur correspondant. alexis.dubuis@rd.loreal.com, Prix de thèse Innovation 2020 de l'Inter-Division Energie de la Société Chimique de France

^b E. Destandau : Professeure à l'Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans

ICOA, Université d'Orléans, CNRS UMR 7311, Rue de Chartres, 45067 Orléans, France

emilie.destandau@univ-orleans.fr

Résumé

Une stratégie inédite de fractionnement d'échantillon a été mise au point dans ces travaux de recherche pour approfondir la connaissance des solutions générées lors de la production de biocarburants et de molécules biosourcées. Appliquée à deux types d'échantillon issus de la transformation biochimique ou thermochimique de paille de blé ou de bois, cette stratégie de fractionnement est adaptable selon les propriétés des produits étudiés et selon les informations recherchées. En suivant un guide méthodologique détaillé, il est possible d'orienter le choix des techniques de fractionnement pour parvenir à un détail moléculaire de mélanges chimiquement complexes. Ainsi, des séparations sélectives de familles chimiques sont accessibles par la combinaison pertinente de techniques complémentaires comme l'extraction liquide/liquide (LLE), la chromatographie de partage centrifuge (CPC) ou la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Les fractions obtenues sont ensuite analysées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (RPLC/HRMS), décrivant chaque échantillon par des cartographies 3D riches en informations moléculaires.

Mots-clés

Biomasse lignocellulosique, composés oxygénés, chromatographie de partage centrifuge, chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie en phase liquide, spectrométrie de masse haute résolution, couplages.

Multidimensional analyses for biofuels and bio-sourced molecules

Abstract

A new sample fractionation strategy was developed in this work to improve knowledge of solutions generated during the production of biofuels and bio-based molecules. Applied to two types of sample resulting from biochemical or thermochemical transformation of wheat or wood straw, this fractionation strategy can be adapted to properties of products studied and according to information needed. By following a detailed methodological guide, choice of fractionation techniques can be directed to achieve molecular detail of chemically complex mixtures. Thus, selective separations of chemical families are accessible by relevant combination of complementary techniques such as liquid/liquid extraction (LLE), centrifugal partition chromatography (CPC) or size exclusion chromatography (SEC). Fractions obtained are then analyzed by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (RPLC/HRMS), describing each sample by 3D maps rich in molecular information.

Keywords

Lignocellulosic biomass, oxygenated compounds, centrifugal partition chromatography, size exclusion chromatography, liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry, hyphenated techniques.

1. Une recherche d'innovation motivée par la transition énergétique

L'augmentation de la consommation mondiale en énergie combinée à la raréfaction des ressources fossiles conduit à un intérêt croissant pour les sources d'énergie alternatives [1]. La conversion de la biomasse lignocellulosique (résidus forestiers, déchets agricoles, cultures dédiées) en biocarburants et molécules bio-sourcées représente une voie d'accès prometteuse à des énergies et des produits d'origine renouvelable [2-3]. La lignocellulose est un matériau composite synthétisé par les cellules végétales, constitué principalement de polymères de sucres (cellulose et hémicelluloses) et de macromolécules aromatiques de lignine [6].

En France, les objectifs 2021 d'incorporation de biocarburants dans les carburants traditionnels sont à hauteur de 8,6 % pour les essences et 8,0 % pour les gazoles. A l'horizon 2028, la priorité sera donnée à la filière de production des biocarburants avancés avec un objectif d'incorporation de 3,8 % dans les essences et de 2,8 % pour les gazoles [5].

Les produits liquides issus de la transformation biochimique ou thermochimique de biomasse lignocellulosique sont des matrices complexes qui sont à l'heure actuelle encore relativement méconnues, et dont une meilleure description détaillée de la composition chimique apporterait assurément un avantage crucial pour le développement de nouveaux procédés de production. Ces produits de transformation montrent une importante diversité en fonctions chimiques oxygénées, lesquelles occupent une large gamme de polarités et de masses moléculaires. Ces caractéristiques complexifient l'analyse de ces produits car l'utilisation d'une technique unique ne permet pas la caractérisation de l'ensemble de l'échantillon. En effet, la chromatographie en phase gazeuse (GC), couramment utilisée, est limitée pour les molécules thermosensibles et peu volatiles [8]. La partie moins volatile de la matrice peut être décrite à l'aide de la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS), mais cette technique utilisée seule ne permet pas de quantifier les espèces dans de bonnes conditions [9]. C'est pourquoi, des approches multidimensionnelles mises en œuvre au moyen de couplages innovants ont été développées pour associer des techniques de séparation performantes à des détecteurs variés [10, 11, 12]. Bien que bénéficiant d'une constante amélioration apportée par les équipes de recherche à travers le monde, ces outils donnent encore à l'heure actuelle une vision incomplète de produits très complexes chimiquement. L'ajout d'une étape de fractionnement maîtrisée en amont de la chaîne analytique a donc été étudié avec pour objectif d'apporter une organisation chimique pertinente des chromatogrammes.

Dans les présents travaux de recherche, le fractionnement vise à investiguer l'ensemble de la matrice liquide oxygénée, sans en modifier la composition. Deux axes de fractionnement en accord avec les propriétés des échantillons ont été étudiés : 1) un fractionnement basé sur le partage des composés entre deux phases liquides immiscibles et 2) un fractionnement basé sur la taille moléculaire des espèces constituant les produits de transformation de la biomasse lignocellulosique. Ces deux voies ont pour but de mettre en œuvre des mécanismes de séparation complémentaires.

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu et d'évaluer la qualité du fractionnement, les fractions générées ont été analysées avec une même technique : la chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée couplée à un détecteur de spectroscopie ultraviolet et à la HRMS (RPLC-UV/HRMS). Deux exemples d'application ont été sélectionnés afin d'illustrer l'apport du fractionnement par partage pour l'analyse de matrices complexes, avec différents niveaux d'informations.

2. Du fractionnement maîtrisé aux analyses multidimensionnelles

2.1. Un fractionnement simple et sélectif par extractions liquide-liquide

Le fractionnement par partage peut être réalisé dans un premier temps à l'aide d'extractions liquide-liquide (LLE) qui reposent sur la séparation de composés en fonction de leur coefficient de partage entre deux phases liquides immiscibles. Deux leviers permettent de contrôler la sélectivité chimique des fractions générées : la nature du solvant utilisé, et le pH de la phase aqueuse, qui va dicter l'état d'ionisation des molécules.

Adapté aux phases aqueuses issues de la transformation par voie biochimique de biomasse lignocellulosique, un protocole LLE a été mis au point comme illustré par la Figure 1. Il repose sur l'extraction sélective d'un échantillon aqueux avec un solvant organique, le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) [14]. L'étude du partage des familles de composés oxygénés permet de prédire la répartition chimique suivante :

- Fraction aqueuse 1 (AQ 1) : composés fortement hydrophiles comme les sucres et leurs dérivés ($\log P_{\text{octanol/eau}} < 0$).
- Fraction organique 2 (ORG 2) : composés non ionisés à pH 12 tels que les furanes, alcools, aldéhydes, cétones, esters ($pK_a > 14$).
- Fraction organique 3 (ORG 3) : composés ionisés à $7 < \text{pH} < 12$ comme les phénols ($pK_a 9 - 10$).
- Fraction aqueuse 3 (AQ 3) : composés ionisés à $\text{pH} < 7$ comme les acides carboxyliques ($pK_a 4 - 5$).

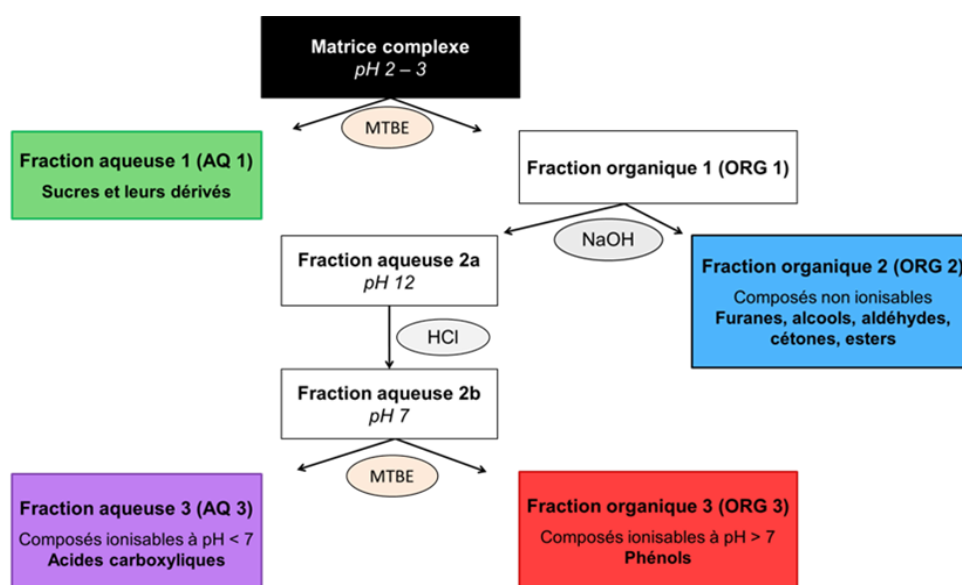


Figure 1 : Stratégie de fractionnement LLE sélectif de familles chimiques clés d'un échantillon issu de la transformation biochimique d'une paille de blé [13].

La qualité du fractionnement en termes de sélectivité chimique et de récupération de la matrice a été contrôlée à l'aide de mélanges modèles représentatifs des familles chimiques ciblées [13]. A titre d'exemple, ce protocole LLE a été appliqué à un échantillon issu d'une transformation biochimique de paille de blé et les chromatogrammes RPLC-UV des fractions LLE obtenues sont représentés sur la Figure 2.

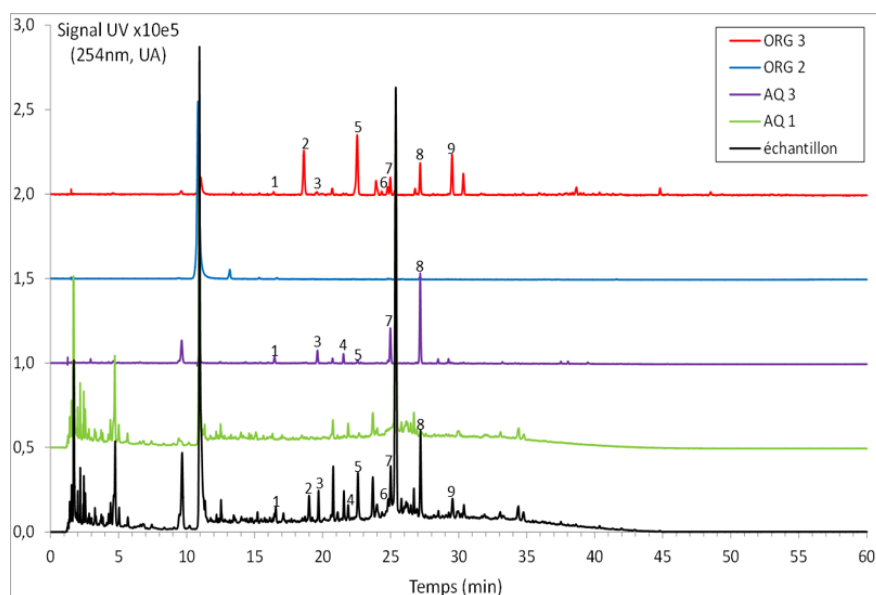


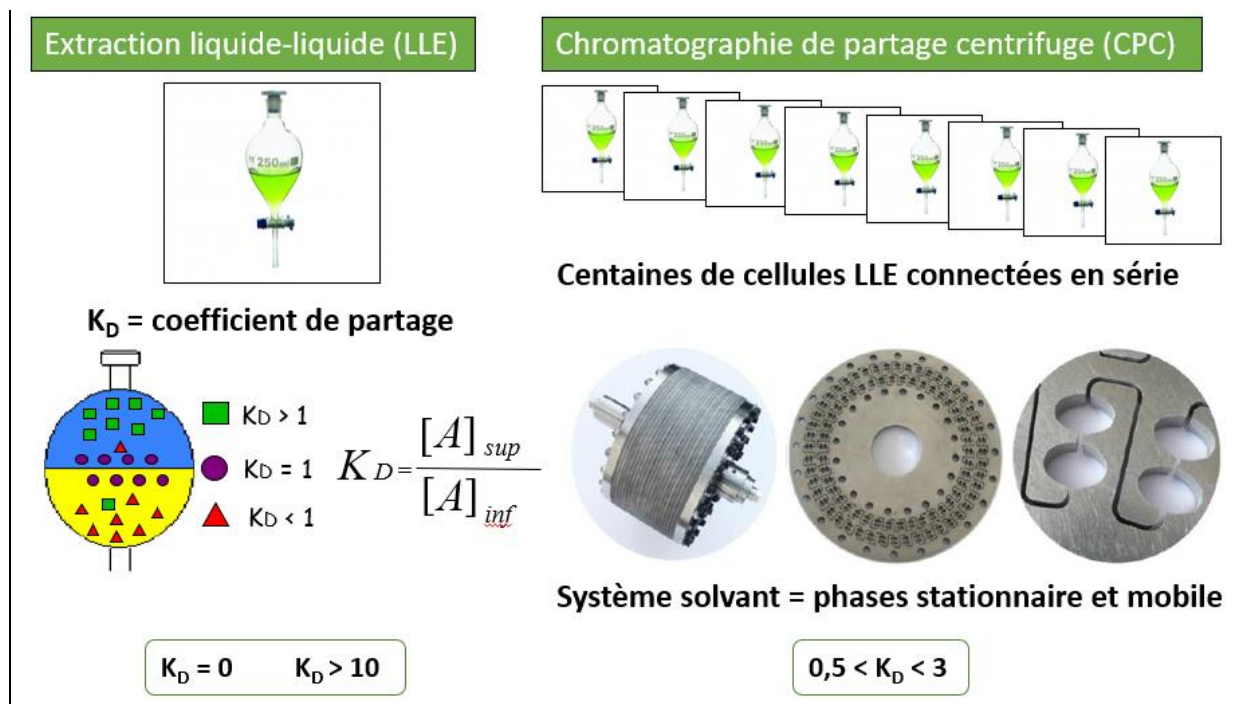
Figure 2 : Chromatogrammes RPLC-UV (254 nm) des fractions d'un échantillon issu de la transformation biochimique d'une paille de blé. (1) acide hydroxybenzoïque, (2) hydroxybenzaldéhyde, (3) acide vanillique, (4) acide syringique, (5) vanilline, (6) syringaldéhyde, (7) acide coumarique, (8) acide férulique, (9) coniféraldéhyde [13].

Figure La simplification des fractions améliore la résolution des chromatogrammes et permet d'obtenir des spectres UV et MS de meilleure qualité pour l'ensemble des composés. De plus, la levée des co-élutions et le retour à la ligne de base entre les pics chromatographiques permettent d'envisager une quantification des produits détectés, un exemple a été réalisé à partir de la détection UV des composés phénoliques numérotés de 1 à 9 [13]. Cette quantification, jusque-là réalisée avec une détection MS, était sujette à des effets de matrice du fait de la complexité des échantillons [14]. Enfin, le classement chimique des fractions LLE a contribué à l'analyse structurale de molécules non décrites dans ce type d'échantillon à l'aide de la spectrométrie de masse haute résolution en tandem (RPLC/HRMS/MSⁿ) [15]. Ainsi, ce fractionnement simple et sélectif apporte des informations importantes avec peu de moyens analytiques.

2.2. Approches multidimensionnelles pertinentes pour l'étude d'échantillons complexes

Lorsque le nombre de composés à caractériser augmente, un plus grand pouvoir de séparation est nécessaire. La chromatographie de partage centrifuge (CPC) peut alors être déployée comme technique de fractionnement pour bénéficier d'une efficacité plus importante que la LLE, tout en conservant un système sans support solide (risque limité d'adsorptions irréversibles).

En chromatographie de partage centrifuge (CPC), la phase mobile et la phase stationnaire sont deux phases liquides immiscibles en équilibre (système solvant). La phase stationnaire est maintenue dans la colonne (rotor) grâce à une force hydrostatique formée par un champ centrifuge. La phase mobile est alors pompée au travers de la phase stationnaire et les solutés sont séparés en fonction de leur coefficient de partage entre les deux phases. L'instrumentation CPC met en œuvre plusieurs centaines de cellules d'extraction connectées les unes aux autres en série, ce qui permet d'atteindre des efficacités de séparation supérieures à la LLE. La CPC présente également d'autres avantages comme la modularité du système solvant et une importante capacité de charge, ce qui en fait une technique préparative de choix [16, 17].



Dans cette étude, plusieurs modes chromatographiques ont été utilisés pour reproduire de manière automatisée le classement chimique obtenu en LLE, en exploitant l'efficacité chromatographique supplémentaire de la CPC. Pour cela, la connaissance *a priori* des coefficients de partage dans le système solvant MTBE/Eau a permis de prédire trois zones de séparation par (1) élution isocratique, (2) déplacement des espèces ionisables et (3) extrusion de la phase stationnaire (Figure 3).

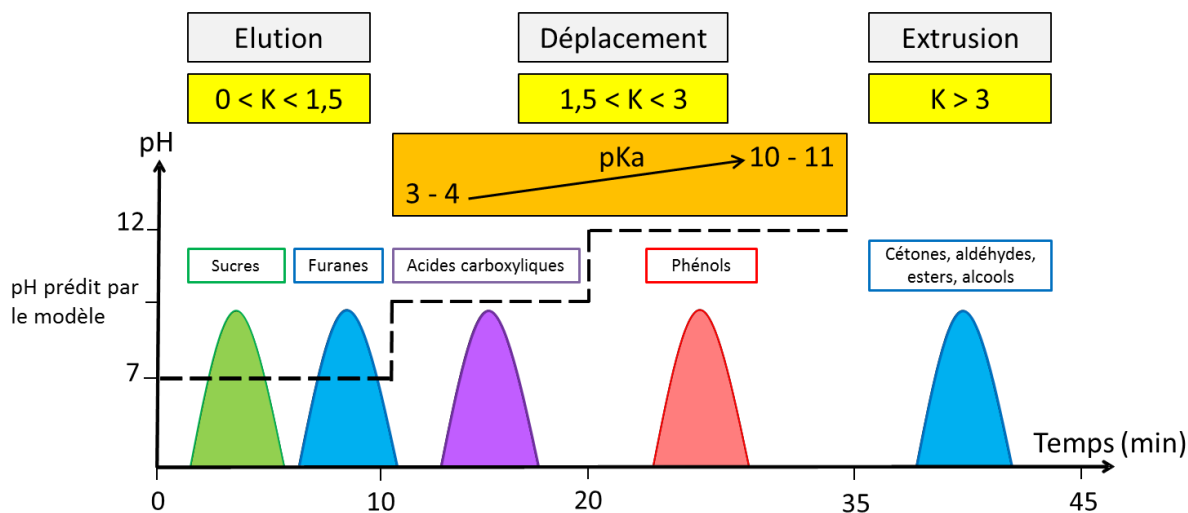


Figure 3 : Stratégie de fractionnement CPC en mode élution, déplacement et extrusion, basée sur i) le coefficient de partage K et la constante d'acidité pK_a des solutés, ii) le pH de la phase mobile CPC et iii) le temps de rétention des composés dans la phase stationnaire CPC [18].

La stratégie repose sur la maîtrise du pH de la phase mobile, modifiée par paliers pour éluer sélectivement les familles chimiques en fonction de leur pK_a . Pour contrôler ce paramètre clef, un modèle prédictif de l'évolution des concentrations au sein de la colonne CPC a été développé [13]. La méthodologie a été éprouvée sur molécules modèles et sur un échantillon complexe issu de la voie thermochimique [18].

Afin d'augmenter le pouvoir de séparation, l'intégralité des fractions collectées en CPC a été analysée à l'aide d'une seconde dimension RPLC qui bénéficie d'une plus grande efficacité de séparation (approche *comprehensive*). Ce couplage CPC×RPLC a été réalisé de façon hors-ligne afin de limiter les compromis entre les deux dimensions de séparation et ainsi bénéficier d'une capacité de pics maximale. En plus du gain en séparation offert par l'approche bidimensionnelle, l'analyse a bénéficié en outre de trois modes de détection complémentaires pour la représentation des cartographies : détection UV et détection MS avec ionisation Electrospray à polarité négative (ESI⁻) et positive (ESI⁺) (Figure 4).

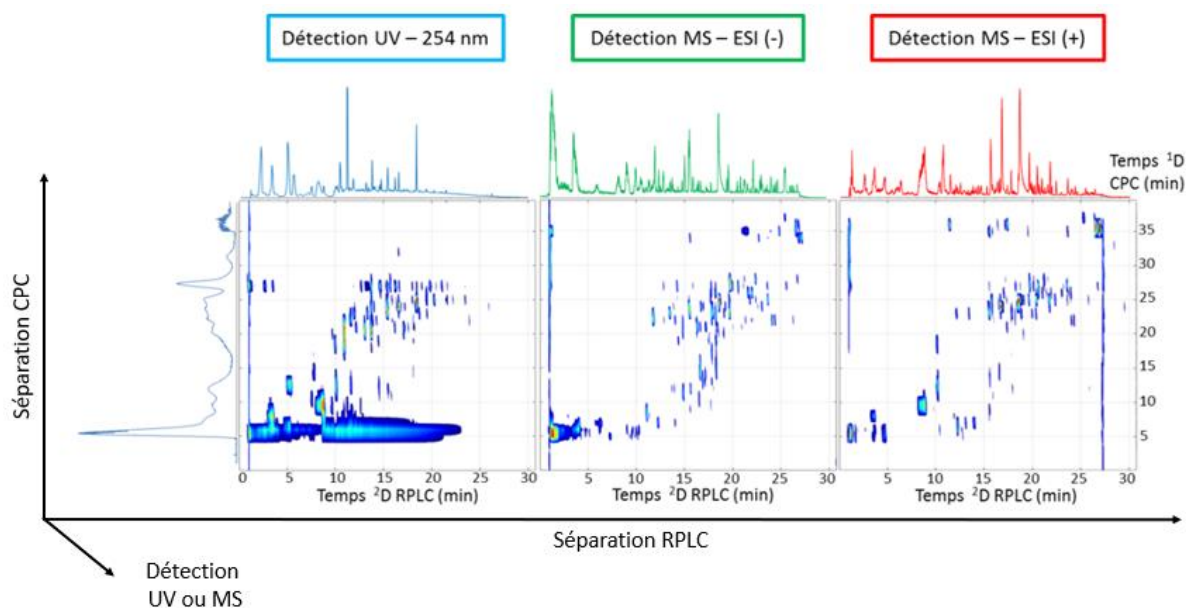


Figure 4 : Cartographies obtenues par le couplage hors-ligne CPC×RPLC-UV/HRMS appliqué à un échantillon issu de la transformation thermochimique de bois [18].

Les cartographies 2D obtenues augmentent la quantité d'informations disponibles par rapport à une analyse monodimensionnelle (1D). Selon une même approche multidimensionnelle, un fractionnement par taille moléculaire a été développé à l'aide de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en couplage en ligne ou hors-ligne avec l'analyse RPLC-UV/HRMS (non présenté ici) [19]. Le premier critère de comparaison des cartographies 2D est le nombre de pics détectés qui est doublé pour les échantillons les plus complexes [18, 19]. Dans l'exemple illustré dans la Figure 5, le nombre de formules brutes identifiées a augmenté de 73 par RPLC à 111 par SEC×RPLC ou CPC×RPLC pour un échantillon issu de la conversion biochimique d'une paille de blé ; de 105 par RPLC à 246 (SEC×RPLC) et 149 (CPC×RPLC) pour un échantillon issu de la transformation thermochimique d'un bois [13].

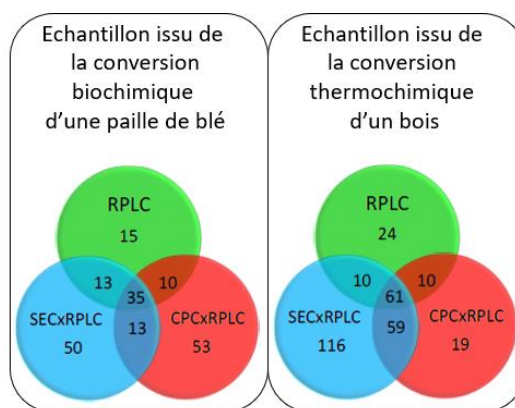


Figure 5 : Diagrammes de Venn des formules brutes détectées en RPLC 1D, SECxRPLC et CPCxRPLC – exemples de deux échantillons issus de la transformation biochimique d'une paille de blé ou d'une transformation thermochimique de bois [13].

La levée des co-élutions améliore nettement la qualité des spectres de masse, ce qui est avantageux pour l'attribution de formules brutes en HRMS [19]. Cette approche bidimensionnelle permet d'identifier les réponses dans chaque mode de détection pour tirer avantage de leur complémentarité. Dans cette optique, les cartographies CPCxRPLC et SECxRPLC apportent des informations inédites pour la comparaison d'échantillons et une meilleure compréhension de leur réactivité pour un procédé donné. La simplification des fractions permet également d'améliorer les conditions de quantification (effets de matrices limités, retour à la ligne de base) [13]. Enfin, l'organisation chimique souhaitée en première dimension est essentielle pour l'interprétation des données 2D en orientant le choix des familles chimiques. Cet avantage est particulièrement important pour améliorer l'identification structurale au sein des matrices oxygénées [15].

3. Comparaison des techniques : vers une stratégie analytique raisonnée

3.1. Organisation chimique entre les trois dimensions de séparation

Au-delà de l'augmentation mesurée du nombre de composés détectés [13], les approches bidimensionnelles CPCxRPLC et SECxRPLC ont été comparées en considérant l'organisation chimique de chacune des trois dimensions. Les données à disposition pour effectuer ces regroupements sont les temps de rétention des composés modèles et des molécules identifiées au sein des échantillons issus des voies biochimique et thermochimique comme représenté par la Figure 6.

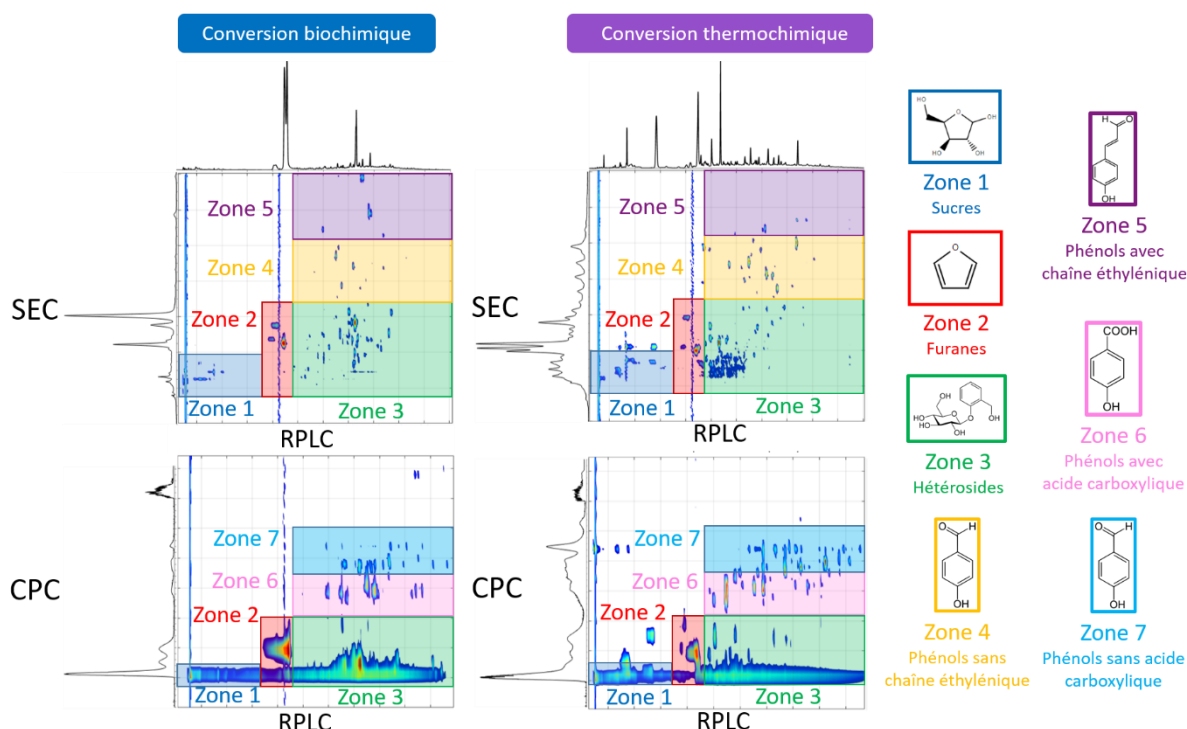


Figure 6 : Zones d'élution identifiées dans les cartographies SEC×RPLC et CPC×RPLC [13].

Les zones 1 à 7 indiquées sur les cartographies avec détection UV de la Figure 6 sont représentatives de structures chimiques simples qui dictent la rétention suivant les axes RPLC, CPC et SEC. Les molécules utilisées pour illustrer chaque zone sont proposées à titre d'exemple.

La zone 1 correspond aux sucres comme le glucose et le xylose, regroupés au début du chromatogramme pour les trois techniques. Dans la zone 2, les furanes tels que le furfural ou l'hydroxyméthylfurfural se positionnent en début de gradient RPLC, dans la zone d'élution en CPC et dans la zone intermédiaire en SEC. Les hétérosides constitués d'une partie sucre (ose) et d'une partie phénolique (aglycone) sont retrouvés dans la zone 3. Ils sont retenus en RPLC par leur partie aglycone, ont un partage intermédiaire entre les sucres et les furanes en CPC et sont élués après les furanes en SEC. Les zones 4 et 5 sont spécifiques aux cartographies SEC×RPLC. La zone 4 correspond aux phénols non liés à une chaîne éthylénique tels que l'acide syringique, le syringaldéhyde ou la vanilline. La zone 5 est spécifique des phénols liés à une chaîne éthylénique, comme le coniferaldéhyde, l'acide férulique ou l'acide coumarique. Enfin, les zones 6 et 7 concernent uniquement les cartographies CPC×RPLC et la présence ou l'absence d'une fonction acide carboxylique. Les molécules comportant une fonction acide sont retrouvées dans la zone 6 en CPC : c'est le cas de l'acide syringique, l'acide férulique et l'acide coumarique. Les phénols qui ne portent pas de fonction acide sont élués dans la zone 7 : syringaldéhyde, vanilline et coniferaldéhyde par exemple.

Il est important de noter qu'un produit qui possède la fonction chimique décrite se retrouve dans la zone correspondante, mais la réciproque n'est pas forcément vraie. En effet, il existe potentiellement d'autres structures chimiques encore non identifiées dont les zones pourraient se superposer à celles déjà recensées.

Ces organisations chimiques sont donc des outils permettant de guider l'identification dans les cartographies, de façon complémentaire aux trois modes de détection mis en œuvre. Ils peuvent être enrichis à l'avenir pour inclure d'autres structures.

3.2. Proposition d'un guide méthodologique

Quelle stratégie de fractionnement pour quel échantillon ? Le guide décisionnel présenté en Figure 7 propose une stratégie de fractionnement et d'analyse d'un échantillon, issu d'une transformation biochimique ou thermochimique de biomasse lignocellulosique.

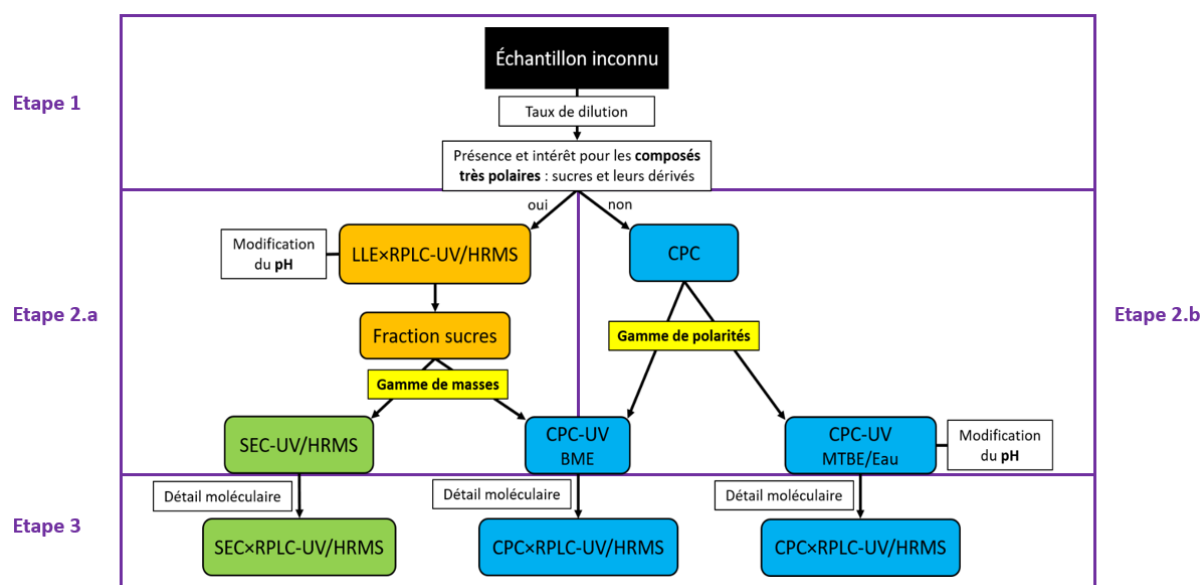


Figure 7 : Guide décisionnel pour le choix des techniques de fractionnement [13].

Cette approche s'articule en trois étapes :

Étape 1. Le taux de dilution de l'échantillon est évalué à partir des chromatogrammes RPLC-UV/HRMS pour évaporer l'échantillon si nécessaire. La présence d'espèces très polaires est visible dans la première partie du chromatogramme pour s'orienter soit vers la LLE, soit vers la CPC qui apporte un niveau de détail supérieur pour la partie moins polaire de la matrice.

Étape 2 – cas a. Le protocole LLE est utilisé pour séparer sélectivement les sucres, les composés neutres (furanes, aldéhydes, cétones, alcools, esters), les acides carboxyliques et les phénols. La fraction des sucres est alors réengagée dans un second fractionnement par SEC ou par CPC avec un système solvant butanol/méthanol/eau (BME, 5,7/0,8/12 ; v/v/v) spécialement développé pour les matrices les plus polaires [13]. L'orientation entre ces deux techniques est réalisée à l'aide de la gamme de masses mesurée en MS. La méthode SEC proposée est appropriée aux molécules de plus hautes masses moléculaires comprises entre 300 et 1000 Da [19].

Étape 2 – cas b. Le choix du système solvant en CPC est déterminé par la gamme de polarités, évaluée à l'aide du dernier composé élué sur le chromatogramme RPLC-UV/HRMS. Il faut noter que la plupart des échantillons issus de la biomasse contiennent des composés phénoliques, ce qui devrait conduire le plus souvent à l'utilisation du système solvant MTBE/Eau. A ce niveau, le dosage de l'acidité totale de l'échantillon permet d'évaluer l'intérêt d'une modification du pH pour séparer les acides carboxyliques et les phénols.

Etape 3. La déformulation la plus complète des échantillons est obtenue en combinant les approches SEC×RPLC et CPC×RPLC, pour bénéficier d'un détail moléculaire élevé associé à l'identification des 7 zones chimiques.

4. Vers une meilleure connaissance des biocarburants et bioproduits

La méthodologie analytique proposée dans ces travaux de recherche constitue un outil clef pour une meilleure compréhension des biocarburants et produits biosourcés et peut être déployée en soutien des procédés pour la comparaison globale d'empreintes d'échantillons ou pour identifier des espèces chimiques d'intérêt. Cette approche ouvre notamment la voie à de nouvelles analyses structurales, comme par exemple pour l'étude d'un échantillon issu de la transformation biochimique de paille de blé qui a été soumis à un fractionnement LLE selon le protocole décrit en Figure 1 [15]. L'analyse RPLC/HRMS des fractions LLE a permis d'accéder à une vue générale de la composition chimique de l'échantillon étudié (Figure 8) : les ratios H/C et O/C déterminés à partir des formules brutes identifiées montrent la présence de différentes familles chimiques (sucres, composés phénoliques et probablement lipides) réparties sélectivement dans les fractions LLE générées.

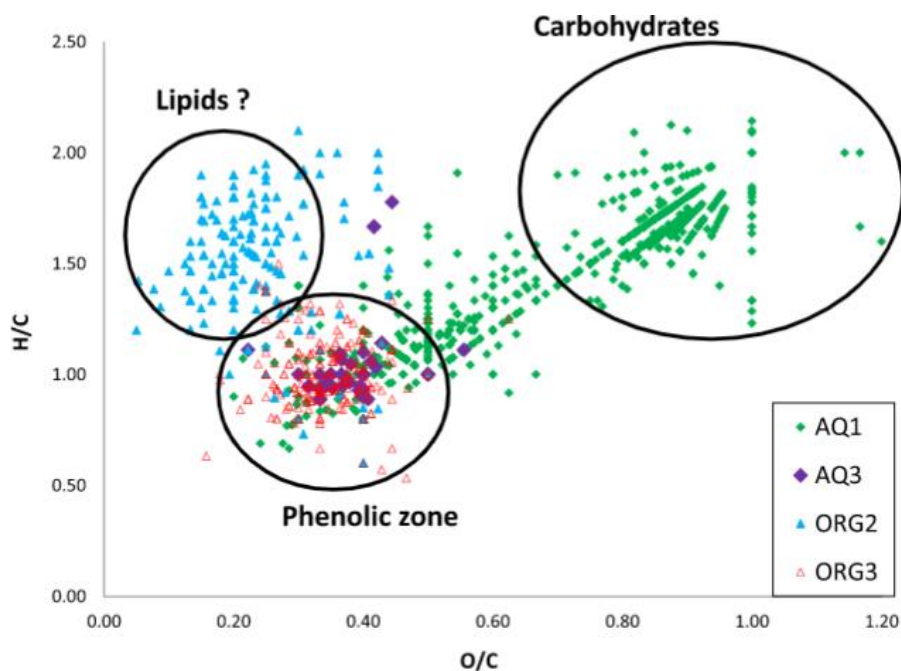


Figure 8 : Diagramme van Krevelen basé sur l'analyse par RPLC/HRMS de fractions LLE issues d'un échantillon de transformation biochimique de paille de blé [15].

Il est ensuite possible d'aller au-delà de cette première description en séparant les isomères de formule brute par chromatographie en phase liquide et en procédant à une analyse structurale comme présenté dans l'exemple de la Figure 9. Dans ce cas, la fraction aqueuse AQ1 issue de l'extraction LLE de l'échantillon de transformation biochimique de paille de blé a été caractérisée par couplage RPLC/HRMS/MSⁿ. Des structures moléculaires ont pu être proposées à partir des données de fragmentation, comme ici pour l'acide glucuronique ou l'acide méthylglucuronique ; des structures ont été également supposées pour des molécules même non-fragmentées en suivant l'évolution des ratios H/C et O/C des composés (ici selon une droite

mettant en évidence la présence incrémentielle d'unités de pentose rattachées à la molécule initiale d'acide glucuronique).

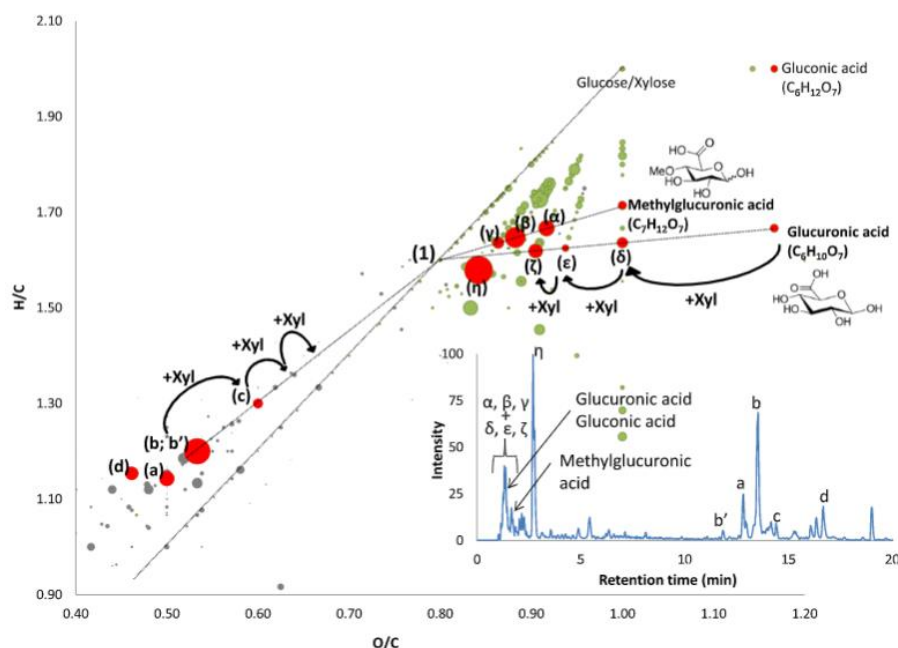


Figure 9 : Diagram van Krevelen et propositions de structures moléculaires selon les analyses HPLC/HRMS/MSⁿ de la fraction LLE AQ1 issue d'un échantillon de transformation biochimique de paille de blé [15].

Cette approche combinant fractionnement maîtrisé, analyses chromatographiques et spectrométrie de masse haute résolution se révèle donc être un outil très précieux dans la description de la composition chimique de produits oxygénés complexes.

5. Références

- [1] IFP Energies nouvelles, *Quel avenir pour les biocarburants ?*, www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energies-renouvelables/quel-avenir-les-biocarburants (consulté le 28/11/2020).
- [2] Seidl P.R., Goulart A.K., Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, **2016**, 2, p. 48.
- [3] Chandel A.K., Garlapati V.K., Singh A.K., Antunes F.A.F., da Silva S.S., The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization, *Bioresource technology*, **2018**, 264, p. 370.
- [4] Gallezot P., Conversion of biomass to selected chemical products, *Chemical Society reviews*, **2012**, 41(4), p. 1538.
- [5] Ministère de la Transition Ecologique, *Biocarburants*, www.ecologie.gouv.fr/biocarburants#e4 (consulté le 28/11/2020).
- [6] Brandt A., Gräsvik J., Hallett J.P., Welton T., Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids, *Green Chem.*, **2013**, 15(3), p. 550.
- [7] Sagnès C., Chabreliè M.-F., Biocarburants de deuxième génération une nouvelle étape est franchie, *Panorama IFP Energies nouvelles*, **2015**.

- [8] Kanaujia P.K., Sharma Y.K., Garg M.O., Tripathi D., Singh R., Review of analytical strategies in the production and upgrading of bio-oils derived from lignocellulosic biomass, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2014**, 105, p. 55.
- [9] Staš M., Chudoba J., Kubička D., Blažek J., Pospíšil M., Petroleomic Characterization of Pyrolysis Bio-oils: A Review, *Energy Fuels*, **2017**, 31(10), p. 10283.
- [10] Le Masle A., Angot D., Gouin C., D'Attoma A., Ponthus J., Quignard A., Heinisch S., Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of chromatography. A*, **2014**, 1340, p. 90.
- [11] Sarrut M., Corgier A., Crétier G., Le Masle A., Dubant S., Heinisch S., Potential and limitations of on-line comprehensive reversed phase liquid chromatography×supercritical fluid chromatography for the separation of neutral compounds: An approach to separate an aqueous extract of bio-oil, *Journal of chromatography. A*, **2015**, 1402, p. 124.
- [12] Lazzari E., Arena K., Caramão E.B., Herrero M., Quantitative analysis of aqueous phases of bio-oils resulting from pyrolysis of different biomasses by two-dimensional comprehensive liquid chromatography, *Journal of chromatography. A*, **2019**, 1602, p. 359.
- [13] Dubuis A., Déformulation de matrices complexes, vers une méthodologie raisonnée adaptée aux matrices issues des procédés de valorisation de la biomasse: thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon, **2019**.
- [14] Du B., Sharma L.N., Becker C., Chen S.-F., Mowery R.A., van Walsum G.P., Chambliss C.K., Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates, *Biotechnology and bioengineering*, **2010**, 107(3), p. 430.
- [15] Reymond C., Dubuis A., Le Masle A., Colas C., Chahen L., Destandau E., Charon N., Characterization of liquid-liquid extraction fractions from lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, **2020**, 1610, p. 460569.
- [16] Faure K., Chromatographie de partage centrifuge - Principes et applications, *Techniques de l'ingénieur*, **2016**, 1(P1496).
- [17] M. Bojczuk, D. Żyżelewicz, P. Hodurek, Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references, *Journal of separation science*, **2017**, 40, p. 1597.
- [18] Dubuis A., Le Masle A., Chahen L., Destandau E., Charon N., Centrifugal partition chromatography as a fractionation tool for the analysis of lignocellulosic biomass products by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of chromatography. A*, **2019**, 1597, p. 159.
- [19] Dubuis A., Le Masle A., Chahen L., Destandau E., Charon N., Off-line comprehensive size exclusion chromatography × reversed-phase liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for the analysis of lignocellulosic biomass products, *Journal of chromatography. A*, **2020**, 1609, p. 460505.