

# 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.

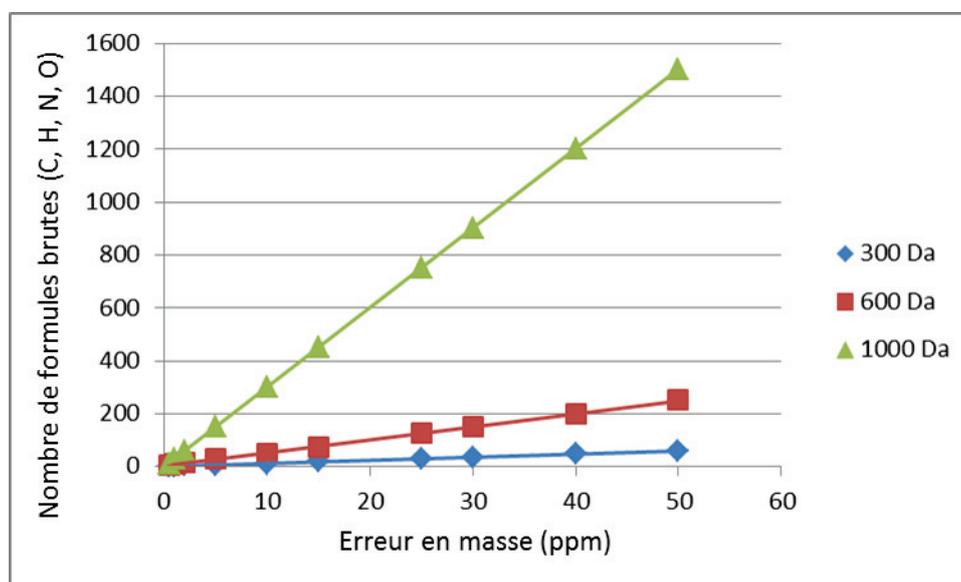


Figure I-28 : Evolution du nombre de formules brutes possibles en fonction de l'erreur en masse

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

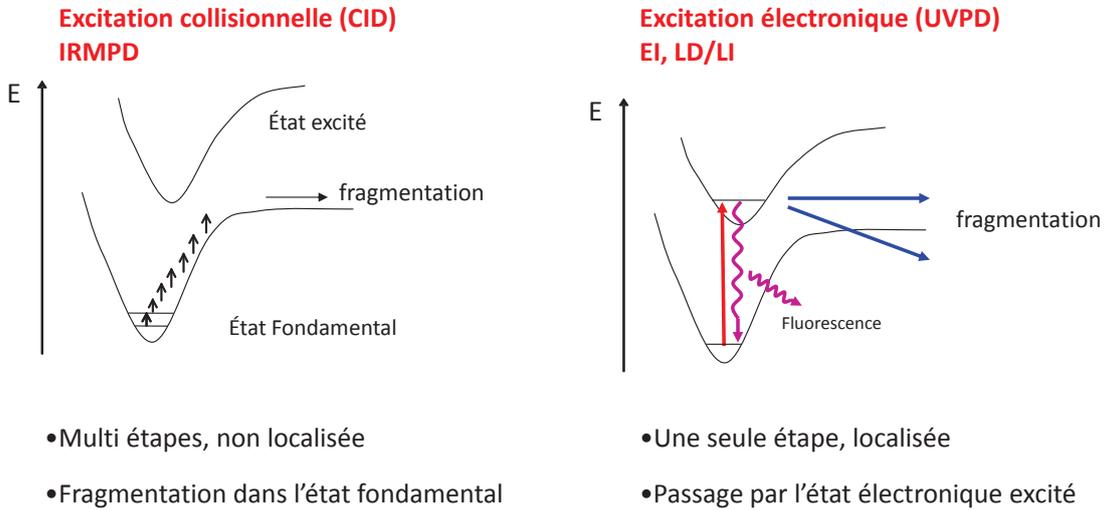


Figure I-29 : Comparaison entre fragmentation par CID et par EI, LD/LI

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	+

Ces différents logiciels prennent en compte la plupart des formats de fichiers. De plus, certains sont disponibles en « open source » afin que la communauté puisse contribuer à leur amélioration. A noter également que les différents constructeurs de spectromètres de masse proposent de plus en plus de logiciels permettant le retraitement des données MS/MS.

Chaque logiciel travaille à comparer les spectres de fragmentation acquis associés à la masse de l'ion fragmenté, avec les spectres présents dans une ou plusieurs bases de données et acquis expérimentalement sur molécules modèles. Ces bases de données multiplient les conditions d'énergie de fragmentation pour que l'ensemble couvre un champ assez large en termes de processus de fragmentation. De nombreuses bases de données de ce type sont disponibles en ligne. Kind et al. recensent les principales bases disponibles ainsi que le nombre de spectres et de molécules disponibles à l'intérieur de chacune. Le Tableau I-5 liste ces différentes bases de données. On remarque que le nombre de molécules disponibles est très variable. Cela provient du fait que certaines bases de données, tel que « Spektraris », se concentrent sur un type de composés particuliers, ici les métabolites des plantes. Les bases de données les plus fournies sont celles dédiées à l'analyse de lipides ou composés pharmaceutiques.

Tableau I-5 : Liste des principales bases de données disponibles et leurs caractéristiques.

#	Name	Number of MS/MS spectra	Number of compounds	Online search	Freely available	Instrument diversity	In silico
1	NIST14 MS/MS	193 120	9344	-	\$	+++	-
2	MassBank	22 000	2800	+	+	+++	-
3	METLIN	72 268	14 034	+	+/ \$	++	+/-
4	LipidBlast	212 516	119 200	-	+	++	+
5	MoNA	194 000	68 700	+	+	+++	+/-
6	mzCloud	182 000	2800	+	+	+	-
7	MetaboBASE	26 000	13 000	-	\$	+	-
8	GNPS	212 230	12 694	+	+	++	-
9	Spektraris	2626	487	+	+	+	-
10	ReSpect	9000	4000	+	+	+	-
11	MSforID	20 000	1200	-	\$	+	-
12	HMDB	5773	3729	+	+	++	+/-
13	MetaMS	150	150	+	+	+	-
14	Sumner Library	1734	289	-	+	+	-
15	ChemicalSoft	1619	6476	-	+/ \$	+	-
16	UNPD-ISDB	170 602	170 602	-	+	+	+
17	Designer drugs	10 000	750	-	\$	+	-
18	Drugs/poisons	10 000	6816	-	\$	+	-

Si cette approche est adaptée aux applications en métabolomique ou en protéomique (pour des molécules de grosses tailles dont la fragmentation est maîtrisée), elle peut rapidement montrer des limites notamment pour les composés de plus petites tailles comme ceux attendus dans les huiles de pyrolyse rapide où la fragmentation est moins systématique. Il sera donc plus compliqué de trouver une base de données regroupant les spectres des molécules ciblées enregistrés dans des conditions comparables.

Comme il est à l'heure actuelle difficile de disposer d'une base donnée exhaustive, une seconde approche complémentaire peut être utilisée. A partir de la formule brute du précurseur déterminée par

mesure HRMS, une première base de produits chimiques est interrogée (Chemspider par exemple) pour lister des structures cibles. Ensuite, des algorithmes vont simuler les spectres de fragmentation de ces structures et comparer ces données à celles obtenues expérimentalement. Il s'agit d'une approche dite *in silico*. Cette fragmentation *in silico* résulte soit du calcul de l'énergie de dissociation des liens (BDE) [115], soit de modèles statistiques de fragmentation basés sur un apprentissage. La fragmentation *in silico* peut être utilisée pour identifier et classer les spectres MS/MS inconnus en associant des fragments théoriques aux spectres MS/MS expérimentaux. Certaines bases utilisent une approche hybride qui correspond à une combinaison des deux approches décrites ci-dessus : base de données expérimentales combinée à la fragmentation *in silico* [116].

A chaque proposition de structure, un score est associé. Le calcul de ces scores est basé sur l'exactitude des spectres et leur similarité entre l'expérimental et l'attendu. Ainsi, il est possible de classer les différentes propositions de la plus probables à la moins probables. A noter qu'à l'heure actuelle ces outils fonctionnent pour les deux modes d'ionisation (+/-) avec des performances supérieures en mode d'ionisation positif. En effet, davantage de données sont disponibles dans la littérature en mode d'ionisation positif, ce qui conduit à des bases d'apprentissages plus conséquentes. En revanche, ces bases ne considèrent en général que les ions protonés ou déprotonés, les adduits ne sont pas considérés ce qui peut être un point limitant [117].

Dans le cadre de cette thèse, une attention particulière a été apportée à la plateforme internet MetFrag basée sur une approche hybride. Elle utilise donc une combinaison entre la fragmentation *in silico* basée sur l'énergie des liaisons et la bibliothèque de spectres de fragmentation MoNA [116]. Cette base de données (Mass Bank of North America) contient plus de 190 000 spectres de masse provenant à la fois des spectres générés par leurs propres expériences mais également de la mise en commun avec d'autres bases : Mass Bank et LipidBlast.

En conclusion, le traitement des données de fragmentation est actuellement en pleine expansion. Plusieurs équipes s'attachent à développer des protocoles afin de faciliter la compréhension de ces gros volumes de données. En fonction de l'appareillage et de l'application, l'utilisateur devra donc s'orienter vers le logiciel et la base de données les plus adaptés à son domaine d'application. Dans notre cas, aucune base de données ne semble assez exhaustive pour couvrir l'ensemble des molécules suspectées. L'approche *in silico* devra donc être prise en compte dans un premier temps tout en ayant conscience que cette approche reste encore en perpétuelle amélioration.

### **3 Conclusions**

Le retraitement de données HRMS et MS/MS permet de parvenir à une identification structurale des différents composés détectés lors de l'analyse. Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires. En premier lieu, le retraitement des données HRMS passe par la détermination de la formule brute à l'aide de la mesure de masse précise. Plus la mesure est précise et moins le nombre de formules brutes est important. Pour trouver la meilleure combinaison d'éléments, plusieurs règles sont à respecter comme les rapports entre éléments, le respect des règles de valence, la présence de signaux isotopiques correspondants etc. Plusieurs logiciels commerciaux sont disponibles pour réaliser ce travail. Cependant, ils constituent des « boîtes noires » pour l'utilisateur sans la possibilité d'adapter les algorithmes à une application précise. De plus, leur dépendance aux extensions de fichiers propres à

chaque constructeur, limite grandement leur utilisation. Réaliser ce travail via une interface créée à façon pourrait permettre une plus grande adaptabilité aux problématiques rencontrées par l'utilisateur.

Pour valoriser les données MS/MS et parvenir à l'identification structurale de chaque précurseur fragmenté, l'utilisation de plateformes de comparaison sur internet semble la méthode la plus répandue. Il existe plusieurs plateformes permettant la comparaison avec certaines bases de données. La difficulté de cette méthodologie provient du fait que les spectres de fragmentation obtenus en CID sont dépendants des conditions et de l'appareillage utilisés pour l'acquisition. Cela entraîne une forte diversité de spectres de fragmentation pour une même molécule et la comparaison est donc à faire en prenant des précautions (conditions similaires essentiellement). Pour compléter les lacunes de cette approche, il est également possible d'effectuer une comparaison avec des spectres théoriques calculés *in silico*. Cette approche permet de compenser les lacunes des bases de données qui ne sont pas forcément adaptées aux types de molécules suspectées selon les matrices. La combinaison de ces deux types de comparaison semble la plus appropriée à la problématique d'analyse des huiles de pyrolyse rapide par SFC/MS.

# Conclusions générales

---

L'utilisation des huiles de pyrolyse de biomasse semble une alternative aux énergies fossiles mais afin de pouvoir les valoriser correctement, il est indispensable de parvenir à caractériser ces matrices complexes. Actuellement, bien que de nombreuses études aient été menées sur le sujet, aucune caractérisation complète et détaillée de ces mélanges n'a pu être apportée. Pourtant plusieurs techniques analytiques puissantes ont déjà été investiguées mais ni la GCxGC ni la LCxLC ne sont encore parvenues à lever tous les verrous scientifiques liés à ces matrices. Ces techniques permettent d'obtenir des informations sur des fractions de ces huiles mais jamais une analyse de la matrice complète n'a pu être réalisée. La polarité, la thermolabilité ou bien la faible volatilité de certaines molécules constituent encore des verrous scientifiques d'actualité pour les huiles de pyrolyse rapide. La chromatographie en phase supercritique semble être une solution pertinente. Elle pourrait permettre de combiner les avantages de la chromatographie en phase gazeuse ainsi que ceux de la chromatographie en phase liquide.

Ce chapitre a permis de voir les possibilités offertes par cette technique analytique le plus souvent utilisée dans le domaine pharmaceutique. La SFC est une technique universelle dans le sens où toutes les combinaisons de phases mobiles et stationnaires peuvent être employées ainsi qu'une large gamme de détecteurs. Il n'y a que très peu de restrictions si l'on désire développer une méthode analytique basée sur une séparation à l'aide du CO<sub>2</sub> supercritique.

L'utilisation d'une classification des phases stationnaires et de leurs mécanismes de rétention semble le meilleur outil pour ne pas se disperser lors du choix des conditions opératoires. Les paramètres à optimiser sont nombreux pour parvenir à la caractérisation des produits ex-biomasse et une méthodologie rigoureuse devra donc être instaurée afin de parvenir à une caractérisation détaillée.

Une fois la séparation optimisée, la détection et l'utilisation de diverses sources d'informations semblent être nécessaires afin de couvrir une large gamme de possibilités et ainsi détecter un maximum de composés au sein de ces matrices. L'utilisation de la spectrométrie de masse HRMS et en tandem est nécessaire pour parvenir à une identification des composés. Afin d'ioniser et donc d'analyser un maximum de molécules, plusieurs sources d'ionisation sont envisageables.

Enfin, une fois les données acquises, une stratégie de retraitement adaptée est nécessaire pour valoriser ces données. Pour cela, divers logiciels de comparaison et de multiples bases de données sont disponibles sur internet. Les difficultés seront de trouver une base de données adaptée aux molécules recherchées et aux conditions opératoires choisies et optimisées car les spectres de fragmentation sont dépendants de ces derniers.

# Références

---

- [1] D. Ballerini, Les biocarburants: état des lieux, perspectives et enjeux du développement, 2006.
- [2] A. Oasmaa, E. Kuoppala, S. Gust, Y. Solantausta, Fast Pyrolysis of Forestry Residue. 1. Effect of Extractives on Phase Separation of Pyrolysis Liquids, *Energy & Fuels* 17 (1) (2002) 1–12.
- [3] N. Charon, J. Ponthus, D. Espinat, F. Broust, G. Volle, J. Valette, D. Meier, Multi-technique characterization of fast pyrolysis oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 116 (2015) 18–26.
- [4] A. Oasmaa, D. Meier, Norms and standards for fast pyrolysis liquids, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 73 (2) (2005) 323–334.
- [5] A.V. Bridgwater, H. Hofbauer, S. van Loo, *Thermal Biomass Conversion*, 2009.
- [6] N.S. Tessarolo, R.V.S. Silva, G. Vanini, A. Casilli, V.L. Ximenes, F.L. Mendes, A. de Rezende Pinho, W. Romão, E.V.R. de Castro, C.R. Kaiser, D.A. Azevedo, Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques: 1 H NMR, GC × GC-TOFMS and FT-ICR MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 117 (2016) 257–267.
- [7] B. Scholze, C. Hanser, D. Meier, Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin), *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59 (2001) 387–400.
- [8] D.S. Argyropoulos, P NMR in wood chemistry: A review of recent progress, *Research on Chemical Intermediates* 21 (1995) 373–395.
- [9] M.M. Sanguineti, N. Hourani, M. Witt, S.M. Sarathy, L. Thomsen, N. Kuhnert, Analysis of impact of temperature and saltwater on *Nannochloropsis salina* bio-oil production by ultra high resolution APCI FT-ICR MS, *Algal Research* 9 (2015) 227–235.
- [10] I. Miettinen, M. Mäkinen, T. Vilppo, J. Jänis, Characterization of Phase-Separated Pine Wood Slow Pyrolysis Oil by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass, *Energy & Fuels* (2015).
- [11] J. Hertzog, V. Carré, Y. Le Brech, A. Dufour, F. Aubriet, Toward Controlled Ionization Conditions for ESI-FT-ICR-MS Analysis of Bio-Oils from Lignocellulosic Material, *Energy Fuels* 30 (7) (2016) 5729–5739.
- [12] J. Hertzog, V. Carré, Y. Le Brech, C.L. Mackay, A. Dufour, O. Mašek, F. Aubriet, Combination of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization and laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the investigation of complex mixtures - Application to the petroleomic analysis of bio-oils, *Analytica Chimica Acta* 969 (2017) 26–34.
- [13] H.-L. Yan, Z.-M. Zong, Z.-K. Li, X.-Y. Wei, Characterization of bio-oils from the alkanolyses of sweet sorghum stalk by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Fuel* 160 (2015) 596–604.
- [14] N.S. Tessarolo, R.V.S. Silva, G. Vanini, A. Casilli, V.L. Ximenes, F.L. Mendes, A. Rezende Pinho, W. Romão, E.V.R. Castro, C.R. Kaiser, D.A. Azevedo, Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques: 1 H NMR, GC × GC-TOFMS and FT-ICR MS, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 117 (2016) 257–267.
- [15] N.S. Tessarolo, R.C. Silva, G. Vanini, A. Pinho, W. Romão, E.V.R. Castro, D.A. Azevedo, Assessing the chemical composition of bio-oils using FT-ICR mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Microchemical Journal* 117 (2014) 68–76.
- [16] E.A. Smith, S. Park, A.T. Klein, Y.J. Lee, Bio-oil Analysis Using Negative Electrospray Ionization: Comparative Study of High-Resolution Mass Spectrometers and Phenolic versus Sugarcane Components, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3796–3802.
- [17] J.M. Jarvis, Am McKenna, R.N. Hilten, Characterization of pine pellet and peanut hull pyrolysis bio-oils by negative-ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Energy & ...* (2012).

- [18] J.M. Jarvis, A.M. McKenna, R.N. Hilten, K.C. Das, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Characterization of Pine Pellet and Peanut Hull Pyrolysis Bio-oils by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3810–3815.
- [19] J.M. Jarvis, D.S. Page-Dumroese, N.M. Anderson, Y. Corilo, R.P. Rodgers, Characterization of Fast Pyrolysis Products Generated from Several Western USA Woody Species, *Energy Fuels* 28 (10) (2014) 6438–6446.
- [20] I. Miettinen, M. Mäkinen, T. Vilppo, J. Jänis, Characterization of Phase-Separated Pine Wood Slow Pyrolysis Oil by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass, *Energy Fuels* (2015).
- [21] N. Sudasinghe, J.R. Cort, R. Hallen, M. Olarte, A. Schmidt, T. Schaub, Hydrothermal liquefaction oil and hydrotreated product from pine feedstock characterized by heteronuclear two-dimensional NMR spectroscopy and FT-ICR mass spectrometry, *Fuel* 137 (2014) 60–69.
- [22] D.J. McClelland, A.H. Motagamwala, Y. Li, M.R. Rover, A.M. Wittrig, C. Wu, J.S. Buchanan, R.C. Brown, J. Ralph, J.A. Dumesic, G.W. Huber, Functionality and molecular weight distribution of red oak lignin before and after pyrolysis and hydrogenation, *Green Chem* 19 (5) (2017) 1378–1389.
- [23] J.M. Jarvis, A.M. McKenna, R.N. Hilten, K.C. Das, R.P. Rodgers, A.G. Marshall, Characterization of Pine Pellet and Peanut Hull Pyrolysis Bio-oils by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 26 (6) (2012) 3810–3815.
- [24] J.M. Jarvis, D.S. Page-Dumroese, N.M. Anderson, Y. Corilo, R.P. Rodgers, Characterization of Fast Pyrolysis Products Generated from Several Western USA Woody Species, *Energy & Fuels* 28 (10) (2014) 6438–6446.
- [25] T. Kekäläinen, T. Venäläinen, J. Jänis, Characterization of Birch Wood Pyrolysis Oils by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: Insights into Thermochemical Conversion, *Energy Fuels* 28 (7) (2014) 4596–4602.
- [26] P.V. Abdelnur, B.G. Vaz, J.D. Rocha, de Almeida, Marlon B. B., Teixeira, Marco Antonio G., Pereira, Rosana C. L., Characterization of Bio-oils from Different Pyrolysis Process Steps and Biomass Using High-Resolution Mass Spectrometry, *Energy & Fuels* 27 (11) (2013) 6646–6654.
- [27] D.P. Cole, E.A. Smith, D. Dalluge, D.M. Wilson, E.A. Heaton, R.C. Brown, Y.J. Lee, Molecular characterization of nitrogen-containing species in switchgrass bio-oils at various harvest times, *Fuel* 111 (2013) 718–726.
- [28] M. Stas, D. Kubic, J. Chudoba, M. Pospíš, Overview of Analytical Methods Used for Chemical Characterization of Pyrolysis Bio-oil, *Energy & Fuels* (28) (2014) 385–402.
- [29] C. Michailof, T. Sfetsas, S. Stefanidis, K. Kalogiannis, G. Theodoridis, A. Lappas, Quantitative and qualitative analysis of hemicellulose, cellulose and lignin bio-oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1369 (2014) 147–160.
- [30] L. Negahdar, A. Gonzalez-Quiroga, D. Otyuskaya, H.E. Toraman, L. Liu, Jastrzebski, Johann T B H, K.M. van Geem, G.B. Marin, J.W. Thybaut, B.M. Weckhuysen, Characterization and Comparison of Fast Pyrolysis Bio-oils from Pinewood, Rapeseed Cake, and Wheat Straw Using <sup>13</sup>C NMR and Comprehensive GC × GC, *ACS sustainable chemistry & engineering* 4 (9) (2016) 4974–4985.
- [31] M.R. Djokic, T. Dijkmans, G. Yildiz, W. Prins, K.M. van Geem, Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography, *Journal of chromatography. A* 1257 (2012) 131–140.
- [32] K. Sipilä, E. Kuoppala, L. Fagernäs, A. Oasmaa, Characterization of biomass-based flash pyrolysis oils, *Biomass and Bioenergy* 14 (2) (1998) 103–113.
- [33] J.H. Marsman, J. Wildschut, F. Mahfud, H.J. Heeres, Identification of components in fast pyrolysis oil and upgraded products by comprehensive two-dimensional gas chromatography and flame ionisation detection, *Journal of chromatography. A* 1150 (1-2) (2007) 21–27.
- [34] F. Bertoncini, E. Durand, N. Charon, D. Espinat, A. Quignard (Eds.), *Distillation and multidimensional GC analysis of a biomass pyrolysis oil*, American Chemical Society, 2006.

- [35] J.-Y. de Saint Laumer, E. Cicchetti, P. Merle, J. Egger, A. Chaintreau, Quantification in Gas Chromatography: Prediction of Flame Ionization Detector Response Factors from Combustion Enthalpies and Molecular Structures, *Analytical Chemistry* 82 (15) (2010) 6457–6462.
- [36] M.R. Djokic, T. Dijkmans, G. Yildiz, W. Prins, K.M. van Geem, Quantitative analysis of crude and stabilized bio-oils by comprehensive two-dimensional gas-chromatography, *Journal of chromatography. A* 1257 (2012) 131–140.
- [37] A. Fullana, J.A. Contreras, R.C. Striebich, S.S. Sidhu, Multidimensional GC/MS analysis of pyrolytic oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74 (1-2) (2005) 315–326.
- [38] N. Charon, J. Ponthus, D. Espinat, F. Broust, G. Volle, J. Valette, D. Meier, Multi-technique characterization of fast pyrolysis oils, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 116 (2015) 18–26.
- [39] M. Garcia-Perez, A. Chaala, H. Pakdel, D. Kretschmer, C. Roy, Characterization of bio-oils in chemical families, *Biomass and Bioenergy* 31 (4) (2007) 222–242.
- [40] M. Staš, J. Chudoba, D. Kubička, J. Blažek, M. Pospíšil, Petroleomic characterization of pyrolysis bio-oils: a review, *Energy Fuel* 31 (10) (2017) 10283–10299.
- [41] C. Tessini, N. Müller, C. Mardones, D. Meier, A. Berg, D. Baer, Chromatographic approaches for determination of low-molecular mass aldehydes in bio-oil, *Journal of chromatography. A* 1219 (2012) 154–160.
- [42] E.D. Christensen, G.M. Chupka, J. Luecke, T. Smurthwaite, T.L. Alleman, K. Iisa, J.A. Franz, D.C. Elliott, R.L. McCormick, Analysis of Oxygenated Compounds in Hydrotreated Biomass Fast Pyrolysis Oil Distillate Fractions, *Energy Fuels* 25 (11) (2011) 5462–5471.
- [43] P.A. Johnston, R.C. Brown, Quantitation of sugar content in pyrolysis liquids after acid hydrolysis using high-performance liquid chromatography without neutralization, *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (32) (2014) 8129–8133.
- [44] D.L. Dalluge, T. Daugaard, P. Johnston, N. Kuzhiyil, M.M. Wright, R.C. Brown, Continuous production of sugars from pyrolysis of acid-infused lignocellulosic biomass, *Green Chem* 16 (9) (2014) 4144–4155.
- [45] D. Tomasini, F. Cacciola, F. Rigano, D. Sciarrone, P. Donato, M. Beccaria, E.B. Caramão, P. Dugo, L. Mondello, Complementary Analytical Liquid Chromatography Methods for the Characterization of Aqueous Phase from Pyrolysis of Lignocellulosic Biomasses, *Anal. Chem.* 86 (22) (2014) 11255–11262.
- [46] A. Le Masle, D. Angot, C. Guoin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of chromatography. A* 1340 (2014) 90–98.
- [47] M. Sarrut, A. Corgier, G. Crétier, A. Le Masle, S. Dubant, S. Heinisch, 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* 1402 (2015) 124–133.
- [48] A. Le Masle, D. Angot, C. Guoin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *Journal of chromatography. A* 1340 (2014) 90–98.
- [49] A.W. Francis, Ternary Systems of Liquid Carbon Dioxide, *J. Phys. Chem.* 58 (12) (1954) 1099–1114.
- [50] G. Guiochon, A. Tarafder, Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1218 (8) (2011).
- [51] E. Lesellier, C. West, The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review, *Journal of Chromatography A* 1382 (2015) 2–46.
- [52] M. Saito, History of supercritical fluid chromatography: instrumental development, *Journal of bioscience and bioengineering* 115 (6) (2013) 590–599.
- [53] A. Tarafder, K. Kaczmarek, D.P. Poe, G. Guiochon, Use of the isopycnic plots in designing operations of supercritical fluid chromatography. V. Pressure and density drops using mixtures of carbon dioxide and methanol as the mobile phase, *Journal of chromatography. A* 1258 (2012) 136–151.

- [54] G.O. Cantrell, R.W. Stringham, J.A. Blackwell, J.D. Weckwerth, P.W. Carr, Effect of Various Modifiers on Selectivity in Packed-Column Subcritical and Supercritical Fluid Chromatography, *Analytical Chemistry* 68 (20) (1996) 3645–3650.
- [55] C. West, Enantioselective Separations with Supercritical Fluids - Review (2014) 99–120.
- [56] E. Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, *Journal of Chromatography A* 1216 (10) (2009) 1881–1890.
- [57] E. Lesellier, Overview of the retention in subcritical fluid chromatography with varied polarity stationary phases, *Journal of Separation Science* 31 (8) (2008) 1238–1251.
- [58] M.H. Abraham, Scales of solute hydrogen-bonding: Their construction and application to physicochemical and biochemical processes, *Chemical Society Reviews* 22 (2) (1993) 73–83.
- [59] C.F. Poole, S.K. Poole, Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, *Journal of Chromatography A* 965 (1–2) (2002) 263–299.
- [60] M.H. Abraham, J.C. McGowan, The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography, *Chromatographia* 23 (1987) 243–246.
- [61] C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model. I. Alkylsiloxane-bonded stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1110 (1-2) (2006) 181–190.
- [62] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model IV. Aromatic stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1115 (1-2) (2006) 233–245.
- [63] C. West, E. Lesellier, A. Tchaplal, Retention characteristics of porous graphitic carbon in subcritical fluid chromatography with carbon dioxide–methanol mobile phases, *Journal of Chromatography A* 1048 (1) (2004) 99–109.
- [64] C. West, E. Lesellier, Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon, *Journal of Chromatography A* 1087 (1-2) (2005) 64–76.
- [65] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model. III. Polar stationary phases, *Journal of chromatography. A* 1110 (1-2) (2006) 200–213.
- [66] C. West, E. Lesellier, A unified classification of stationary phases for packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1191 (1-2) (2008) 21–39.
- [67] S. Khater, C. West, E. Lesellier, Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1319 (2013) 148–159.
- [68] V. Desfontaine, A. Tarafder, J. Hill, J. Fairchild, A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, A systematic investigation of sample diluents in modern supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1511 (2017) 122–131.
- [69] M. Sun, G. Lidén, M. Sandahl, C. Turner, Ultra-high performance supercritical fluid chromatography of lignin-derived phenols from alkaline cupric oxide oxidation, *Journal of Separation Science* 39 (16) (2016) 3123–3129.
- [70] W. Wu, Y. Zhang, H. Wu, W. Zhou, Y. Cheng, H. Li, C. Zhang, L. Li, Y. Huang, F. Zhang, Simple, rapid, and environmentally friendly method for the separation of isoflavones using ultra-high performance supercritical fluid chromatography, *Journal of Separation Science* 40 (13) (2017) 2827–2837.
- [71] V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 113 (2015) 56–71.
- [72] D. Åsberg, M. Enmark, J. Samuelsson, T. Fornstedt, Evaluation of co-solvent fraction, pressure and temperature effects in analytical and preparative supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1374 (2014) 254–260.
- [73] C. West, J. Melin, H. Ansouri, M. Mengue Metogo, Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase, *Journal of chromatography. A* 1492 (2017) 136–143.
- [74] J.T.B. Strode III, L.T. Taylor, Optimization of electron-capture detector when using packed-column supercritical fluid chromatography with modified carbon dioxide, *Journal of Chromatography A* 723 (2) (1996) 361–369.

- [75] H. Shi, L.T. Taylor, E.M. Fujinari, Chemiluminescence nitrogen detection for packed-column supercritical fluid chromatography with methanol modified carbon dioxide, *Journal of Chromatography A* 757 (1–2) (1997) 183–191.
- [76] H. Shi, L.T. Taylor, E.M. Fujinari, X. Yan, Sulfur-selective chemiluminescence detection with packed column supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 779 (1–2) (1997) 307–313.
- [77] S. Shah, M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor, Analysis of triazine and triazole herbicides by gradient-elution supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography A* 505 (1) (1990) 293–298.
- [78] M. Lecoer, N. Simon, V. Sautou, B. Decaudin, C. Vaccher, A chemometric approach to elucidate the parameter impact in the hyphenation of evaporative light scattering detector to supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1333 (2014) 124–133.
- [79] Mathews, B. T., Higginson, P. D., R. Lyons, Mitchell, J. C., Sach, N. W., Snowden, M. J., Taylor, M. R., Wright, a. G., Improving Quantitative Measurements for the Evaporative Light Scattering Detector, *Chromatographia* 60 (11-12) (2004) 625–633.
- [80] A. Villiers, T. Górecki, F. Lynen, R. Szucs, P. Sandra, Improving the universal response of evaporative light scattering detection by mobile phase compensation, *Journal of chromatography. A* 1161 (1-2) (2007) 183–191.
- [81] E Lesellier, A. Valarché, C. West, M. Dreux, Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical fluid chromatography, *Journal of chromatography. A* 1250 (2012) 220–226.
- [82] M. Garzotti, M. Hamdan, Supercritical fluid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry: a powerful tool for the analysis of chiral mixtures, *Journal of Chromatography B* 770 (1-2) (2002) 53–61.
- [83] J.A. Syage, L.C. Short, S.-S. Cai, Atmospheric pressure photoionization - The second source for LC-MS?, *LC GC NORTH AMERICA* 26 (3) (2008) 286+.
- [84] P. Dubreuil, Introduction à la chromatographie, <http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma4.html>.
- [85] A. Patrick, Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III, Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives base docum (ref. article p1492) (2009).
- [86] I. Marchi, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review, *Talanta* 78 (1) (2009) 1–18.
- [87] J.R. Yates, C.I. Ruse, A. Nakorchevsky, Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications, *Annual Review of Biomedical Engineering* 11 (1) (2009) 49–79.
- [88] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, *Analytical Chemistry* 78 (7) (2006) 2113–2120.
- [89] M. Nappi, C. Weil, C.D. Cleven, L.A. Horn, H. Wollnik, R.G. Cooks, Visual representations of simulated three-dimensional ion trajectories in an ion trap mass spectrometer, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 161 (1-3) (1997) 77–85.
- [90] F. Sadoun, H. Virelizier, P.J. Arpino, Packed-column supercritical fluid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 647 (2) (1993) 351–359.
- [91] Y. Hsieh, L. Favreau, K.-C. Cheng, J. Chen, Chiral supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of pindolol and propranolol in metabolic stability samples, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (21) (2005) 3037–3041.
- [92] Y. Hsieh, L. Favreau, J. Schwerdt, K.-C. Cheng, Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometric method for analysis of pharmaceutical compounds in metabolic stability samples, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 40 (3) (2006) 799–804.
- [93] K. Yamaguchi, Cold-spray ionization mass spectrometry: Principle and applications, *Journal of mass spectrometry JMS* 38 (5) (2003) 473–490.
- [94] M.C. Ventura, W.P. Farrell, C.M. Aurigemma, M.J. Greig, Packed Column Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry for High-Throughput Analysis. Part 2, *Anal. Chem.* 71 (19) (1999) 4223–4231.

- [95] G. Lavison-Bompard, D. Thiébaud, J.-F. Beziau, B. Carrazé, P. Valette, X. Duteurtre, J.-C. Tabet, Hyphenation of atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry to supercritical fluid chromatography for polar car lubricant additives analysis, *Journal of chromatography. A* 1216 (5) (2009) 837–844.
- [96] J.F. Anacleto, L. Ramaley, R.K. Boyd, S. Pleasance, M.A. Quilliam, P.G. Sim, F.M. Benoit, Analysis of polycyclic aromatic compounds by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry using atmospheric-pressure chemical ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 5 (4) (1991) 149–155.
- [97] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: from hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds, *Journal of chromatography. A* 1339 (2014) 174–184.
- [98] Y. Fujito, Y. Hayakawa, Y. Izumi, T. Bamba, Importance of optimizing chromatographic conditions and mass spectrometric parameters for supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1508 (2017) 138–147.
- [99] D. Wolrab, P. Frühauf, C. Gerner, Direct coupling of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids and related compounds: Comparing electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization, *Analytica Chimica Acta* 981 (2017) 106–115.
- [100] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.-F. Tranchant, É. Lesellier, Contribution of Supercritical Fluid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry and UV detections for the analysis of a complex vegetable oil – Application for characterization of a *Kniphofia uvaria* extract, *Comptes Rendus Chimie* 19 (9) (2016) 1113–1123.
- [101] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.-F. Tranchant, E. Lesellier, Hyphenation of ultra high performance supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation high resolution mass spectrometry: Part I. Study of the coupling parameters for the analysis of natural non-polar compounds, *Journal of chromatography. A* 1509 (2017) 132–140.
- [102] F. Jumaah, S. Larsson, S. Essén, L.P. Cunico, C. Holm, C. Turner, M. Sandahl, A rapid method for the separation of vitamin D and its metabolites by ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1440 (2016) 191–200.
- [103] E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig, E. Lesellier, C. West, Comparison of ultra-high performance methods in liquid and supercritical fluid chromatography coupled to electrospray ionization - mass spectrometry for impurity profiling of drug candidates, *Journal of chromatography. A* 1472 (2016) 117–128.
- [104] F. Lei, C. Li, S. Zhou, D. Wang, Y. Zhao, Y. Wu, Hyphenation of supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry for fast determination of four aflatoxins in edible oil, *Rapid communications in mass spectrometry RCM* 30 Suppl 1 (2016) 122–127.
- [105] N.O. Pretorius, C.M. Willemsse, A. Villiers, H. Pasch, Combined size exclusion chromatography, supercritical fluid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of complex aliphatic polyesters, *Journal of chromatography. A* 1330 (2014) 74–81.
- [106] A. Sen, C. Knappy, M.R. Lewis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, N.W. Smith, Analysis of polar urinary metabolites for metabolic phenotyping using supercritical fluid chromatography and mass spectrometry, *Journal of chromatography. A* 1449 (2016) 141–155.
- [107] R. Berkecz, M. Lísa, M. Holčápek, Analysis of oxylipins in human plasma: Comparison of ultrahigh-performance liquid chromatography and ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1511 (2017) 107–121.
- [108] M. Méjean, A. Brunelle, D. Touboul, Quantification of tocopherols and tocotrienols in soybean oil by supercritical-fluid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry* 407 (17) (2015) 5133–5142.
- [109] V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková, Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography

- mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum, *Analytica Chimica Acta* 934 (2016) 252–265.
- [110] V. Desfontaine, L. Nováková, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Liquid chromatography and supercritical fluid chromatography as alternative techniques to gas chromatography for the rapid screening of anabolic agents in urine, *Journal of chromatography. A* 1451 (2016) 145–155.
- [111] D. Giuffrida, M. Zoccali, S.V. Giofrè, P. Dugo, L. Mondello, Apocarotenoids determination in *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero, by supercritical fluid chromatography-triple-quadrupole/mass spectrometry, *Food chemistry* 231 (2017) 316–323.
- [112] Y. Cho, M.-H. Choi, B. Kim, S. Kim, Supercritical fluid chromatography coupled with in-source atmospheric pressure ionization hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for compound speciation, *Journal of chromatography. A* 1444 (2016) 123–128.
- [113] T. Kind, O. Fiehn, Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC bioinformatics* 8 (2007) 105.
- [114] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Oresic, MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC bioinformatics* 11 (2010) 395.
- [115] S. Wolf, S. Schmidt, M. Müller-Hannemann, S. Neumann, In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra, *BMC bioinformatics* 11 (2010) 148.
- [116] C. Ruttkies, E.L. Schymanski, S. Wolf, J. Hollender, S. Neumann, MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation, *Journal of cheminformatics* 8 (2016) 3.
- [117] CASMI contest.

# Annexe 1: Principe des différents organes d'un spectromètre de masse

---

## Les sources d'ionisation:

Les sources d'ionisation peuvent être classées en plusieurs catégories. Le premier groupe composé de sources d'ionisation fonctionnant à pression réduite (ionisation électronique (EI), ionisation chimique (CI) par exemple). Ce type d'ionisation est habituellement employé pour les molécules volatiles et thermiquement résistantes et en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. En ionisation électronique un faisceau d'électrons énergétique (70eV) va bombarder l'échantillon avec la formation de cations radicalaires et d'ions fragments. Le spectre de masse obtenu permet d'avoir des informations structurales sur la molécule analysée soit en utilisant des bases de données soit en utilisant les règles de fragmentations. En ionisation chimique (CI) un gaz réactif (ionisé par EI) est utilisé pour créer des ions protonés ( $[M+H]^+$ ) par échange de protons ou des adduits  $[M+GH]^+$ . En fonction de l'affinité protonique du gaz employé (ammoniac, isobutane, méthane, hydrogène,...) et de l'analyte, on aura accès soit à des fragments de la molécule à analyser soit à l'ion moléculaire soit à un mélange des deux. De plus ces sources d'ionisation fonctionnent à pression réduite et ne tolèrent pas des débits de solvants trop importants. Le fait que la phase mobile SFC soit sous pression (au-delà de 100 bars) et avec un débit d'environ 1 mL/min sera un obstacle à utiliser ces sources.

Dans le cas de couplages avec la LC classique ou pour l'analyse de composés polaires, thermiquement fragiles ou bien peu volatils, d'autres types d'ionisation seront préférés. Ainsi, les sources travaillant à pression atmosphérique sont à privilégier lors des couplages avec la chromatographie en phase liquide et donc par conséquent adaptables aux spécificités de la SFC. Les sources à pression atmosphérique les plus répandues sont l'ESI (« ElectroSpray Ionization »), l'APCI (« Atmospheric Pressure Chemical Ionization ») et l'APPI (« Atmospheric Pressure PhotoIonization »). Ces trois sources d'ionisation à pression atmosphérique se distinguent par leur mode de fonctionnement et la gamme de produits qu'elles seront capables d'ioniser. (Figure I-30).

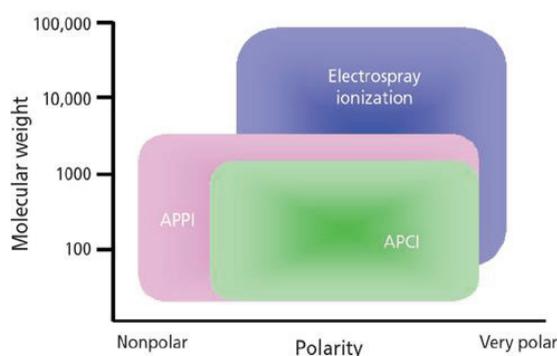


Figure I-30 : Zone de masses moléculaires et de polarités optimales pour l'utilisation de chacune des trois sources à pression atmosphérique [83]

Dans la source ESI, l'échantillon est infusé et introduit via un capillaire métallique sur lequel un potentiel est appliqué (Figure I-31). En sortie de ce capillaire, un spray est formé à l'aide d'un gaz de nébulisation (généralement de l'azote). Les gouttelettes formées rencontrent un flux d'azote chaud à contre-courant qui conduit à l'évaporation progressive du solvant. Le premier effet en est la diminution de la taille de la gouttelette ainsi que, corrélativement, l'augmentation de la densité de charges au sein de ces gouttelettes. Lorsque la répulsion coulombienne excède la tension superficielle de la gouttelette (limite de Rayleigh), celle-ci explose en formant des gouttelettes de seconde génération, beaucoup plus petites. Après plusieurs étapes successives d'évaporation et d'explosion coulombienne on obtient des ions désolvatés en phase gazeuse. Cela se traduit par la production d'ions en phase gazeuse, physiquement intacts et pouvant porter plusieurs charges en raison de l'attachement de protons aux sites basiques des molécules (dans le cas du mode positif).

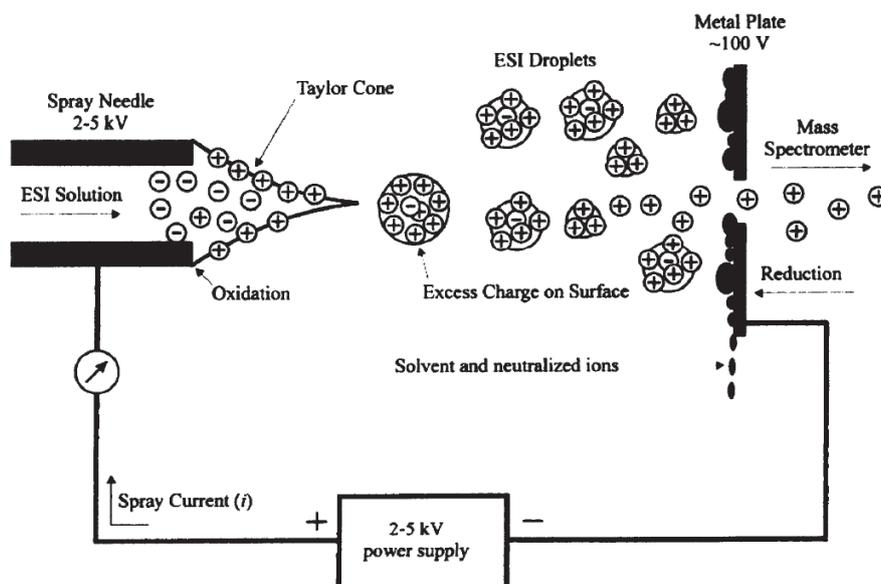


Figure I-31 : Schéma de principe d'une source d'ionisation ESI [84]

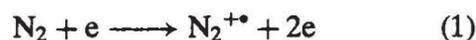
Les molécules sont généralement détectées sous la forme d'ions moléculaires mono chargés ( $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ ), multichargés ( $[M+nH]^{n+}$  ou  $[M-nH]^{n-}$ ) ou sous la forme d'adduits tels que des adduits sodium ou potassium ( $[M+Na]^+$  ou  $[M+K]^+$ ) pour le mode positif ou des adduits chlorés ( $[M+Cl]^-$  ou  $[M+EtO]^-$ ) en mode négatif. L'ionisation en mode + ou - est régie par l'acido-basicité de l'analyte, les composés basiques répondront mieux en ESI+ et les acides et neutres en ESI-. On privilégiera cette source pour les molécules de hautes masses moléculaires et avec un caractère polaire prononcé.

La source APCI utilise un nébuliseur pneumatique à azote pour former un aérosol à l'intérieur d'une chambre (le vaporiseur) chauffée à des températures élevées (entre 350 °C et 500 °C) (Figure I-32). Dans le vaporiseur, l'effluent de la colonne de chromatographie (solvants + analytes) ou le soluté analysé par infusion est chauffé et se mélange avec le gaz nébuliseur (ou gaz de transport) pour conduire les analytes vers l'électrode à décharge couronne constituée d'une aiguille et la chambre de nébulisation (volume de la source) qui sert de contre-électrode.

Dans cette zone, la différence de potentiel élevée (entre  $\pm 3$  et  $\pm 6$  kV) appliquée sur cette aiguille, provoque une décharge couronne (décharge électrique lumineuse) de  $\sim 2-3 \mu A$ . Cette décharge

est une source constante d'électrons pour le processus d'ionisation en APCI : elle ionise l'air ambiant et crée un plasma (*i.e.* pseudo équilibre entre espèces neutres, ionisées et électrons, autour de la pointe de l'aiguille).

Le flux d'azote lors de son passage à proximité de la décharge couronne va former un plasma constitué d'azote neutre, d'électrons et d'azote sous forme de cations radicalaires ( $N_2^+$ ). Ces derniers vont réagir avec le solvant d'élution ou make up protique ( $H_2O$ ,  $MeOH$ ,...) pour donner des espèces protonées. Ces espèces seront l'espèce réactive qui pourra transférer son proton à l'analyte. Ces réactions chimiques donnent lieu à l'ionisation des molécules d'analytes comme suit :



En fonction du potentiel appliqué sur l'aiguille (positif ou négatif), les réactions chimiques induites ne donneront pas accès aux mêmes ions moléculaires. En mode positif, les ions radicalaires du plasma vont fournir un H à l'analyte et on formera alors des ions de type  $[M+H]^+$ . En mode négatif, les ions du solvant vont arracher un H de la molécule de soluté et on obtiendra des ions du type  $[M-H]^-$

Cette source est généralement utilisée pour la détection de composés moins polaires que ceux détectables en ESI et donc un peu plus difficilement protonables. Cependant la méthode d'ionisation est moins douce que l'ESI car les molécules thermolabiles peuvent être affectées par le chauffage. De plus, le processus d'échange de charge peut mener à une fragmentation des ions pseudo-moléculaires.

Du fait du système de chauffage de la source permettant la volatilisation de l'effluent, il est possible d'utiliser la source APCI à des débits plus élevés que l'ESI (allant jusqu'à 2 mL/min).

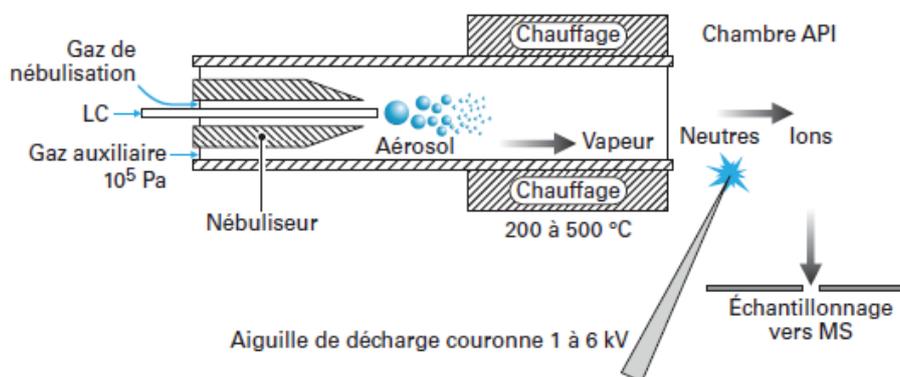


Figure I-32 : Schéma de principe d'une source d'ionisation APCI [85]

Enfin, la source APPI utilise le même système de nébulisation que l'APCI, la différence entre ces deux sources d'ionisation provient de comment l'énergie est apportée afin d'ioniser les analytes. Si dans le cas de l'APCI, les électrons sont produits en continu par la décharge couronne et le plasma qui en résulte, dans le cas de l'APPI, une lampe UV émettrice de photons est utilisée afin de déclencher le processus de photo-ionisation. Si la géométrie de source est la même entre les deux, l'APPI aura un fonctionnement optimale pour un débit de phase liquide beaucoup moins important (50 µL/min contre 1mL/min pour l'APCI) [86]. Bien que l'APPI couvre plus de possibilité en comparaison à l'APCI (cf. Figure I-30), la sensibilité moindre et la présence d'ions moléculaires de type  $M^+$  et  $[M+H]^+$  compliquent le spectre de masse obtenu. De plus, il faut que les molécules absorbent les photons UV pour être ionisées. Ainsi, il n'est pas possible d'observer toutes les espèces chimiques. En employant ESI et APCI en mode négatif et positif, une large gamme de masse molaire et de polarité sera couverte par nos expériences.

### Les analyseurs

Une fois les analytes ionisés au sein de la source, un second module est nécessaire afin de parvenir à mesurer le rapport masse sur charge de ces derniers : c'est l'analyseur. Tout comme les sources d'ionisation, il en existe plusieurs types avec leurs caractéristiques et leurs avantages propres. Les analyseurs se distinguent par leurs grandeurs caractéristiques comme la possibilité de faire de la fragmentation, la sensibilité, la résolution, le temps de scan et la gamme dynamique. Le Tableau I-6 donne les performances et caractéristiques de certains de ces analyseurs. Dans le contexte de cette thèse, la spectrométrie de masse a pour but premier de donner à la fois des informations précises en termes de masse moléculaire mais également des renseignements sur la structure des différents analytes détectés. Pour cette raison, nous nous focaliserons dans ce chapitre sur les analyseurs offrant la possibilité de fragmenter, à savoir : FT-ICR/MS, IT, ToF, triple-Quadripôle et Orbitrap.

Tableau I-6 : Performances des principaux analyseurs en MS [87]

Analyseur	Résolution	Précision sur la mesure de masse (ppm)	Sensibilité	Gamme dynamique	Vitesse de scan
LIT (Linear Ion Trap) ou LTQ (Linear Trap Quadrupole)	2000	100	Femtomole	$10^4$	Rapide
Triple Quadrupole (TQ)	2000	100	Attomole	$10^6$	Rapide
LTQ-Orbitrap	100 000	2	Femtomole	$10^4$	Lente
LTQ-FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), Q-FTICR	500 000 - 1 000 000	<2	Femtomole	$10^4$	Lente
Q-ToF (Time of Flight), IT-ToF	10 000 - 60 000	2-5	Attomole	$10^6$	Rapide
Q-LIT	2000	100	Attomole	$10^6$	Modérée

- FT-ICR/MS :

L'analyseur FT-ICR/MS permet par mesure de la fréquence de résonance cyclotronique de mesurer le rapport  $m/z$  d'ions. Les ions sont transférés dans la cellule ICR (Ion cyclotron resonance) via un train d'optiques ioniques composé de multi pôles. Il est possible d'avoir un quadripôle ou un piège ionique linéaire en amont. La cellule ICR baigne dans un champ magnétique produit par un aimant supraconducteur de 7 à 21 T pour les instruments modernes. La cellule ICR est composée de quatre électrodes comme montré sur la Figure I-33. Deux pour exciter le paquet d'ions et lui donner un mouvement cohérent et deux utilisées pour la détection du courant induit par le passage des ions. La fréquence de rotation cyclotronique mesurée pour une population d'ions est une somme de signaux sinusoïdaux appelé transient il est possible d'avoir le spectre de fréquences en appliquant une transformé de Fourier. Connaissant le champ magnétique il est alors possible d'obtenir le spectre de masse ( $f = \frac{qB}{2\pi m}$ ). Cette technique permet d'atteindre des résolutions élevées de l'ordre de 100 à 1000 k et une précision en masse de l'ordre du ppm.

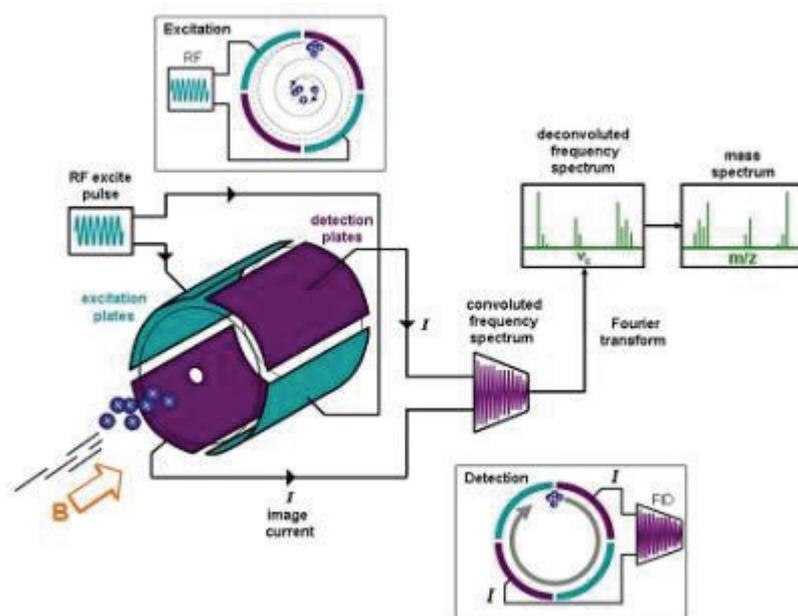


Figure I-33 : Principe d'une cellule ICR

- Orbitrap :

L'Orbitrap se compose de deux électrodes : l'une, externe, est creuse et la seconde, centrale, est placée coaxialement, en forme de fuseau (Cf. Figure I-34). Cette dernière est portée à une tension alternative à la polarité opposée aux ions. La forme particulière des électrodes est en effet inspirée par la forme des champs électriques. Une des particularités de cet analyseur se situe au niveau de l'injection. En effet, les ions sont injectés dans la cellule Orbitrap par paquet, d'où la nécessité d'utiliser un système de stockage d'ions (piège ionique) qui sont produits en continu, avant de les envoyer en même temps vers l'Orbitrap. Le mouvement des ions selon l'axe de l'électrode (z) est directement proportionnel au  $m/z$  de l'analyte. De plus, ce mouvement génère un courant induit

enregistré par le détecteur qui est placé sur les électrodes creuses. L'image du courant induit est un signal transitoire qui est ensuite transformé en spectre de fréquence par la transformation de Fourier, puis le spectre de fréquence est facilement converti en spectre de  $m/z$  pour obtenir les spectres de masse.

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[ \frac{r}{R_m} \right] + C$$

Les spectromètres de masse type Orbitrap sont utilisés dans plusieurs domaines, grâce à sa haute résolution qui reste inférieure à celle du FT-ICR mais qui peut atteindre les 100 000 pour des masses autour de 400  $m/z$  [88]. De par sa haute résolution, l'Orbitrap a une précision en masse très haute. On parviendra à des mesures  $< 1$  ppm d'écart avec une calibration interne et environ 3 ppm avec une calibration externe.

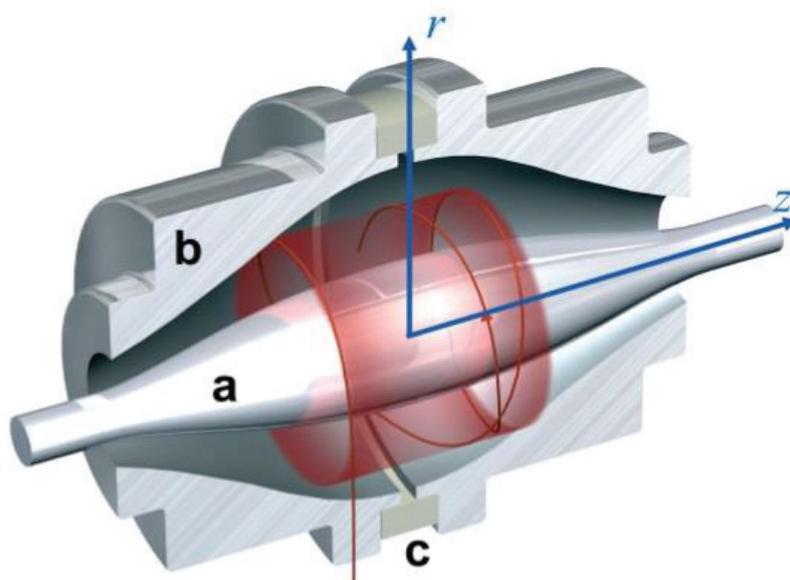


Figure I-34 : Schéma d'un analyseur Orbitrap

- Quadripôle :

Cet analyseur est composé de 4 électrodes cylindriques. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et soumises au même potentiel ( $U + V\cos(\omega t)$ ). Les deux autres électrodes sont soumises à une tension opposée  $-(U + V\cos(\omega t))$ . Le potentiel crée au sein du quadripôle permet donc de guider les ions en balayant le rapport  $U/V$ . Les valeurs de tensions appliquées vont définir une gamme de stabilité pour les ions traversant l'analyseur. De ce fait, il sera possible de filtrer les ions voulus. L'intérêt de cet analyseur est de pouvoir analyser une gamme de masse (full scan) ou de filtrer un ou des ions donnés (Single Ion Monitoring). Il existe également la possibilité de coupler trois quadripôles à la suite. Cet analyseur triple quadripôle va pouvoir être utilisé de différentes manières. Un des modes les plus utilisés en quantification ciblée est le mode Multiple Reaction Monitoring. Dans ce cas, le premier quadripôle permet de sélectionner un rapport  $m/z$  donné souvent l'ion moléculaire, le second permet la fragmentation par collision (CID) et le dernier filtre sur un ion fragment caractéristique de l'ion moléculaire (ou plusieurs). Ainsi on a un gain très important en sensibilité.

- Le piège ionique / IT :

L'analyseur à piège ionique existe sous deux types : 2D Linear Ion Trap et 3DCircular Ion Trap. Le CIT est constitué d'une électrode circulaire où on applique un courant continu et un courant alternatif, et de deux électrodes chapeaux. Les potentiels appliqués permettent la création d'un champ quadripolaire au centre du piège ionique où les ions sont piégés, environ  $1 \text{ cm}^3$  ce qui limite la quantité d'ions qu'il est possible de piéger (dû à la charge d'espace). Du gaz est injecté à très basse pression (He) pour thermaliser les ions, ainsi il est possible d'augmenter l'efficacité de piégeage. Les équations de Mathieu régissent la trajectoire des ions dans un environnement électrostatique, la résolution de ces dernières pour un piège ionique quadripolaire donne un digramme de stabilité avec en ordonné la tension  $U_{dc}$  et en abscisse la tension  $V_{rf}$ . La trajectoire des ions va donc dépendre du rapport  $m/z$ . Dans le cas d'une trajectoire stable, une forme de huit dans l'espace est observée avec des micros mouvements tout au long de trajectoire. Comme le piège est en trois dimensions, pour que les ions restent au centre, il faut que les ions soient stabilisés dans trois dimensions, dont chaque dimension est assimilée à un axe (x, y et z).

L'intérêt de cet analyseur réside dans sa capacité à isoler et à fragmenter des ions. En effet, les ions dans le piège ionique sont caractérisés par deux fréquences, une radiale et une axiale [89]. Pour les expulser on applique un courant alternatif sur les électrodes chapeaux, où l'amplitude est constante et suffisamment grande, tandis que la fréquence axiale augmente progressivement. On appelle cela un balayage de fréquences qui vont progressivement éjecter tous les ions. Afin d'isoler un ion en particulier, il suffit d'omettre la fréquence axiale qui lui correspond. Généralement on omet une gamme autour de cette fréquence et cette largeur de gamme correspond à la fenêtre d'isolement. Plus la fenêtre est fine, plus le spectre est propre, mais si la fenêtre est trop étroite on risque d'éjecter les ions d'intérêt. Une fois l'ion précurseur isolé, on applique un potentiel et on ajoute un gaz neutre afin d'induire une collision et d'augmenter l'énergie interne de l'ion précurseur. Une fois la fragmentation réalisée les ions sont expulsés vers le détecteur.

- Temps de vol /ToF (Time of Flight) :

Le principe de cet analyseur est simple, il repose sur le temps parcouru des ions dans un tube de vol.

L'analyseur à temps de vol est composé d'une zone d'accélération dans lequel un potentiel va être appliqué aux ions ( $E_p = qV$ ) puis ils vont se trouver dans une zone de vol libre, ainsi leur  $E_{\text{potentiel}}$  va se transformer en  $E_{\text{cinétique}}$  ( $E_c = \frac{m \times v^2}{2}$ ).

On a alors  $E_p = E_c$  et donc en remplaçant  $\frac{m \times v^2}{2} = q \times E$

En mesurant le temps d'arrivée des ions au détecteur connaissant la longueur du temps de vol et la tension d'accélération on a accès à  $m/z$ .

La dispersion en énergie des ions dans la zone d'accélération fait qu'il y a besoin de refocaliser les ions pendant leur vol libre pour corriger ce biais. Ainsi, la plupart des analyseurs à temps de vol utilisent des réflectrons (miroirs électrostatiques). La précision sur ces analyseurs varie entre 1 et 10 ppm.

Ces différents analyseurs peuvent être utilisés seuls ou combinés. L'intérêt est de pouvoir créer des analyseurs hybrides en couplant certains analyseurs. Les exemples les plus courants sont l'IT-ToF, le Q-ToF ou bien encore l'Orbitrap-IT. Ces expériences permettent de faire de la spectrométrie de masse en tandem.

Dans le cadre de cette thèse, trois types de spectromètres ont pu être employés. Il s'agit de l'IT-ToF et un simple quadripôle en couplage avec la SFC et un FT-ICR/MS.

## Annexe 2 : Composés détectés par GC et GCxGC[43]

Nom	C	H	O	N	Masse moléculaire
Methanol	1	4	1	0	32.03
Ethanol	2	6	1	0	46.04
Proprenol	3	6	1	0	58.04
Ethendiol	2	6	2	0	62.04
Isobutanol	4	10	1	0	74.07
Butenol	4	8	1	0	72.06
Dimethylpentanol	7	16	1		116.12
cyclopentanol	5	10	1	0	86.07
propanetriol	3	8	3	0	92.05
Dioxolane-methanol	4	8	3	0	104.05
Dimethoxyethanol	4	10	3	0	106.06
Dimethylcyclohexanol	8	16	1	0	128.12
octanol	8	18	1	0	130.14
isopropylcyclohexanol	9	18	1	0	142.14
xylitol	5	12	5	0	152.07
formic acid	1	2	2	0	46.01
acetic acid	2	4	2	0	60.02
propenoic acid	3	4	2	0	72.02
propionic acid	3	6	2	0	74.04
hydroxy acetic acid	2	4	3	0	76.02
isocrotonic acid	4	6	2	0	86.04
butyric acid	4	8	2	0	88.05
pentadienoic acid	5	6	2	0	98.04
methyl butenoic acid	5	8	2	0	100.05
valeric acid	5	10	2	0	102.07
hydroxybutiric acid	4	8	3	0	104.05
levulinic acid	5	8	3	0	116.05
hexanoic acid	6	12	2	0	116.08
propylpentanedioic acid	8	14	4	0	174.09
hydroxytridecanoic acid	13	26	3	0	230.19
formaldehyde	1	2	1	0	30.01
acetaldehyde	2	4	1	0	44.03
propenal	3	4	1	0	56.03
propanal	3	6	1	0	58.04

ethanedial	2	2	2	0	58.01
glycoaldehyde	2	4	2	0	60.02
crotonaldehyde	4	6	1	0	70.04
butanal	4	8	1	0	72.06
oxopropanal	3	4	2	0	72.02
hydroxypropanal	3	6	2	0	74.04
methylbutenal	5	8	1	0	84.06
pentenal	5	10	1	0	86.07
succinaldehyde	4	6	2	0	86.04
glyceraldehyde	3	6	3	0	90.03
glutaraldehyde	5	8	2	0	100.05
octanal	8	16	1	0	128.12
acetone	3	6	1	0	58.04
butanone	4	8	1	0	72.06
acetol	3	6	2	0	74.04
cyclopentanone	5	8	1	0	84.06
pentanone	5	10	1	0	86.07
butanedione	4	6	2	0	86.04
hydroxybutano ne	4	8	2	0	88.05
cyclopentendione	5	6	2	0	98.04
cyclohexanone	6	10	1	0	98.07
hexanone	6	12	1	0	100.09
hydroxypentanone	5	10	2	0	102.07
dimethylcyclopentenone	7	10	1	0	110.07
dimethylcyclopentanone	7	12	1	0	112.09
hexanedione	6	10	2	0	114.07
trimethylcyclopentenone	8	12	1	0	124.09
methylheptanone	8	16	1	0	128.12
acetyloxybutanone	6	10	3	0	130.06
methyl formate	2	4	2	0	60.02
methyl acetate	3	6	2	0	74.04
ethyl formate	3	6	2	0	74.04
vinylacetate	4	6	2	0	86.04
ethyl acetate	4	8	2	0	88.05
methylbutanoate	5	10	2	0	102.07
methylpentanoate	6	12	2	0	116.08
hydroxy propanone acetate	5	8	3	0	116.05
propenyl butanoate	7	12	2	0	128.08
hydroxybutanone acetate	6	10	3	0	130.06
allyl acetylacetate	7	10	3	0	142.06
isobutylisobutanoate	8	16	2	0	144.12
methyl octanoate	9	18	2	0	158.13

ethyl methyl succinate	7	12	4	0	160.07
hexene	6	12	0	0	84.09
dimethylcyclopentene	7	12	0	0	96.09
ethoxybutane	6	14	1	0	102.10
ethoxypentane	7	16	1	0	116.12
decan	10	22	0	0	142.17
dibutylformamide	9	19	1	1	157.15
methylfluorene	14	12	0	0	180.09
fluorenol	13	10	1	0	182.07
ditolylmethane	15	16	0	0	196.13
furan	4	4	1	0	68.03
methylfuran	5	6	1	0	82.04
furanone	4	4	2	0	84.02
Vinylfuran	6	6	1	0	94.04
furfural	5	4	2	0	96.02
furfuryl alcohol	5	6	2	0	98.04
furandione	4	2	3	0	98.00
valerolactone	5	8	2	0	100.05
propylfuran	7	10	1	0	110.07
methylfurandione	5	4	3	0	112.02
hydroxymethylfurfural	6	6	3	0	126.03
methyl furoate	6	6	3	0	126.03
dimethylhydroxyfuranone	6	8	3	0	128.05
dimethoxytetrahydrofuran	6	12	3	0	132.08
heptylbutyrolactone	11	20	2	0	184.15
dihydropyran	5	8	1	0	84.06
pyranone	5	4	2	0	96.02
pyranedione	5	4	3	0	112.02
hydroxydihydropyranone	5	6	3	0	114.03
hydroxy methyl pyran one	6	6	3	0	126.03
dihydroxymethylpyranone	6	6	4	0	142.03
pyridine	5	5	0	1	79.05
methylpyridine	6	7	0	1	93.06
pyridinol	5	5	1	1	95.04
formylpyrrol	5	5	1	1	95.04
acetylpyrrol	6	7	1	1	109.06
levoglucosenone	6	6	3	0	126.03
anhydroarabinofuranose	5	8	4	0	132.04
anhydroxylofuranose	5	8	4	0	132.04

levoglucosan	6	10	5	0	162.05
anhydrogalactopyranose	6	10	5	0	162.05
melibiose	12	22	11	0	342.12
lactose	12	22	11	0	342.12
benzene	6	6	0	0	78.05
toluene	7	8	0	0	92.06
styrene	8	8	0	0	104.06
ethylbenzene	8	10	0	0	106.08
xylene	8	10	0	0	106.08
propynylbenzene	9	8	0	0	116.06
indene	9	8	0	0	116.06
ethyltoluene	9	12	0	0	120.09
naphtalene	10	8	0	0	128.06
methyl indene	10	10	0	0	130.08
methylnaphtalene	11	10	0	0	142.08
ethylindene	11	12	0	0	144.09
dimethylnaphtalene	12	12	0	0	156.09
benzylalcohol	7	8	1	0	108.06
benzofuran	8	6	1	0	118.04
ethenyloxybenzene	8	8	1	0	120.06
dihydrobenzofuran	8	8	1	0	120.06
acetophenone	8	8	1	0	120.06
methoxymethylbenzene	8	10	1	0	122.07
benzoic acid	7	6	2	0	122.04
dihydroxytoluene	7	8	2	0	124.05
methylbenzofuran	9	8	1	0	132.06
phenyl propanone	9	10	1	0	134.07
methoxydimethylbenzen	9	12	1	0	136.09
methyl naphtol	11	10	1	0	158.07
methoxymethylbenzofuran	10	10	2	0	162.07
trimetoxybenzene	9	12	3	0	168.08
biphenylol	12	10	1	0	170.07
naphtoic acid	11	8	2	0	172.05
methoxynaphtol	11	10	2	0	174.07
trimethoxy methyl benzene	10	14	3	0	182.09
methoxy naphtoic acid	12	10	3	0	202.06
methoxymethyl nitrophtalic acid	10	9	7	1	255.04
benzaldehyde	7	6	1	0	106.04
methylbenzaldehyde	8	8	1	0	120.06
hydroxybenzaldehyde	7	6	2	0	122.04
phenylpropenal	9	8	1	0	132.06

hydroxymethylbenzaldehyde	8	8	2	0	136.05
dihydroxybenzaldehyde	7	6	3	0	138.03
ethoxymethoxybenzaldehyde	10	12	3	0	180.08
anisol	7	8	1	0	108.06
methyl anisol	8	10	1	0	122.07
dimethylanisol	9	12	1	0	136.09
phenol	6	6	1	0	94.04
cresol	7	8	1	0	108.06
vynilphenol	8	8	1	0	120.06
ethylphenol	8	10	1	0	122.07
dimethylphenol	8	10	1	0	122.07
allylphenol	9	10	1	0	134.07
propenylphenol	9	10	1	0	134.07
propylphenol	9	12	1	0	136.09
ethylmethylphenol	9	12	1	0	136.09
trimethylphenol	9	12	1	0	136.09
allylmethylphenol	10	12	1	0	148.09
di tert buthyl methyl phenol	15	24	1	0	220.18
catechol	6	6	2	0	110.04
resorcinol	6	6	2	0	110.04
hydroquinone	6	6	2	0	110.04
methylcatechol	7	8	2	0	124.05
ethylcatechol	8	10	2	0	138.07
methoxycatechol	7	8	3	0	140.05
guaiacol	7	8	2	0	124.05
methylguaiacol	8	10	2	0	138.07
ethylguaiacol	9	12	2	0	152.08
vanilin	8	8	3	0	152.05
syringol	8	10	3	0	154.06
eugenol	10	12	2	0	164.08
homovanilin	9	10	3	0	166.06
methylsyringol	9	12	3	0	168.08
vanilic acid	8	8	4	0	168.04
coniferaldehyde	10	10	3	0	178.06
coniferol	10	12	3	0	180.08
vinylsyringol	10	12	3	0	180.08
guaiacyl actone	10	12	3	0	180.08
propioguaiacone	10	12	3	0	180.08
dimethoxyacetophenone	10	12	3	0	180.08
syringaldehyde	9	10	4	0	182.06
hydroxypropylguaiacol	10	14	3	0	182.09
ethylsyringol	10	14	3	0	182.09

allylsyringol	11	14	3	0	194.09
propenylsyringol	11	14	3	0	194.09
ferulic acid	10	10	4	0	194.06
propylsyringol	11	16	3	0	196.11
sinapaldehyde	11	12	4	0	208.07
syringyl acetone	11	14	4	0	210.09
sinapyl alcohol	11	14	4	0	210.09
homosyringic acid	10	12	5	0	212.07