

Université de Montréal

Analyse des composantes de la propolis par GC-MAB/MS

Par

Marilyn Simon

Département de chimie

Faculté des Arts et de Sciences

Travail présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M.Sc) en chimie

Novembre 2005

©Marilyn Simon



QD
3
054
2006
V.014

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

Analyse des composantes de la propolis par GC-MAB/MS

présenté par :

Marilyn Simon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Thibault, Président-rapporteur

Michel J. Bertrand, Directeur de recherche

Karen Waldron, Membre du jury

SOMMAIRE

Il existe dans la nature plusieurs sources de substances bioactives qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. Les échantillons qu'il est possible d'obtenir à partir de ces sources sont souvent très complexes et la détermination de leur composition ainsi que des substances actives qu'ils contiennent requiert des méthodes analytiques poussées.

L'objectif du présent projet est d'utiliser la technique d'ionisation par bombardement d'atome métastable (MAB) pour effectuer la caractérisation de la propolis par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MAB/MS).

La propolis qui provient de la cire d'abeille est un mélange complexe qui a déjà été analysé par GC/MS. Cependant, la caractérisation structurale de ces composés suite à l'ionisation par impact électronique est limitée par la co-élution de certains composés et la stabilité des ions formés donne lieu à une fragmentation significative et une abondance réduite des ions moléculaire correspondants.

L'ionisation par MAB est une nouvelle technique d'ionisation qui permet de contrôler la fragmentation et d'effectuer de l'ionisation sélective. De ce fait, il est possible de générer des ions moléculaires à partir de substances labiles en contrôlant l'énergie d'ionisation (ionisation douce). De plus, en contrôlant précisément l'énergie d'ionisation il est possible d'effectuer de l'ionisation sélective qui permet de simplifier les chromatogrammes et de mettre en évidence des substances qui coéluent dans les conditions d'ionisation par impact électronique.

Cette nouvelle approche que nous comptons utiliser pour l'analyse de la propolis pourra s'étendre à l'analyse de toutes substances naturelles et

fournira un nouvel outil analytique pour l'analyse de ces mélanges complexes.

Mots-clés : Spectrométrie de masse, chromatographie gazeuse, bombardement d'atomes métastables, propolis

SUMMARY

There are, in nature, several sources of bioactive substances that can be used for therapeutic purposes. Samples that can be obtained from these sources are often very complex and the determination of their composition and of the active substances they contain require advanced analytical methods.

The main goal of this project is to use the ionization technique metastable atom bombardment (MAB) to characterize propolis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MAB/MS).

Propolis that comes from beeswax is a complex mixture that has already been analysed by GC-MS using electron impact ionization. However, the structural characterization of these samples can be limited by the chromatographic resolution and the extensive fragmentation of ionized molecules giving rise to few molecular ions.

Metastable atom bombardment is a new ionization technique allowing selective analyte ionization with controlled fragmentation. Thus, it is possible to generate molecular ions from labile compounds by controlling the ionization energy (soft ionization). Furthermore, by controlling the ionization energy, it is possible to selectively ionize classes of molecules thus simplifying chromatograms and enhancing sensitivity compared to more traditional ionization techniques such as electron ionization.

This new approach which we will be used to characterize propolis is also applicable to the characterization of all natural substances and provides a new analytical tool for the characterization of these complex mixtures.

Key words: Mass spectrometry, gas chromatography, metastable atom bombardment, propolis.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	i
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des Figures	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	x
Chapitre 1 : Introduction	1
Chapitre 2 : Éléments théoriques sur l'ionisation Penning et sur la source MAB	5
2.1 Fonctionnement de la source MAB.....	5
2.2 L'ionisation Penning.....	6
2.3 Les états excités métastables.....	8
Chapitre 3 : Éléments théoriques sur la source d'ionisation à impact électronique ..	10
3.1 Fonctionnement de la source par impact électronique.....	10
Chapitre 4 : Revue de la littérature	13
4.1 Définition du propolis et provenance.....	13
4.2 Traitement de la propolis.....	13
4.3 Composition chimique.....	14
4.4 Activité biologique.....	15
4.5 Applications.....	16
Chapitre 5: Partie expérimentale	24
5.1 Extraction de la propolis.....	24
5.2 Dérivation.....	24
5.2.1 Procédure.....	24
5.2.2 Mécanisme.....	25
5.3 Appareil utilisé.....	26
5.3.1 Chromatographie gazeuse–spectrométrie de masse.....	26

5.4	Sources d'ionisation.....	26
5.5	Identification des composés.....	26
Chapitre 6: Résultats et Discussion.....		28
6.1	Choix de la méthode.....	28
6.2	Choix du solvant.....	28
6.3	Composés polaires de la propolis de différentes villes québécoises.....	29
6.3.1	Propolis de Gaspé.....	30
6.3.2	Propolis de Sainte Flavie.....	34
6.3.3	Comparaison des deux échantillons.....	37
6.4	Comparaison de la source MAB à la source par impact électronique.....	39
6.4.1	Comparaison des quatre chromatogrammes.....	39
6.4.2	Comparaison des spectres de masse.....	44
6.5	L'identification des composés à l'aide de la banque de donnés.....	46
6.5.1	Pureté.....	46
6.5.2	Comparaison de la source MAB (He*) à la source IE.....	48
Chapitre 7: Conclusion.....		58
Références.....		62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Caractéristiques des états métastables pour les atomes de gaz rares et l'azote moléculaire.....	8
Tableau 4.1. Composition chimique de la propolis.....	17
Tableau 6.1: L'extraction de la propolis avec différents solvants.....	28
Tableau 6.2. Composition chimique de l'extrait éthanolique de propolis de Gaspé.....	33
Tableau 6.3. Composition chimique de l'extrait éthanolique de propolis de Sainte-Flavie.....	36
Tableau 6.4 : Comparaison de la pureté obtenue avec la source IE et la source MAB pour l'échantillon de Gaspé.....	47
Tableau 6.5 : Comparaison de la pureté obtenue avec la source IE et la source MAB pour l'échantillon de Sainte-Flavie.....	47
Tableau 6.6 : Composés identifiés seulement par MAB(He*) et non pas par EI pour Gaspé.....	55

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Schéma de la source MAB.....	6
Figure 2.2. Processus d'échange électronique lors de l'ionisation Penning de la molécule BC par la particule métastable A*.....	7
Figure 3.1 : Schéma de la source d'ionisation par impact électronique.....	10
Figure 3.2 : Courbe de la variation du courant total des ions par rapport à l'énergie des électrons.....	11
Figure 6.1 : Carte géographique de la région de Gaspésie.....	29
Figure 6.2 : Chromatogrammes de l'échantillon de propolis a) de Gaspé et b) de Sainte-Flavie obtenus avec la source IE.....	32
Figure 6.3 : Structure du cinnamate de cinnamyle (a) et de l'émodine d'aloès (b).....	31
Figure 6.4 : Structure du sucrose	34
Figure 6.5a : Histogramme de la distribution des principales classes de composés présents dans l'extrait éthanolique de propolis de Gaspé et de Sainte-Flavie (avec la source IE).....	38
Figure 6.5b: Histogramme de la distribution des principales classes de composés présents dans l'extrait éthanolique de propolis de Gaspé et de Sainte-Flavie (avec la source MAB(*He)).....	39
Figure 6.6 : Chromatogrammes de la propolis de Sainte-Flavie avec la source MAB(N ₂ [*]) (a), avec la source MAB(Ar [*]) (b), avec la source MAB(He [*]) (c) et avec la source EI(70eV) (d).....	41
Figure 6.7: Spectre de masse du signal de bruit de fond obtenu a) avec la source MAB et b) avec la source IE et l'agrandissement de la région comprise entre m/z 200 et m/z 360.....	43
Figure 6.8 : Spectres de masse du p-hydroxybenzaldehyde (m/z 194) avec la source MAB(N ₂ [*]) (a), avec la source MAB(Ar [*]) (b), avec la source MAB(He [*]) (c) et avec la source EI(70eV) (d)....	44

- Figure 6.9 : Spectres de masse de l'acide salicylique (m/z 282) avec la source MAB(N_2^*) (a), avec la source MAB(Ar^*) (b), avec la source MAB(He^*) (c) et avec la source EI(70eV) (d).....45
- Figure 6.10: Spectre de masse de l'acide hydrocinnamique avec la source IE (70eV) (a), avec la source MAB(He^*) (c) et corrélation avec les spectres obtenus de la banque de données NIST (b et d) pour l'échantillon de Gaspé.....50
- Figure 6.11 : Spectre de masse de l'aldéhyde vanillique avec la source IE (70eV) (a), avec la source MAB(He^*) (c) et corrélation avec les spectres obtenus de la banque de données NIST (b et d) pour l'échantillon de Sainte-Flavie.....51
- Figure 6.12 : Spectre de masse de l'alcool benzylique avec la source IE (70 eV) (a), avec la source MAB(He^*) (c) et corrélation avec les spectres obtenus de la banque de données NIST (b et d) pour l'échantillon de Sainte-Flavie52
- Figure 6.13 : Spectre de masse du D-fructose avec la source MAB(He^*) (a), avec la source IE (70 eV) (c) et corrélation avec les spectres obtenus de la banque de données NIST (b et d) pour l'échantillon de Sainte-Flavie53
- Figure 6.14: Spectre de masse du cinnamate de cinnamyle avec la source MAB(He^*) (a) et avec la source IE (70 eV) (b) pour l'échantillon de Gaspé.....56
- Figure 6.15: Spectre de masse de l'aldéhyde vanillique avec la source IE (70 eV) (a) et avec la source MAB(He^*) (b) pour l'échantillon de Gaspé.....56

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A*/A ^m	Atome à l'état métastable
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CCM	Chromatographie sur couche mince
Da	Dalton
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl
é	électron
E*	Énergie d'excitation de l'espèce métastable
E _{int}	Énergie interne transférée à une molécule
E _k	Énergie cinétique de l'électron éjecté
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
EI	Electron impact (impact électronique)
eV	Électron-volt
GC	Gas chromatography (chromatographie gazeuse)
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectrometry (chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse)
HPLC	High performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
HT-HRGC-MS	High temperature high resolution gas chromatography-mass spectrometry
IE	Impact électronique
M ^{+•}	Ion moléculaire radicalaire
MAB	Metastable atom bombardment (bombardement par des atomes à l'état métastable)
m/z	rapport masse sur charge d'un ion
TIC	Total ion current (courant ionique total)
TMS	Triméthylsilyl

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le professeur Michel J. Bertrand, de m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche.

Je voudrais aussi remercier le docteur Serge Moore pour toute l'aide qu'il m'a apporté tout au long de ma maîtrise et pour ses nombreux conseils.

Je remercie également le docteur Alexandra Furtos pour son soutien et ses conseils qui m'ont permis de venir à bout de ce projet et le docteur Pierre Thibault qui m'a aidé lors de la rédaction de mon mémoire.

J'aimerais aussi remercier toute ma famille et mes amis qui m'ont supporté moralement tout le long de ce projet et avec lesquels j'ai partagé les hauts et les bas. Merci pour la motivation et les encouragements.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont aidée directement ou indirectement durant mes études et lors de la rédaction de mon mémoire.

Finalement, je voudrais remercier particulièrement ma mère, Jacqueline Cassion qui m'a encouragée à poursuivre mes études et qui m'a supportée financièrement durant mes études universitaires.

Chapitre 1 : Introduction

La propolis est une substance résineuse provenant de différentes parties des plantes, très adhésive qui est collectée, transformée et utilisée par les abeilles dont la principale fonction est de sceller et de protéger la ruche [2,4].

En effet, les abeilles s'en servent pour :

- Étancher les trous dans leur nid [1-4].
- Prévenir la décomposition des insectes qui ont été tués par les abeilles après une invasion de la ruche. Elles s'en servent donc pour embaumer les prédateurs [1,3].
- Rendre plus lisse la structure interne des parois internes et protéger l'entrée contre les intrus [2].
- Stériliser la ruche contre les infections microbiennes [13].
- Il a été suggéré que la propolis est en fait responsable du faible taux de bactérie et de moisissure à l'intérieur de la ruche comparativement à l'atmosphère à l'extérieur [28].

L'utilisation de la propolis par les humains remonte au moins à 300 ans avant J-C [2,3]. Cependant, durant les dernières années, l'intérêt porté à ce produit a grandement accru, non seulement comme une source potentielle en médecine traditionnelle, mais aussi comme matière première prometteuse dans l'industrie pharmaceutique [3].

La propolis présente plusieurs activités biologiques et celles-ci sont principalement dues à la présence des flavonoïdes, des acides aromatiques, des acides diterpeniques et des dérivés phénoliques dans la propolis [3,6].

Les effets thérapeutiques de la propolis ont créé un grand intérêt pour sa composition chimique et, au cours des 25 dernières années, les méthodes utilisées pour l'analyse du propolis ont évolué avec la technologie. En effet, on est passé par l'identification de la propolis par des méthodes chromatographiques conventionnelles comme la GC (gaz chromatography) [12], la HPLC (High performance liquid chromatography) [10,12], la CCM (chromatographie sur couche mince) [8,12] à des méthodes plus modernes comme l'ESI-MS (Electrospray ionization mass spectrometry) [7], la GC-MS (Gas chromatography-Mass spectrometry) [6,8,9,10,26] et HT-HRGC-MS (High temperature high resolution gas chromatography-mass spectrometry) [1,11].

De nos jours, les études portant sur la composition chimique de la propolis se font majoritairement avec la spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique. Cette technique comporte de nombreux avantages: les résultats obtenus avec cette source sont reproductibles; la grande quantité de spectres accumulés au cours des années dans les bibliothèques spectrales permettent l'identification rapide et fiable des composés analysés [28]. De plus, la source par impact électronique (IE) a une grande sensibilité, est fiable et est facile à opérer.

Malgré les nombreux avantages qu'elle possède, la source IE comporte quelques limitations. La principale limitation vient du fait que l'énergie interne (pouvant atteindre jusqu'à 10 eV) transférée à la molécule lors de l'ionisation entraîne souvent une fragmentation considérable de celle-ci, ce qui conduit à un spectre de masse complexe [27], ne contenant aucune information structurale pouvant aider à l'identification du composé. Une conséquence de cela est l'absence de l'ion moléculaire (dans environ 23-35% des composés organiques volatils) ou la faible d'abondance relative, ce qui complique la détermination de la masse moléculaire des composés [27,31-38]. De plus, lors de l'analyse du propolis, les chromatogrammes obtenus en GC

comportent du nombreux pics mal résolus, ce qui rend difficile l'identification des composés.

Une nouvelle source d'ionisation utilisant un faisceau d'atomes ou de molécules à l'état métastable, la source MAB (metastable atom bombardment), a été créée par notre groupe de recherche en collaboration avec la compagnie Dephy Technologies [27,29] au début des années 90 suite à des recherches sur l'ionisation Penning et son mécanisme.

Cette source possède, entre autres, les caractéristiques suivantes :

1. Simple à utiliser.
2. Introduction des échantillons simple et rapide.
3. Permet le contrôle du degré de fragmentation des ions moléculaires.
4. Possibilité d'effectuer de l'ionisation sélective.
5. Permet la détermination de masses exactes.
6. Génère des résultats reproductibles.

Dans la source MAB, les molécules analytes sont bombardées par des atomes à l'état métastable. Cette technique est basée sur l'ionisation Penning observée la première fois par Frans M. Penning en 1925, lors de l'étude des potentiels d'amorçage de la décharge électrique du néon [27]. Ce type d'ionisation implique une réaction électrophile entre un atome à l'état métastable (A^m) et un corps cible (M) (atome ou molécule). Cette réaction donne lieu à un atome à l'état fondamental, un corps cible dans un état ionique radicalaire (M^+) et un électron dans un état continu.

Cette réaction a lieu uniquement si l'énergie d'ionisation de l'analyte (M) est inférieure à l'énergie de l'état métastable de l'atome (A^*) [27].



Cette approche permet donc de varier l'énergie d'ionisation en sélectionnant différentes particules métastables possédant des énergies d'excitation bien distinctes. Cette énergie va de 8 eV à 20 eV grâce aux gaz rares utilisés comme particules métastables (voir tableau 2.1). Cette source présente un

avantage en ce sens qu'elle permet d'avoir une énergie quantifiée et non pas une distribution d'énergie comme c'est le cas avec l'ionisation électronique.

La source MAB a été utilisée dans le domaine de la chimie environnementale pour l'analyse des polychloralcanes et d'autres contaminants [13,15,16], dans le domaine de la microbiologie pour l'identification des microorganismes dans l'urine [17] et même dans l'analyse des polymères [18]. Cependant, aucun article ne fait mention de la source MAB dans l'analyse des produits naturels.

Ainsi, l'objectif de ce projet est d'effectuer la caractérisation de la propolis par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en utilisant la source MAB comme source d'ionisation afin de démontrer que cette source pourrait être une alternative ou un nouvel outil analytique pour l'analyse des produits naturels.

Chapitre 2 : Éléments théoriques sur l'ionisation Penning et sur la source MAB

La source MAB a été développée et élaborée dans notre laboratoire. Cette source d'ionisation a un avantage par rapport à la source d'ionisation par impact électronique (IE) du fait qu'elle permet de varier l'énergie d'ionisation en sélectionnant différentes particules métastables possédant des énergies d'excitations bien distinctes permettant ainsi une ionisation sélective et un contrôle de la fragmentation.

2.1 Fonctionnement de la source MAB

La source MAB est constituée d'une chambre d'ionisation sur laquelle est fixée un canon qui génère un faisceau de particules à l'état métastable produites par une décharge entre la cathode et l'anode. Les atomes métastables qui pénètrent dans la source entrent en collision avec les molécules d'analyte qui proviennent du CG, du réservoir ou de la sonde. Les ions formés sont ensuite accélérés par une lentille d'extraction, repoussés par un repousseur d'ions puis focalisés par une lentille de focalisation pour se diriger vers les analyseurs [29]. Le déflecteur quant à lui, est réglé à un potentiel négatif et sert à éliminer les espèces chargées (les atomes du gaz ionisant qui ont été ionisés ainsi que les électrons) produites par la décharge électrique.

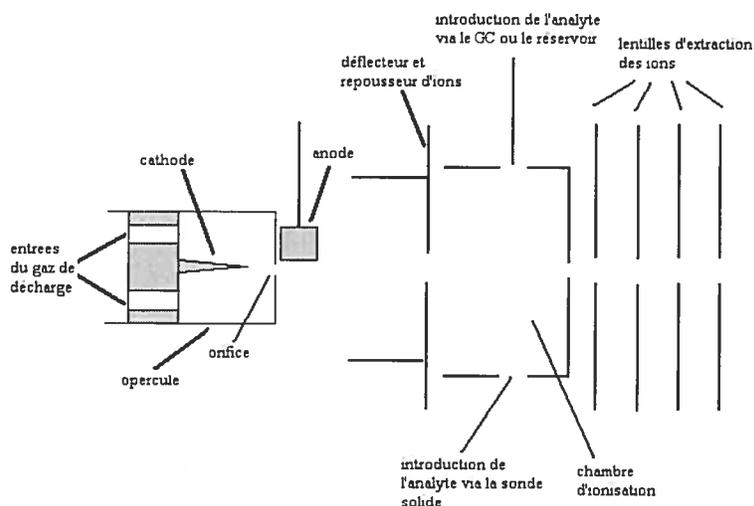


Figure 2.1. Schéma de la source MAB

2.2 L'ionisation Penning

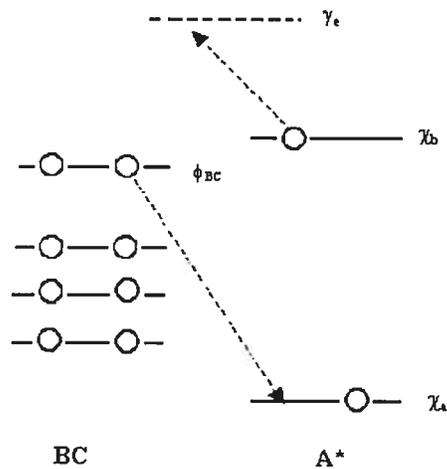
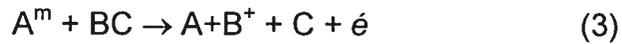
Comme déjà mentionné, la base de la source MAB repose sur le principe de l'ionisation Penning. D'après ce principe, l'ionisation implique une réaction électrophilique entre un atome à l'état métastable (A^m) et un corps cible (BC). Les espèces résultant de cette réaction sont l'atome à l'état fondamental, le corps cible dans un état ionique et un électron dans un état continu comme le montre la réaction ci-dessus.



Ainsi, lorsque la distance entre A^m et BC est suffisamment courte, un électron de l'espèce BC (ϕ_{BC}) peut être transféré à l'orbitale A^m (χ_a) et l'électron excité (χ_b) est simultanément éjecté dans un continuum (γ_e) (figure 2.2).

Cette réaction est possible si et seulement si l'énergie d'ionisation de la molécule analyte (BC) est inférieure à l'énergie d'ionisation de l'état

métastable de l'atome (A^m). Cependant, si l'énergie d'excitation de l'espèce métastable A^m est beaucoup plus élevée que l'énergie d'ionisation de BC, il y aura fragmentation d'ions fragments comme le montre la réaction suivante :



Transfert d'électron lors de l'ionisation Penning

Figure 2.2. Processus d'échange électronique lors de l'ionisation Penning de la molécule BC par la particule métastable A^* .

D'une manière globale, l'énergie interne (E_{int}) qui est conférée à l'ion durant l'ionisation est donnée par l'équation suivante :

$$E_{int} = E^* - EI - E_k \quad (4)$$

Où E^* est l'énergie d'excitation de l'espèce métastable, EI est l'énergie d'ionisation de la molécule BC et E_k est l'énergie cinétique de l'électron éjecté.

Ainsi, l'énergie interne de l'ion sera à sa valeur maximale lorsque E_k sera égale à zéro, permettant ainsi d'avoir un contrôle sur la fragmentation. En effet, lorsque l'énergie d'excitation de l'espèce métastable est beaucoup plus élevée que l'énergie d'ionisation, tout dépendant de l'énergie d'apparition des fragments, la fragmentation sera plus ou moins importante tandis que lorsque

l'énergie d'excitation de l'espèce métastable est semblable à l'énergie d'ionisation de la molécule, la fragmentation sera négligeable ou même absente.

2.3 Les états excités métastables

Un état excité métastable est un état électronique dont toutes les transitions vers des états inférieurs sont faiblement permises par les règles du rayonnement dipolaire [27]. Le tableau suivant représente les gaz utilisés avec la source MAB ainsi que les énergies associées à leurs états métastables.

Tableau 2.1. Caractéristiques des états métastables pour les atomes de gaz rares et l'azote moléculaire

Gaz	État métastable	Énergie (eV)	Eint (IE~8eV)	Caractéristiques Spectrales
He	3S_1	19,82	0-11,82	M^+, F_c^+
	1S_0	20,61		
Ne	3P_2	16,62	0-8,62	M^+, F_c^+
	3P_0	16,72		
Ar	3P_2	11,55	0-3,55	M^+, F_R^+
	3P_0	11,72		
Kr	3P_2	9,92	0-1,92	M^+
	3P_0	10,56		
Xe	3P_2	8,3	0-0,32	M^+
	3P_0	9,45		
N ₂	$a^3\Sigma_u$	6,17	-	M^+
	$w^3\Sigma_u$	7,32	-	
	$a^1\Sigma_u^-$	8,52	0-0,52	
	$a^1\Pi_u$	8,67	0-0,67	
	$w^1\Delta_u$	9,02	0-1,02	M^+, F_R^+
	$E^3\Sigma_g^+$	11,88	0-3,88	

De façon générale, l'état métastable de plus basse énergie est généré en majorité [42].

Ainsi, le faisceau produit contient des particules quasi-monoénergétiques. Par contre, pour l'azote, l'état énergétique le plus abondant est celui à 8,52eV. Par ailleurs il est possible de voir que le xénon et l'azote produiront une ionisation douce menant à des ions moléculaires stables avec peu ou pas de fragmentation, tandis que le néon et l'hélium produiront une ionisation de l'analyte donnant lieu à une fragmentation considérable.

Chapitre 3 : Éléments théoriques sur la source d'ionisation à impact électronique

Lorsque des électrons passent à travers ou très près d'une molécule, ils peuvent provoquer son ionisation. Ce processus résulte habituellement en la formation d'ions positifs.

L'ionisation électronique est la méthode d'ionisation couramment utilisée en spectrométrie de masse pour l'analyse de composés volatils de moins de 800 Da et favorise la formation d'ions moléculaires et leurs fragments. Ainsi, cela permet la détermination de la masse moléculaire relative et la structure moléculaire pour ces molécules.

3.1 Fonctionnement de la source par impact électronique

La source d'ionisation électronique a été utilisée la première fois par Dempster, puis développée par Nier [39]. C'est la plus ancienne des méthodes d'ionisation. Un schéma est présenté à la figure 3.

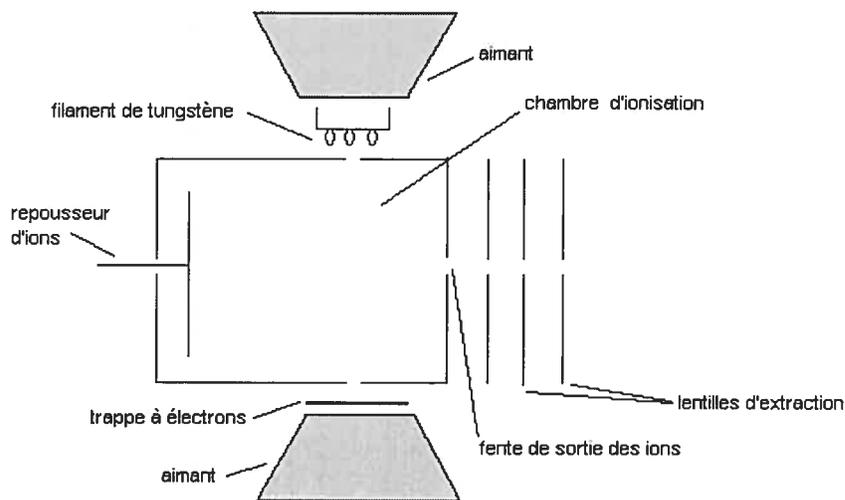


Figure 3.1 : Schéma de la source d'ionisation par impact électronique

Dans cette source, des électrons sont formés par un filament de tungstène chauffé électriquement à l'incandescence. Après leur émission, les électrons sont accélérés par un champ électrique appliqué entre le filament et les parois de la chambre d'ionisation. Ils pénètrent ensuite dans la chambre par un petit orifice. Un faible champ magnétique appliqué dans l'axe confine le faisceau d'électrons dans une trajectoire hélicoïdale, ce qui augmente la probabilité d'interaction des électrons avec les molécules d'analytes. Le courant d'électron qui passe au travers la chambre d'ionisation est ajusté à l'aide de la trappe à électrons. Une fois formés, les ions sont extraits au travers de la fente de sortie à l'aide des champs électrostatiques générés par le repousseur d'ions et les lentilles d'extraction [27]. L'énergie des électrons est contrôlée par la différence de voltage appliqué entre le filament et les parois de la chambre d'ionisation.

Le graphique qui suit représente la courbe typique du courant ionique total (TIC) pour la formation d'un ion positif.

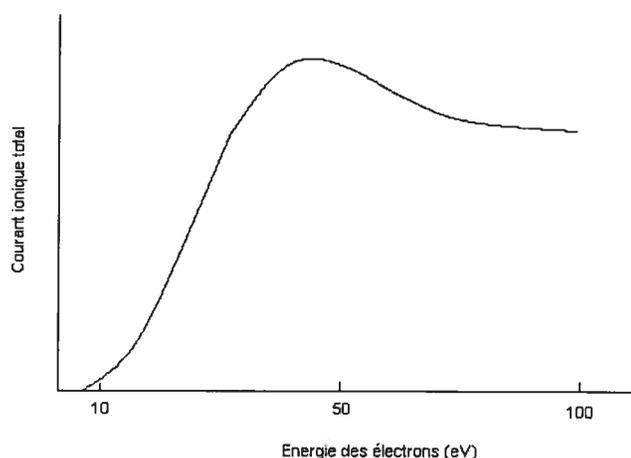


Figure 3.2 : Courbe de la variation du courant total des ions par rapport à l'énergie des électrons [34].

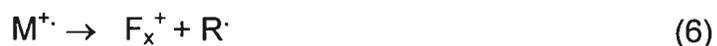
Ainsi, le nombre d'ions produit est fonction de l'énergie des électrons.

Pour que le spectromètre de masse fonctionne à une sensibilité maximale il faut avoir le rendement maximal d'ions de n'importe quelle quantité donnée d'échantillon. D'après la courbe, ce serait à 50 eV. Cette région est très proche de la partie abrupte de la courbe et ainsi, une petite diminution non intentionnelle de l'énergie amènerait une réduction considérable dans la production d'ions et ainsi un manque de reproductibilité. Alors, en augmentant l'énergie des électrons à 70 eV, on sacrifie seulement une petite quantité d'ions produits, mais on se retrouve dans un plateau où une petite variation de l'énergie a peu d'impact sur la production d'ions.

Ainsi, en utilisant cette énergie (70 eV), plusieurs ions de nature et de structure différentes peuvent être formés. En effet, l'ion moléculaire est produit selon la réaction suivante:



Si une quantité suffisante d'énergie est transférée à la molécule M, elle peut se décomposer pour former des ions fragments selon deux mécanismes :



et,



La quantité relative des ions fragments par rapport à l'ion moléculaire peut être très élevée lorsque l'énergie cinétique des électrons dépasse 20eV.

Par ailleurs, la source EI présente de nombreuses limitations. Certaines molécules peuvent subir une décomposition thermique avant d'être ionisées ou sont susceptibles de se fragmenter après l'ionisation à cause de la température requise pour la vaporisation et d'autres sont simplement involatiles pour donner un spectre. Cette caractéristique donne lieu à une faible abondance de l'ion moléculaire pendant l'analyse de masse et la détermination de formule empirique nettement plus difficile.

Chapitre 4 : Revue de la littérature

4.1 Définition du propolis et provenance

Comme il a été vu précédemment, la propolis est le nom donné à la substance résineuse qui est collectée par les abeilles à partir de différentes parties des plantes (branches, fleurs, pollen, bourgeons) [1] tout dépendant de la localisation géographique [2,3]. Le mot propolis est tiré du grec *pro* (pour «en avant de», «à l'entrée de») et *polis* (pour «la ville») ainsi, il signifie «défense de la ville (ou de la ruche)» [2].

Sa couleur varie du jaune pâle au brun foncé dépendant de la source et de son âge. Les abeilles ouvrières collectent cette résine dans les bourgeons d'arbres tels que le bouleau, le peuplier, le pin, l'aune, le saule et le palmier. Elle peut aussi provenir des substances sécrétées par les plantes, des substances lipophyloques sur les feuilles, des mucilages, des gommes, des résines et des treillages.

Après avoir collecté cette résine des fissures dans les écorces des arbres et des bourgeons, les abeilles la mastiquent, des enzymes salivaires sont ajoutées et le produit partiellement digéré est mélangé avec de la cire et utilisé dans la ruche. [2, 4].

4.2 Traitement de la propolis

La propolis est un sous-produit de la ruche. Il est collecté par les apiculteurs qui grattent la superstructure avec un outil spécial. Cela arrive habituellement à l'automne de l'année suivant l'extraction du miel. La

propolis et le mélange de cire sont expédiés au processeur dans des boîtes, des tonneaux ou des sacs.

Ensuite, la première étape du traitement est l'évaluation du matériel. S'il y a présence de beaucoup de cire, l'échantillon sera lavé à l'eau froide pour enlever la cire extrinsèque. La propolis excédantaire est séchée à l'air sur des tuiles en acier inoxydable. S'il y a peu de cire extrinsèque on commence immédiatement par la deuxième étape.

Lors de la deuxième étape, on dissout la propolis dans de l'éthanol 95%. Les résidus non solubles constitués de cire ainsi que de parties d'abeilles et de « copeaux de bois » sont enlevés.

La dernière étape implique la filtration. La teinture de propolis est passée à travers une série de filtres pour enlever toute petite particule de matière étrangère restante [2].

4.3 Composition chimique

Plus de 300 composés ont été identifiés dans différents échantillons de propolis [6]. Cependant, la composition chimique de la propolis varie selon l'endroit où il a été collecté. De façon générale, il est composé de 50% de résine (flavonoïdes et les acides phénoliques reliés), 30% de cire, 10% d'huiles essentielles et aromatiques, 5% de pollen qui est une source riche en éléments essentiels tel que le magnésium, le nickel, le calcium, le fer et le zinc [4] et 5% d'autres matières incluant les débris organiques [2,7]. La cire et les débris organiques sont enlevés lors de l'extraction de la propolis.

Le tableau 4.1 fournit les données correspondant à la composition chimique de la propolis relevées dans la littérature.

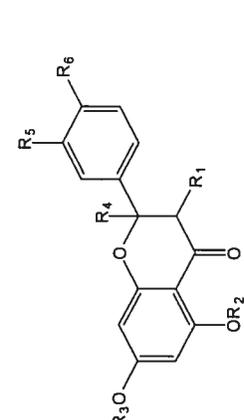
Étant donné que la composition chimique de la propolis varie selon la région géographique et la zone climatique, il est à noter qu'aucun échantillon ne contient tous les éléments contenus dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1
Composition chimique de la propolis [28]

I. Flavones		II. Flavonols		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Acacetin	H	H	H	H	H	OMe	H	H	H
Apigenin	H	H	H	H	H	OMe	H	H	OMe
Apigenin-7-methyl ether	H	H	Me	H	H	H	H	H	H
Apigenin-7,4'-dimethyl ether	H	H	Me	H	Me	H	H	H	H
Chrysin	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Eupatorin	H	OMe	Me	OH	OMe	H	Me	H	H
Hispidulin	H	OMe	H	OH	OH	H	H	OMe	OH
Pectolinarigenin	H	OMe	H	OMe	OMe	H	H	H	OH
Tectochrysin	H	H	Me	H	H	H	Me	H	OMe
Xantomicrool	H	OMe	Me	OMe	OH	H	Me	H	OH
-	H	H	Me	OMe	OMe	H	Me	H	OH
-	H	OMe	Me	OMe	OMe	H	H	OH	OH
-	Me	H	H	H	H	H	Me	OMe	OH

I. Flavones		II. Flavonols	

III. Flavanones & dihydroflavonols	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Hesperetin	H	H	H	H	OMe	OH
Isosakuranetin	H	H	H	H	H	OMe
Naringenin	H	H	H	H	H	OH
Pinobanksin	OH	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-acetatoate	OAc	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-butyrate	OBu	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-hexanoate	OHx	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-methyl ether	OMe	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-pentanoate	OPnt	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-pentenoate	OPnt	H	H	H	H	H
Pinobanksin-3-propanoate	OPro	H	H	H	H	H
Pinocembrin	H	H	H	H	H	H
Pinostrobin	H	H	Me	H	H	OH
Sakuranetin	H	H	Me	H	H	OMe
-	OH	Me	H	H	H	H
-	H	H	Me	OH	H	H



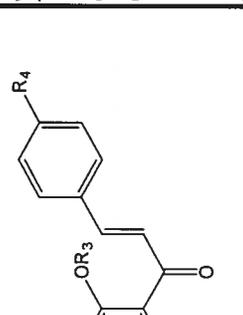
Légende:
Pro = C₃H₇CO; But = C₄H₉CO; Pnt = C₅H₁₁CO; Hx = C₆H₁₃CO

VI. Phenolic triglycerides

1,3-di-p-coumaroyl-2-acetylglycerol
1,3-diferuloyl-2-acetylglycerol
1-feruloyl-2-acetyl-3-p-coumaroulylglycerol

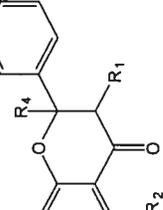
IV. Chalkones

2,6-OH-4-OMe
2,6,4'-OH-4-OMe



V. Coumarins

Daphnetin
Esculetin
Scopoletin



VII. Sterols

Chalinasterol
Cholesterol
Dihydrofucosterol
Fucosterol
Stigmasterol

VIII. Carbohydrates

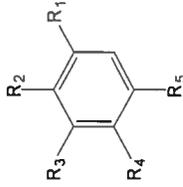
D-fructose
D-glucose
D-glucitol
D-gulose
D-ribose
Sorbitol
Sucrose
Tallose

IX. Derivatives of benzylalcohol, benzaldehyde and benzoic acid

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Anisic acid	CO ₂ H	H	H	OMe	H
Benzaldehyde	CHO	H	H	H	H
Benzoic acid	CO ₂ H	H	H	H	H
Benzyl acetate	CH ₂ OAc	H	H	H	H
Benzylalcohol	CH ₂ OH	H	H	H	H
Benzyl benzoate	CO ₂ Bn	H	H	H	H
Benzyl 2-methoxybenzoate	CO ₂ Bn	OMe	H	H	H
Benzyl salicylate	CO ₂ Bn	OH	H	H	H
Cyclohexyl benzoate	CO ₂ C ₆ H ₁₁	H	H	H	H
3,4-dimethoxybenzyl alcohol	CH ₂ OH	H	OMe	OMe	H
Ethyl benzoate	CO ₂ Et	H	H	H	H
Galic acid	CO ₂ H	H	OH	OH	OH
Gentisic acid	CO ₂ H	OH	H	H	OH
p-hydroxybenzaldehyde	CHO	H	H	OH	H
p-hydroxybenzoic acid	CO ₂ H	H	H	OH	H
4-hydroxybenzyl benzoate	CH ₂ OBz	H	H	H	H
Isovanillin	CHO	H	OH	OMe	H
Methyl benzoate	CO ₂ Me	H	H	H	H
Methyl salicylate	CO ₂ Me	OH	H	H	H
Protocatechuic acid	CO ₂ H	H	OH	OH	H
Protocatechuic aldehyde	CHO	H	OH	OH	H
Salicyc acid	CO ₂ H	OH	H	H	H
Vanillin	CHO	H	OMe	OH	H
Vanillic acid	CO ₂ H	H	OMe	OH	H
Veratric acid	CO ₂ H	H	OMe	OMe	H

Legend

Bn = CH₂C₆H₅ ; Bz = C₆H₅CO



X. Other aromatic compounds

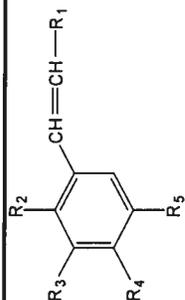
Acetophenone	
Anetol	
Dihydrocinnamic acid	
Dihydrocoumaric acid	
Dihydroxyacetophenone	
p-hydroxyacetophenone	
3,5-dihydroxystilbene (pinosilvin)	
3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene (pterostilbene)	
Eugenol	
Hydroquinone	
4-methoxydihydrocinnamic acid	
Methylacetophenone	
Naphtalene	
2-phenylethanol	
5-phenyl-E,E-2,4-pentadienoic acid	
5-phenyl-E-3-pentenoic acid	
Polyprenylated benzophenones	
Styrene	
Vinyl-p-methoxyphenyl ether	
Vinylphenyl ether	
Xanthorhoeol	
<u>XI. Monoterpenes</u>	
Borneol	Linalyl acetate
1,8-cineol	α-pinene
p-cymene	β-pinene
Limonene	γ-terpinene

<p><u>XII. Sesquiterpenes</u></p> <p>α-acetoxypetulenol Aromadendrene β-bisabolene β-bisabolol β-bourbonene Calamenene Calarene Caryophyllene α-copaene Dihydroeudesmol β-eudesmene β-eudesmol Farnesol Guaiene Guaiol Nerolidol Patchoulane β-patchoulene Selinene</p> <p><u>XIII. Diterpenes</u></p> <p>Acetylisocupressic acid Communic acid 17-hydroxyclerod-3,13-E-dienolic acid Imbricatolonic acid Isocupressic acid</p>	<p><u>XIV. Triterpenes</u></p> <p>Canophyllal Lanosterol</p> <p><u>XV. Hydrocarbons</u></p> <p>Doeicosane Dotriacontane Henicosane 8,22-hentriacontadiene Hentriacontane Heptacosane Hexacosane Nonacosane Octacosane Pentacosane Tetracosane Triacontane Tricosane Tripentacontane 9,23-tritriacontadi-4-ene Tritriacontane Z-8-hentriacontene Z-10-hentriacontene Z-9-heptacosene Z-8-nonacosene Z-9-nonacosene Z-9-pentacosene Z-9-tricosene Z-8-tritriacontene</p>	<p><u>XVI. Amino acids</u></p> <p>Alanine β-alanine α-aminobutyric acid δ-aminobutyric acid arginine asparagine aspartic acid cistine cysteine glutamic acid glycine histidine hydroxyproline isoleucine leucine lysine methionine ornithine phenylalanine proline pyroglutamic acid sarcosine serine threonine tryptophane tyrosine valine</p>
---	--	--

XVII. Aliphatic alcohols, aldehydes, ketones, acids and esters

acetic acid	isobutyl isobutiriate	tetradecanoic (myristic) acid
but-2-enoic acid	isobutyric acid	tetraatriacontyl hexadecanoate
butyric acid	isopentyl acetate	tetraatriacontyl Z-octadec-9-enoate
citric acid	linoleic acid	triacontyl hexadecanoate
2,3-dihydroxypropanoic acid	3-methyl-2-butenyl acetate	triacontyl Z-octadec-9-enoate
docosanoic (behenic) acid	3-methyl-3-butenyl acetate	2,3,4-trihydroxybutanoic (treonic) acid
dodecanoic (lauric) acid	2-methylbut-2-enoic acid	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone
dotriacontyl hexadecanoate	3-methyl-2-buten-1-ol	
dotriacontyl Z-octadec-9-enoate	3-methyl-3-buten-1-ol	
3-eicosyloxy-1,2-oleiloxypropane	2-methylbutyl acetate	<u>XVIII. Other substances</u>
ethyl palmitate	2-methylbutyric acid	polysaccharides
fumaric acid	methyl 2,8-dimethylundecanoate	proteins
glycerol	6-methylhep-5-en-2-one	vitamins
glycerol monoacetate	methylpentanoic acid	
α -glycerophosphate	miu-inositol	
2-heptadecanone	nonanoic (pelargonic) acid	
hexacosanoic (cerotic) acid	octacosanoic (montanic) acid	
hexacosyl hexadecanoate	octacosyl hexadecanoate	
hexacosyl Z-octadec-9-enoate	octacosyl Z-octadec-9-enoate	
hexadecanoic (palmitic) acid	octadecanoic (stearic) acid	
hexadecyl acetate	3-octadecyloxy-1,2-oleiloxypropane	
2,4-hexadienoic (sorbic) acid	octanoic acid	
hexanal	oleic acid	
4-hexanolactone	1,5-pentandiol monobenzoate	
hex-2-enal	phenylmethyl 14-methylpentadecanoate	
2-hydroxybutanedioic (mallic) acid	succinic acid	
14-hydroxystearic acid	tetracosanoic (lignoceric) acid	
isobutenol	1-tetracosanol	
isobutyl acetate	tetracosyl hexadecanoate	
isobutyl butanoate	tetracosyl Z-octadec-9-enoate	

XIX. Derivatives of cinnamic alcohol, cinnamic aldehyde and cinnamic acid

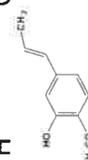


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Benzyl caffeate	CO ₂ Bn	H	OH	OH	H
Benzyl cinnamate	CO ₂ Bn	H	H	H	H
Benzyl E-p-coumarate	CO ₂ Bn	H	H	OH	H
Benzyl Z-p-coumarate	CO ₂ Bn	H	H	OH	H
Benzyl 3,4-dimethoxycinnamate	CO ₂ Bn	H	OMe	OMe	H
Benzyl ferulate	CO ₂ Bn	H	OMe	OH	H
Benzyl isoferulate	CO ₂ Bn	H	OH	OMe	H
Butenyl caffeate	CO ₂ C ₄ H ₇	H	OH	OH	H
Butyl caffeate	CO ₂ C ₄ H ₉	H	OH	OH	H
Caffeic acid	CO ₂ H	H	OH	OH	H
E-cinnamic acid	CO ₂ H	H	H	H	H
Z-cinnamic acid	CO ₂ H	H	H	H	H
Cinnamic alcohol	CH ₂ OH	H	H	H	H
Cinnamic aldehyde	CHO	H	H	H	H
Cinnamyl benzoate	CH ₂ OBz	H	H	H	H
Cinnamyl caffeate	CO ₂ Cyn	H	OH	OH	H
Cinnamyl cinnamate	CO ₂ Cyn	H	H	H	H
Cinnamyl p-coumarate	CO ₂ Cyn	H	H	OH	H
Cinnamyl isoferulate	CO ₂ Cyn	H	OH	OMe	H
Coniferyl alcohol	CH ₂ OH	H	OMe	OH	H
Coniferyl aldehyde	CHO	H	OMe	OH	H
Coniferyl benzoate	CH ₂ OBz	H	OMe	OH	H
Coniferyl p-coumarate	CO ₂ Con	H	H	OH	H
Coniferyl ferulate	CO ₂ Con	H	OMe	OH	H
m-coumaric acid	CO ₂ H	H	OH	H	H

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
o-coumaric acid	CO ₂ H	OH	H	H	H
E-p-coumaric acid	CO ₂ H	H	H	OH	H
Z-p-coumaric acid	CO ₂ H	H	H	OH	H
p-coumaric alcohol	CH ₂ OH	H	H	OH	H
p-coumaric aldehyde	CHO	H	H	OH	H
p-coumaryl benzoate	CH ₂ OBz	H	H	OH	H
p-coumaryl vanillate	CH ₂ O ₂ CAr	H	H	OH	H
3,4-dimethoxycinnamic acid	CO ₂ H	H	OMe	OMe	H
Diprenyl (geranyl) caffeate	CO ₂ C ₁₀ H ₁₈	H	OH	OH	H
3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid	CO ₂ H	H	C ₅ H ₉	OH	C ₅ H ₉
Ethyl caffeate	CO ₂ C ₂ H ₅	H	OH	OH	H
Ferulic acid	CO ₂ H	H	OMe	OH	H
Isoferulic acid	CO ₂ H	H	OH	OMe	H
4-methoxycinnamic acid	CO ₂ H	H	H	OMe	H
2-methyl-2-butenyl caffeate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OH	H
3-methyl-2-butenyl caffeate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OH	H
3-methyl-3-butenyl caffeate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OH	H
2-methyl-2-butenyl p-coumarate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	H	OH	H
3-methyl-3-butenyl p-coumarate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	H	OH	H
3-methyl-2-butenyl ferulate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OMe	OH	H
3-methyl-3-butenyl ferulate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OMe	OH	H
2-methyl-2-butenyl isoferulate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OMe	H
3-methyl-2-butenyl isoferulate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OMe	H
3-methyl-3-butenyl isoferulate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OMe	H
Pent-4-enyl caffeate	CO ₂ C ₅ H ₉	H	OH	OMe	H
Pentyl caffeate	CO ₂ C ₅ H ₁₁	H	OH	OH	H
Phenylethyl caffeate	CO ₂ CH ₂ Bn	H	OH	OH	H
2-phenylethyl p-coumarate	CO ₂ CH ₂ Bn	H	H	OH	H
Phenylethyl isoferulate	CO ₂ CH ₂ Bn	H	OH	OMe	H
Sinapic acid	CO ₂ H	H	OMe	OH	OMe

Legend

Cyn = C₆H₅CH=CHCH₂; Ar = 3-hydroxy-4-methoxyphenyl; Con =



4.4 Activité biologique

Au cours des 40 dernières années, plusieurs groupes de recherche ont publié des résultats concernant l'activité biologique et les effets thérapeutiques de la propolis

La propolis possède de nombreuses propriétés, mais elle est surtout reconnue pour ses activités anti-bactériennes. En effet, la propolis est actif *in vitro* contre les bactéries Gram-positive (*Staphylococci* et *Streptococci Spp.*) et Gram négative (*E.coli*, *K. pneumoniae*), protozoa (*T.cruzi*) et les virus (VIH, herpès ou influenza) [4,24]. Cependant, le solvant utilisé pour l'extraction de la propolis influence grandement la force de son activité anti-bactérienne.

La propolis possède aussi une activité anti-oxydante puisqu'elle enlève les radicaux DPPH (1,1-Diphényl-2-picryl hydrazyl), les anions superoxydes et les radicaux hydroxy. [19,21,22,23]. De plus, la propolis possède une activité anti-proliférative contre certaines cellules cancéreuses. Cette activité est principalement due à la présence du caféate de benzyle et du caféate de phénéthyle dans la propolis [20].

Une étude suggère que la propolis produit des effets estrogéniques par son interaction avec les récepteurs estrogéniques et qu'elle pourrait être utilisée dans la prévention des problèmes causés par les estrogènes [25].

Par ailleurs, d'autres propriétés pharmacologiques ont été attribuées à la propolis comme son activité fongicide, anti-virale, hépatoprotectrice et anti-inflammatoire. [4,20,21,24].

Plusieurs substances présentes dans la propolis contribuent à son activité biologique, mais ce sont principalement les flavonoïdes tels que la pinocembrine,

la galangine et la pinobankine ainsi que les esters des acides coumarique et caféique qui en sont responsables.

4.5 Applications

Comme il a déjà été mentionné, la propolis est utilisée par les hommes au moins depuis 300 ans avant Jésus-Christ et de nos jours, elle est utilisée comme remède maison et dans les produits personnels [2].

À cause de son grand nombre de propriétés, on retrouve la propolis dans une multitude de préparations et ses applications sont d'autant plus nombreuses. En effet, dans les préparations dermatologiques vendues sans prescription, on retrouve des produits pour guérir les blessures, régénérer les tissus, traiter les brûlures, les neurodermatites, les psoriasis, l'herpès simplex et génital. Par ailleurs, elle est utilisée pour traiter le rhumatisme et les entorses [2].

Aussi, en médecine dentaire, la propolis possède un effet anesthésique cinq fois plus efficace que la cocaïne. Elle est aussi utilisée dans les dentifrices et les rince-bouche traitant la gingivite, la chéilite et la stomatite [2].

La propolis est aussi présente dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques tels que les crèmes faciales, les onguents, les lotions et les solutions[2].

Au 17^e siècle, Stradivari utilisait la propolis comme ingrédient dans le vernis de ses instruments à corde. Les musiciens l'utilisent encore pour leurs instruments et dans la réparation des accordéons.

Chapitre 5: Partie expérimentale

Les échantillons de propolis utilisés proviennent de Sainte-Flavie (Le Vieux-Moulin) et de Gaspé (Clément-Arsenault) au Québec. Les deux échantillons étaient à l'état brut.

Tous les autres composés utilisés lors de ce projet sont des composés commerciaux de haute pureté ($\geq 95\%$) et ils ont été employés sans purification supplémentaire. Ils proviennent tous de la compagnie Sigma Aldrich (Canada).

5.1 Extraction de la propolis

Environ deux grammes de propolis ont été coupé en petits morceaux et extraits dans 20 mL d'éthanol 70% durant 24 heures. Le tout a été filtré à l'aide d'un entonnoir conique et d'un papier filtre approprié pour retenir la cire non soluble et le solvant a été évaporé sous vide.

5.2 Dérivation

5.2.1 Procédure

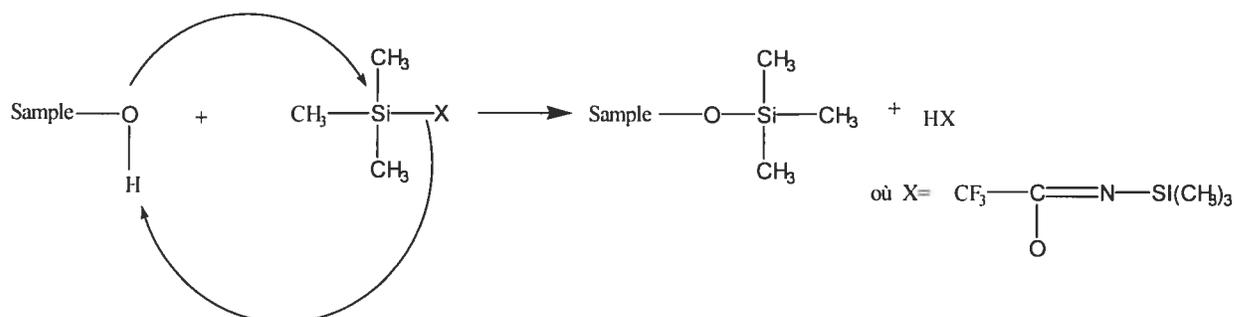
Entre 3 et 5 mg d'extrait de propolis ont été pesé dans le vial. Environ 100 μL de pyridine ont été ajouté afin de dissoudre la propolis. Ensuite, 100 μL de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) ont été ajouté. Le tout a été

mis dans un four à 80°C pendant 30 minutes. Les dérivés obtenus étaient stables pour au moins 24 heures et ont été conservé au congélateur.

5.2.2 Mécanisme

Au cours de la silylation, un hydrogène actif est remplacé par un groupement alkylsilyl, plus souvent triméthylsilyl (TMS). Les dérivés silyl sont utilisés parce qu'ils sont généralement plus volatils, moins polaires et thermiquement plus stables.

Les dérivés silyl sont formés par le déplacement du proton actif dans les groupements $-OH$, $-COOH$, $=NH$, $-NH_2$ et $-SH$. La réaction générale est montrée ci-dessous.



Il s'agit d'une attaque nucléophile sur l'atome de silice du donneur silyl, produisant un état de transition bimoléculaire. Le groupe partant du composé silyl (X) doit avoir une faible basicité, avoir l'habilité à stabiliser une charge négative dans l'état de transition et peu ou pas de tendance à former de liaison π (p-d) entre lui-même et l'atome de silice [30].

5.3 Appareil utilisé

5.3.1 Chromatographie gazeuse–spectrométrie de masse

Pour tous les échantillons, une colonne non-polaires DB-5MS [(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane] de 30 m avec un diamètre de 250 μm et d'un film de phase stationnaire d'une épaisseur de 0.25 μm a été utilisée sur un chromatographe de marque Agilent 6890 couplé à un spectromètre de masse AutoSpec Ultima, de Micromass.

La programmation de température a été faite comme suit : 50°C à 300°C avec un gradient de 10°C par minute et la température été maintenue à 300°C pendant 5 minutes.

L'injection des échantillons s'est faite sur colonne, avec l'hélium comme gaz vecteur.

5.4 Sources d'ionisation

Pour chacun des échantillons, deux sources d'ionisation ont été utilisées : Une source par impact électronique à 70 eV et une source MAB. L'azote, l'argon et l'hélium ont été utilisés comme gaz pour générer des décharges lumineuses dans le canon MAB.

5.5 Identification des composés

L'identification des composés a été effectuée par comparaison avec des spectres authentiques contenus dans des bases de données commerciales.

Pour ce projet, deux bibliothèques spectrales ont été utilisées : La bibliothèque NIST de 1996 avec 83484 spectres (dont 21249 qui sont des doublets), utilisée avec le logiciel Opus 3.7x de Micromass et la bibliothèque WILEY138.L.

Aucune expérience quantitative n'a été effectuée au cours de ce projet, car l'objectif était d'utiliser une nouvelle source d'ionisation afin de caractériser des échantillons de substances naturelles complexes et de la comparer qualitativement avec la source IE.

Chapitre 6: Résultats et Discussion

6.1 Choix de la méthode

Lorsqu'il s'agit de séparer et d'analyser des échantillons de mélanges complexes tels que la propolis, plusieurs méthodes sont à notre disposition. De nombreuses analyses ont été effectuées par CCM et HPLC pour la séparation des composés phénoliques présents dans la propolis [40,41]. Par contre, ces techniques ne possèdent pas la résolution nécessaire pour séparer plus de 50 composés individuels d'un seul échantillon. Ainsi la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse s'est avérée être la meilleure méthode puisqu'elle combine la haute résolution, la précision et la reproductibilité de la chromatographie gazeuse capillaire au pouvoir d'identification de la spectrométrie de masse [28].

6.2 Choix du solvant

La propolis à l'état brut contient environ 30% de cire [7]. Donc, pour analyser les composés polaires présents dans l'échantillon par GC, la cire ne doit pas être présente dans celui-ci. Ainsi, il faut un solvant qui extrait la propolis avec un minimum de cire en procédant tel que décrit dans la section 5.1. Basé sur les résultats du tableau suivant, le choix s'est arrêté sur l'éthanol 70% étant donné que ce solvant permet l'extraction d'une plus grande quantité de propolis que les autres solvants utilisés.

Tableau 6.1: L'extraction de la propolis avec différents solvants [28]

Solvant	Extrait (% de propolis originale)	Note
70% éthanol	58	cire minimale
90% éthanol	64	
Hexane, suivi d'acétone	64 (extrait d'acétone)	
Acetone	81	

6.3 Composés polaires de la propolis de différentes municipalités québécoises

Les deux échantillons de propolis analysés proviennent de la région de Gaspésie qui est située à l'extrémité sud-est du Québec. Le premier échantillon est de Gaspé et le second de Sainte-Flavie (voir figure 6.1). Étant donné que ces deux municipalités sont situées dans la même zone climatique (continental humide) et qu'elles partagent à peu près la même flore, la composition chimique des deux échantillons risque d'être assez similaire puisque celle-ci dépend en grande partie des plantes et des arbres présents aux alentours de la ruche.

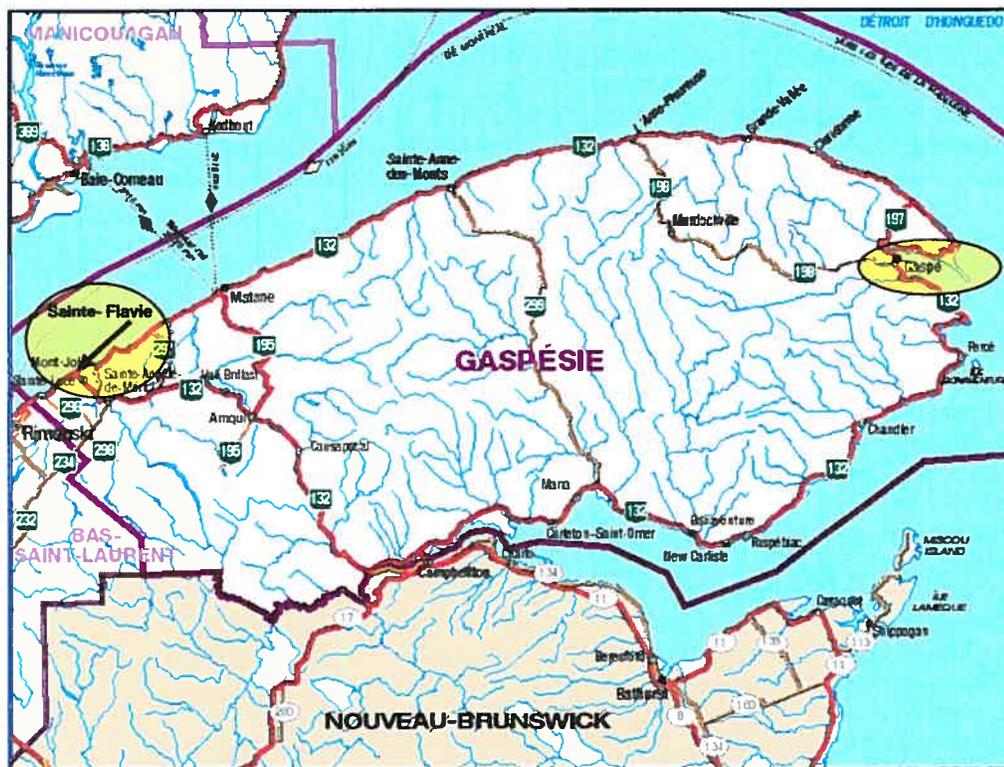


Figure 6.1 : Carte géographique de la région de Gaspésie⁽⁴³⁾. Les municipalités de Gaspé et de Sainte-Flavie sont indiquées par les ellipses jaunes

Ainsi pour chaque échantillon, le même protocole a été suivi tel que décrit au chapitre 5 soit l'extraction avec l'alcool 70%, la filtration, l'évaporation, la dérivation (avec le BSTFA) et l'analyse par GC/MS.

L'identification des composés a été effectuée par comparaison avec des spectres authentiques contenus dans des bases de données commerciales.

6.3.1 Propolis de Gaspé

L'extrait de propolis provenant de Gaspé après l'évaporation avait l'aspect d'une résine plutôt brunâtre. Les résultats obtenus après l'analyse GC-MS sont présentés dans la figure 6.2 et résumés dans le tableau 6.2. Les numéros du tableau 6.2 correspondent aux pics du chromatogramme a) de la figure 6.2. Pour certains pics, il y a plus d'une molécule associée. Cela est dû au fait que la base de données n'a pas pu identifier avec certitude le composé en question ou qu'il s'agit d'isomères qu'il est difficile de différencier simplement avec les spectres de masse.

D'après les résultats obtenus, il est possible de voir que la propolis de Gaspé est un mélange très complexe. En effet, 46 composés ont pu être identifiés dans cet échantillon, les principaux étant des sucres **36** plus précisément des hexoses (monosaccharides contenant 6 atomes de carbone). Étant donné que l'identification des composés de la propolis c'est faite uniquement par l'interprétation des spectres de masse, il a été plutôt difficile de différencier les différents isomères des sucres e.g. mannose, galactose dû aux différences minimales qu'il existe entre les spectres. Pour cette raison, tous les monosaccharides ont été identifiés par «hexose» dans les tableaux 6.2 et 6.3. Par ailleurs, les acides aromatiques tels que les acides cinnamique **25**, coumarique **38**, ferrulique **37** et caféique **42** se trouvaient en grande quantité dans l'échantillon ainsi que des acides gras tels que les acides hexadécanoïque **41** et oléique **43**.

L'échantillon de Gaspé contenait aussi des alcools tels que le p-tyrosol **26**, l'alcool furfurylique **33**, mais ceux-ci étaient présents en très faible quantité.

Les pics présents à partir de 22.12 minutes dans la figure 6.2 a) n'ont pas pu être identifiés avec certitude, car la pureté des spectres n'était pas assez élevée, mais il a été possible d'en identifier quelques uns.

Ainsi, le cinnamate de cinnamyle a été identifié dans l'échantillon. Ce produit, lorsqu'il est pur, est normalement utilisé comme agent aromatique dans l'industrie alimentaire. De plus, le 3-hydroxyméthylchryszine aussi appelé émodine d'aloès a été identifié dans l'échantillon. Cette molécule fait partie de la famille des anthraquinones et est connue pour ses effets anti-cancer et anti-inflammatoire.

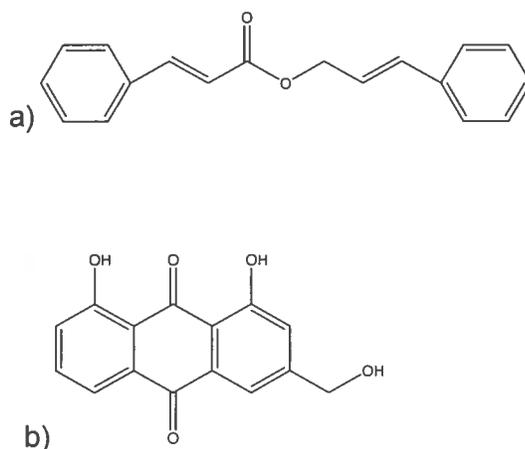


Figure 6.3 : Structure du cinnamate de cinnamyle (a) et de l'émodine d'aloès (b).

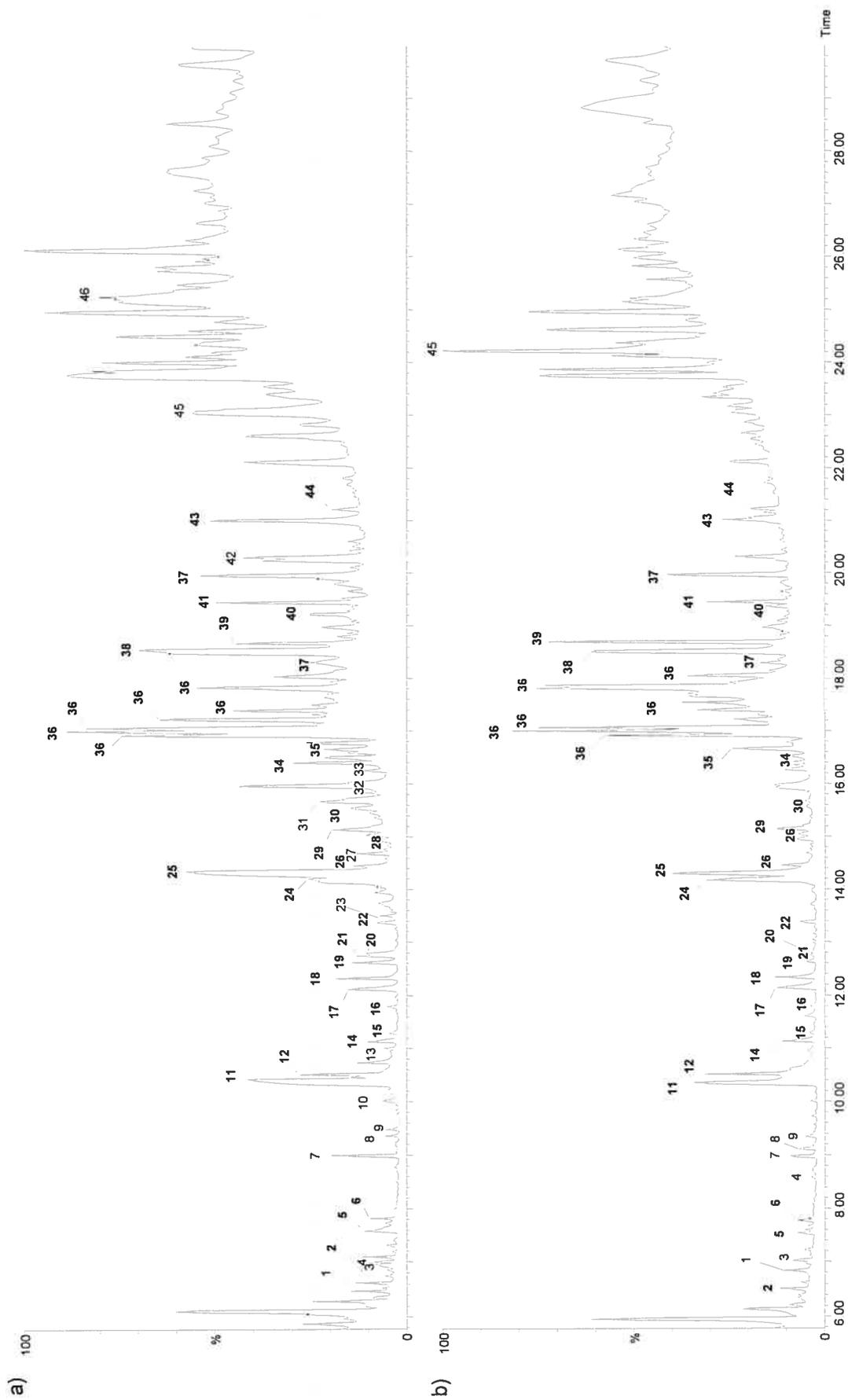


Figure 6.2 : Chromatogrammes de l'échantillon de propolis a) de Gaspé et b) de Sainte-Flavie obtenus avec la source IE.

Tableau 6.2. Composition chimique de l'extrait éthanolique de propolis de Gaspé (en gras: Composés communs aux deux extraits de Gaspé et Sainte-Flavie)

	Composé	Masse molaire	Observé avec MAB		
			(He ⁺)	(Ar ⁺)	(N ₂ ⁺)
1)	acide dihydroxyacétique	308	x	x	x
2)	alcool éthylique ou 1-[4-(1,3-dioxolan-2-yl) phenyl]- éthanone	206	x	x	x
3)	m-éthyltoluène	120	x	x	x
4)	acide 2-buténoïque	172	x	x	x
	acide (E)-2-penténoïque	172			
5)	acide propanoïque	234	x	x	x
6)	acide hydroxyacétique	220	x	x	x
7)	1-hydroxy-2-méthylbenzene	180	x	x	x
8)	acide 2,4-hexadiénoïque	184	x	x	x
9)	acide butanoïque	262			
10)	alcool phénétylique	194	x	x	x
11)	acide benzoïque	194	x	x	x
12)	glycérine	308	x	x	x
13)	acide 3-hydroxyhexanoïque	276	x	x	
14)	acide 4-hydroxy-2-méthylbutanoïque	262	x	x	x
	acide 5-hydroxypentanoïque	262			
	acide 2-(hydroxyméthyl)butanoïque	262			
15)	acide 2,3-dihydroxypropanoïque	322	x	x	
16)	ester éthylique de l'acide hydrocinnamique	178	x	x	x
17)	p-hydroxybenzaldéhyde	194	x	x	x
18)	p-hydroquinone	254	x	x	x
19)	acide hydrocinnamique	222	x	x	x
20)	acide cinnamique	220	x	x	x
21)	4-hydroxybenzènepropanol	296	x	x	x
22)	acide malique	350	x	x	x
23)	1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-diméthyl-1-(1-méthyléthyl) naphtalène	204	x	x	x
24)	aldéhyde vanillique	224	x	x	x
25)	acide cinnamique	220	x	x	x
26)	p-tyrosol	282	x	x	x
27)	acide 3-hydroxy-3-phénylpropionique	310	x		
28)	p-tyrosol	282	x	x	x
29)	acide salicylique	282	x	x	x
30)	acide p-méthoxyhydrocinnamique	252	x	x	x
	acide o-méthoxydihydrocinnamique	252			
31)	3,7,11-triméthyl-dodeca-2-trans,6-trans,10-trien-1-ol (trans-farnesol)	294	x	x	x
32)	acide 2,3-dihydroxypentanedioïque	452	x	x	
33)	alcool furfurylique	242	x	x	x
34)	valérianol	294	x	x	x
35)	acide vanillique	312	x	x	x
36)	hexoses	438/540	x	x	x
37)	acide ferulique	338	x	x	x
	(2E)-3-hydroxy-4-méthoxycinnamaldéhyde	338			
38)	acide p-trans-coumarique	308	x	x	x
	acide m-trans-coumarique	308			
39)	D-ribose	438	x	x	x
40)	acide palmitoléique	326	x	x	x
41)	acide hexadécanoïque	328	x	x	x
42)	acide caféique	396	x	x	x
43)	acide oléique	354	x	x	x
44)	acide octadécanoïque	356	x	x	x
45)	cinnamate de cynamyle	264	x	x	x
46)	3-hydroxyméthylchryszazine (émودية d'aloès)	486	x	x	x

6.3.2 Propolis de Sainte Flavie

L'extrait de propolis après l'évaporation avait l'aspect d'une résine de couleur jaunâtre. Les résultats obtenus après l'analyse GC-MS sont présentés dans la figure 6.2 et résumés dans le tableau 6.3 où les numéros correspondent aux pics du chromatogramme b) de la figure 6.2. Tout comme l'échantillon de Gaspé, celui de Sainte-Flavie est très complexe et 36 composés ont pu être identifiés dans l'extrait éthanolique. Les principaux composés qui se trouvaient dans cet échantillon étaient les hexoses **36**, les acides aromatiques tels que les acides cinnamique **25**, coumarique **38** et ferrulique **37**. Par ailleurs, il y avait d'autres composés qui étaient présents en moins grande quantité. En effet, parmi les acides gras on retrouvait l'acide hexadécanoïque **41** et parmi les alcools, il y avait l'alcool benzylique **7** et le p-tyrosol **26** qui étaient plus abondants.

Pour cet échantillon aussi, les pics présents à partir de 22.12 minutes dans la figure 6.2 b) n'ont pas pu être identifiés avec certitude avec la librairie spectrale à cause de la co-élution de plusieurs composés rendant ainsi l'identification difficile. Cependant, d'après les structures proposées par la banque de données, il est possible de conclure que ces pics correspondaient majoritairement aux flavonoïdes et à d'autres produits naturels polycycliques. Ainsi, une molécule a pu être identifiée: Il s'agit du sucrose. Cette molécule est un disaccharide qui est reconnue pour être le sucre de table. Sa structure est présentée dans la figure 6.4.

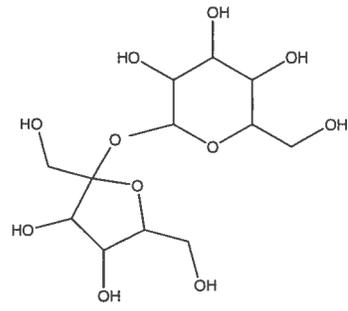


Figure 6.4 : Structure du sucrose

Tableau 6.3. Composition chimique de l'extrait éthanolique de propolis de Sainte-Flavie (en gras: Composés communs aux deux extraits de Gaspé et Sainte-Flavie)

Composé	Masse molaire	Observé avec MAB		
		(He ⁺)	(Ar ⁺)	(N ₂ ⁺)
1) 1,3,5-triméthylbenzène	120	x		
1,2,4-triméthylbenzène	120			
2) alcool éthylique ou 1-[4-(1,3-dioxolan-2-yl) phényl]- éthanone	206	x		
3) acide phthalique	310	x		
4) acide oxalique	234			
5) acide propanoïque	234	x		
6) acide hydroxyacétique	220	x		
7) alcool benzylique	180	x	x	x
8) C ₈ H ₁₀ O ₂	282	x	x	x
9) méthylphosphate	256			
11) acide benzoïque	194	x	x	x
12) glycérine	308	x	x	x
14) acide 4-hydroxy-2-méthylbutanoïque	262	x	x	x
acide 5-hydroxypentanoïque	262			
acide 2-(hydroxyméthyl)butanoïque	262			
15) acide 2,3-dihydroxypropanoïque	322	x		
16) ester éthylique de l'acide hydrocinnamique	178			
17) p-hydroxybenzaldéhyde	194	x	x	x
18) p-hydroquinone	254	x	x	x
19) acide hydrocinnamique	222			
20) acide cinnamique	220			
21) 4-hydroxybenzènepropanol	296			
22) acide malique	350			
24) aldéhyde vanillique	224	x	x	x
25) acide cinnamique	220	x	x	x
26) p-tyrosol	282	x	x	x
29) acide salicylique	282	x	x	x
30) acide p-méthoxyhydrocinnamique	252			
acide o-méthoxydihydrocinnamique	252			
34) valérianol	294	x	x	x
35) acide vanillique	312	x	x	x
36) hexoses	438/540	x	x	x
37) acide férulique	338	x	x	x
(2E)-3-hydroxy-4-méthoxycinnamaldéhyde	338			
38) acide p-trans-coumarique	308	x	x	x
acide m-trans-coumarique	308			
39) D-ribopyranose	438	x	x	x
40) acide palmitoléique	326	x		
41) acide hexadécanoïque	328	x	x	x
43) acide oléique	354	x		
44) acide octadécanoïque	356	x	x	x
45) sucrose	918	x	x	x

6.3.3 Comparaison des deux échantillons

En comparant la propolis de Gaspé à celle de Sainte-Flavie, il est possible de voir qu'il existe plusieurs similarités entre elles. En effet, dans les tableaux 6.2 et 6.3 tous les composés en caractères gras se trouvent dans les deux échantillons et ils représentent plus de la moitié des composés polaires identifiés. Cette grande ressemblance indique que les deux échantillons ont une source végétale commune qui est probablement le bouleau jaune puisque cet arbre est celui que l'on retrouve majoritairement dans la région de Gaspésie.

Malgré leur grande similarité, il y a quelques différences entre les deux échantillons de propolis. Par exemple, en regardant la figure 6.3 il est possible de voir que l'intensité des pics communs est différente pour les deux chromatogrammes. Par exemple, sur le chromatogramme a) qui représente la propolis de Gaspé l'intensité des pics est généralement plus élevée que le chromatogramme b), mais cette différence est plus notable pour les d'acides gras, le valérianol et l'acide ferrulique (pics **40**, **41**, **34**, et **37**).

Par ailleurs, dans les tableaux 6.2 et 6.3, quelques composés (en caractère normal) sont propres à chacun des échantillons (o-crésol **7**, acide butanoïque **9** et alcool furfurylique **33** pour Gaspé et acide phtalique **3**, acide oxalique **4** et alcool benzylique **7** pour Sainte-Flavie). Aussi, il est possible de voir que l'échantillon de Gaspé contient plus de composé que celui de Sainte-Flavie.

Un autre élément à considérer en comparant les deux échantillons est leur couleur. En effet, la propolis de Gaspé avait une couleur plus foncée après l'extraction tandis que celle de Sainte-Flavie était plutôt claire. Or, il a été mentionné que la propolis provenant des conifères a une couleur jaune clair [44]. Ainsi, il serait logique de penser que la propolis de Sainte-Flavie aurait comme source principale des conifères tels que des sapins et des épinettes alors que celle de Gaspé proviendrait

majoritairement du bouleau jaune à cause de sa couleur plus foncée. Cette différence pourrait expliquer, entre autres, pourquoi l'intensité des pics communs est différente pour les deux échantillons et pourquoi leur composition n'est pas identique. Cependant, il aurait fallu confirmer la source de chacun des échantillons en analysant les arbres qui sont aux alentours des ruches.

Par ailleurs, certains auteurs [46] attribuent la couleur de la propolis à la quantité de composés phénoliques qu'elle contient donc plus un échantillon est foncé, plus il contient de composés phénoliques. Ainsi, l'échantillon de Gaspé serait plus riche en composés phénoliques que l'échantillon de Sainte-Flavie.

Les figures suivantes présentent l'abondance relative des principales substances que l'on retrouve dans chacun des échantillons.

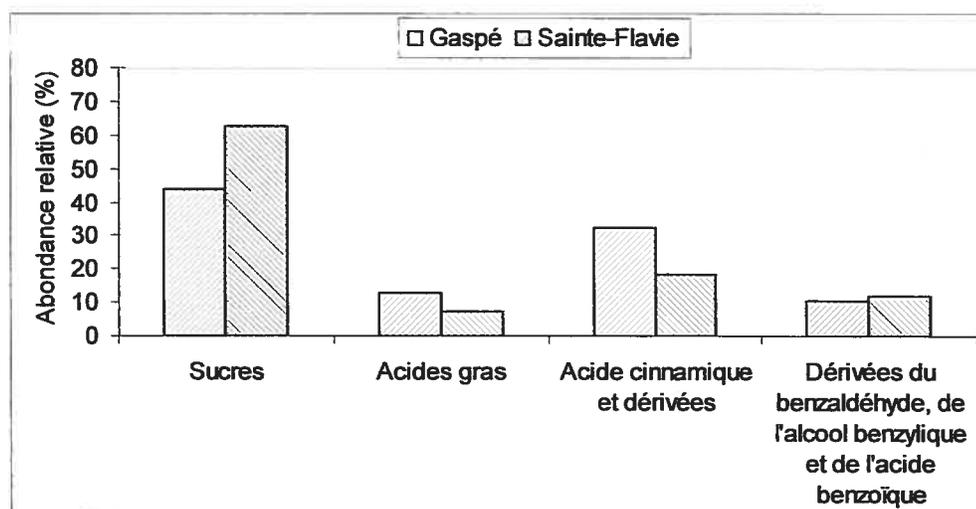


Figure 6.5a : Histogramme de la distribution des principales classes de composés présents dans l'extrait éthanolique de propolis de Gaspé et de Sainte-Flavie (avec la source IE).

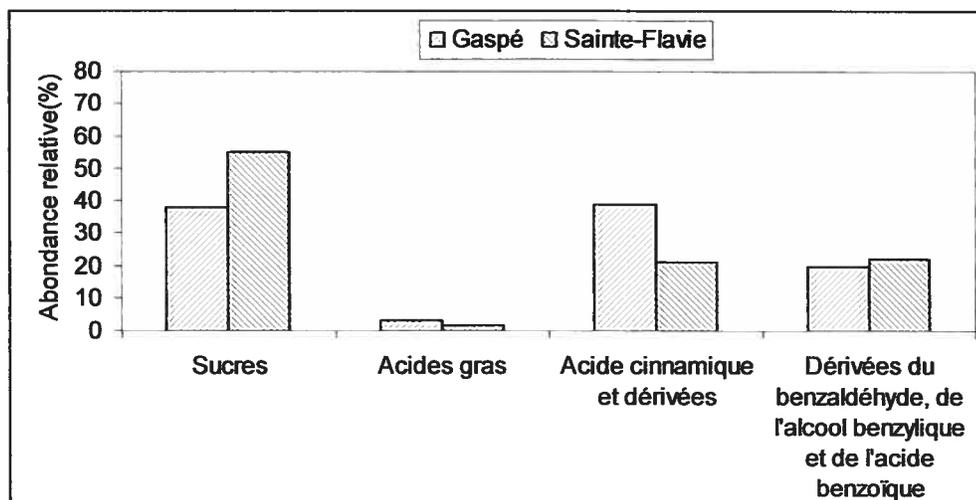


Figure 6.5b : Histogramme de la distribution des principales classes de composés présents dans l'extrait éthanolique de propolis de Gaspé et de Sainte-Flavie (avec la source MAB(*He)).

D'après ces figures, il est possible de voir que ce sont les glucides que l'on retrouve majoritairement dans les deux échantillons et qu'ils sont plus abondants dans la propolis de Sainte-Flavie par rapport à celle de Gaspé. De plus, l'acide cinnamique et ses dérivées sont en grande quantité dans l'échantillon de Gaspé. Ces dernières sont reconnues entre autres pour leurs effets anti-inflammatoire et anti-bactérien.

Par ailleurs, il y a presque deux fois moins d'acides gras dans l'échantillon de Sainte-Flavie que dans celui de Gaspé. Les acides gras sont généralement impliqués dans la régulation de la croissance et de la morphogénèse chez tous les organismes vivants et ils sont une source d'énergie cellulaire [3].

6.4 Comparaison de la source MAB à la source par impact électronique

6.4.1 Comparaison des quatre chromatogrammes

La figure 6.6 suivante présente les quatre chromatogrammes obtenus respectivement avec la source MAB avec l'azote, l'argon et l'hélium comme gaz de décharge ainsi que la source IE à 70 eV.

En regardant la figure 6.6, il est possible de voir que l'allure de chacun des chromatogrammes est plus ou moins similaire. En effet, la majorité des pics se retrouve dans les quatre chromatogrammes, mais c'est dans celui obtenu avec la source IE qu'on retrouve le plus de pics. Cela est dû au fait que cette source, étant plus énergétique, ionise tout ce qui passe dans la source comparativement aux trois autres sources qui sont beaucoup moins énergétiques donc plus sélectives.

Par ailleurs, le chromatogramme obtenu avec la source MAB(N₂*) ressemble davantage à celui obtenu avec la source IE malgré le fait que la première est la moins énergétique. De plus, en regardant les TIC, on remarque que l'accroissement de l'abondance ionique augmente de la façon suivante : IE > N₂ > Ar > He. Cependant, l'ordre logique des TIC devrait être IE > He > Ar > N₂ étant donné que plus la source est énergétique, plus elle devrait générer des ions donc plus le courant ionique devrait être élevé, mais en pratique, avec la source MAB, les pressions d'utilisation optimales des gaz sont différentes pour chaque gaz. Par exemple, avec l'hélium une pression variant de 155 à 185 mbar est utilisée, pour l'argon elle varie de 35 à 50 mbar et pour l'azote de 80 à 110 mbar. Cependant, il aurait été préférable d'optimiser les pressions pour obtenir le maximum de sensibilité, car une modification ou un changement de pièce entraîne des variations au niveau de la dynamique de l'écoulement du gaz [27,48]. Ainsi, cela peut effectivement résulter en des chromatogrammes de différentes intensités.

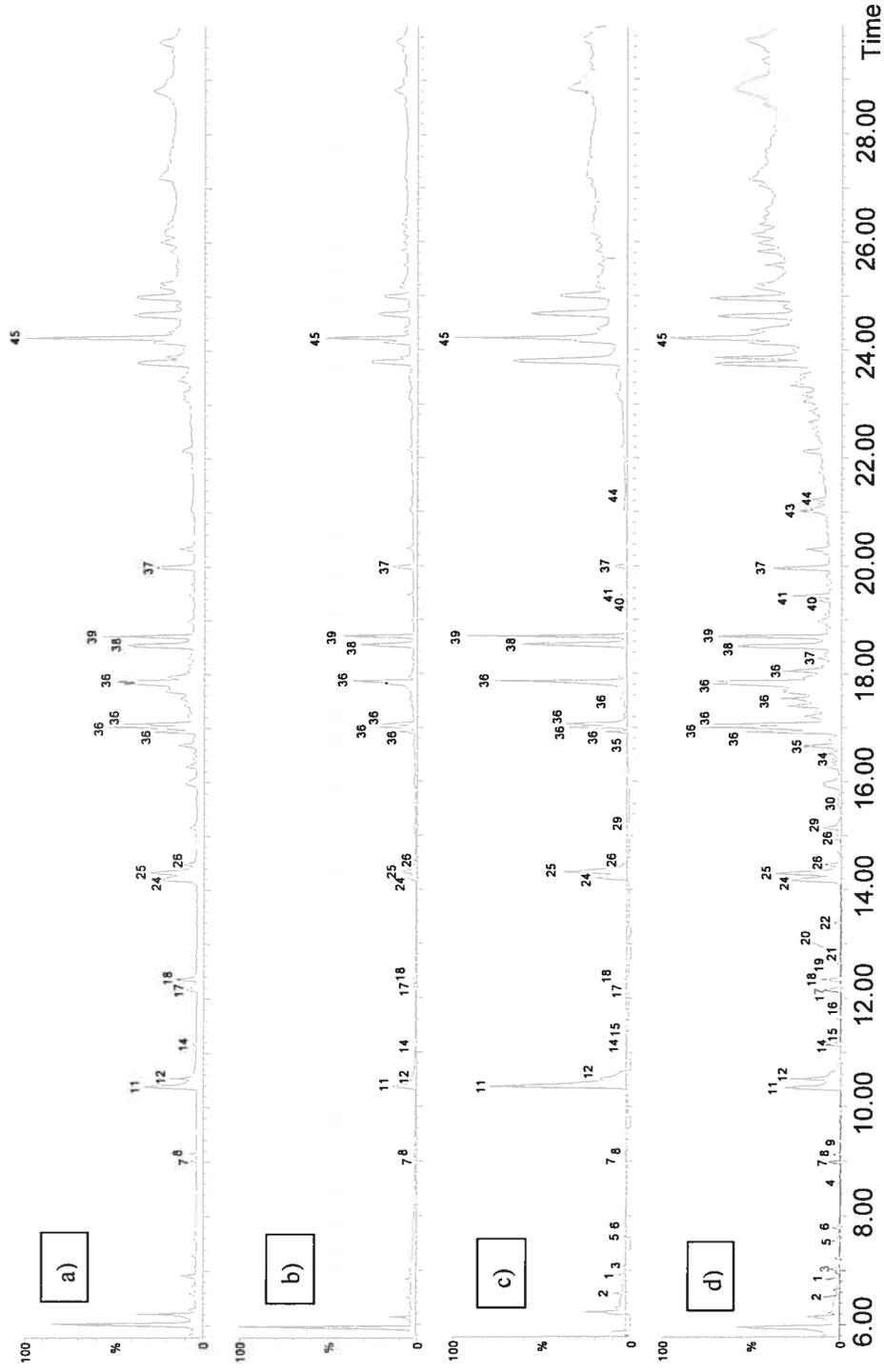


Figure 6.6: Chromatogrammes de la propolis de Sainte-Flavie avec (a) la source MAB(N₂⁺) (TIC 9,44X10⁵), avec (b) la source MAB(Ar⁺) (TIC 5,57X10⁵), avec (c) la source MAB(He⁺) (TIC 4,86X10⁵) et avec (d) la source EI(70eV) (TIC 5,91X10⁶).

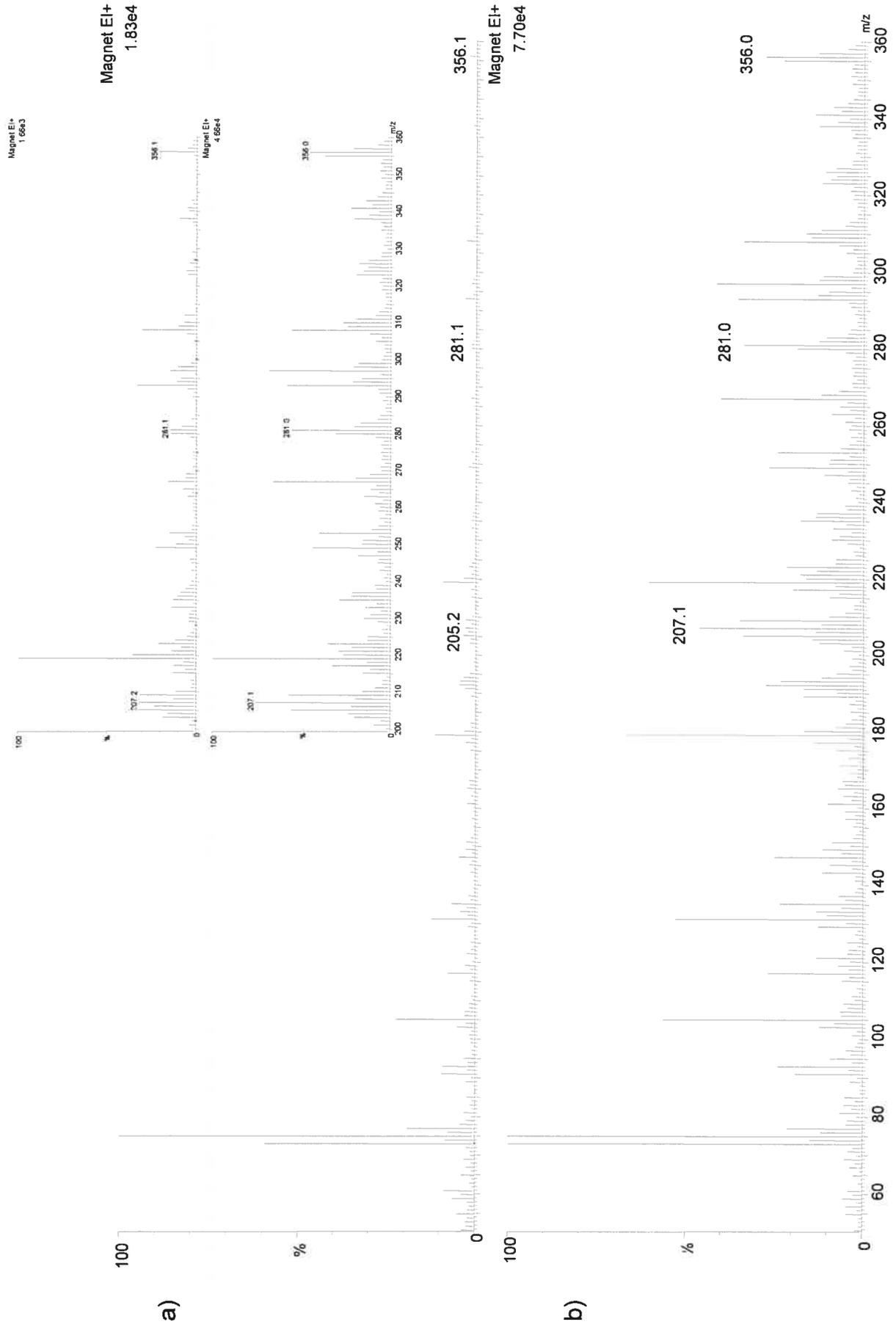
Un inconvénient rencontré avec la source MAB est que le courant ionique total des chromatogrammes obtenus avec cette source est en moyenne environ 10 fois moins élevé que le chromatogramme obtenu avec la source IE. En effet, il est possible de voir qu'avec l'azote comme gaz de décharge le TIC est de $9,44 \times 10^5$, avec l'argon le TIC est de $5,57 \times 10^5$ et pour l'hélium il est de $4,86 \times 10^5$ alors qu'avec la source IE le TIC est de $5,91 \times 10^6$. Par contre, cela ne nuit pas à la détection adéquate des composés qui éluent de la colonne.

Par ailleurs, en regardant les chromatogrammes, il semble que pour le chromatogramme obtenu avec la source IE, à partir de 22 minutes le taux de saignement de la colonne augmente considérablement et ce, beaucoup plus que pour les autres chromatogrammes. En fait, dans les quatre chromatogrammes, le saignement est le même puisqu'il provient du chromatographe gazeux opéré dans les mêmes conditions et non du spectre de masse. La seule différence provient de la quantité d'énergie utilisée pour ioniser les molécules. Donc, puisque la source MAB est moins énergétique que la source IE et que les molécules de la phase stationnaire ont un potentiel d'ionisation plus élevé, il est normal que le saignement soit moins apparent avec la source MAB.

Les pics correspondant à l'écoulement de la phase stationnaire dans les spectres de masse se trouvent à m/z 207, 281 et 355 [47]. Les spectres de masse suivants démontrent qu'il y a effectivement la présence du saignement de la colonne et que les fragments associés à la phase stationnaire sont beaucoup plus intense dans le spectre de masse obtenu avec la source IE, ce qui explique pourquoi dans la figure 6.7 le bruit paraît plus important. Pour améliorer l'aspect des spectres, il aurait fallu utiliser une colonne avec un faible taux de saignement (*low bleeding column*).

Par cet exemple, il est possible de voir de quelle manière la source MAB peut diminuer ou parfois éliminer les interférences pouvant nuire à l'identification des spectres de masse lorsqu'on a recours à une librairie spectrale.

Figure 6.7: Spectre de masse du signal du bruit de fond obtenue a) avec la source MAB et b) avec la source IE et l'agrandissement de la région comprise entre m/z 200 et m/z 360.



6.4.2 Comparaison des spectres de masse

Un avantage de la source MAB est qu'il est possible de contrôler la fragmentation des molécules. En effet, le degré de fragmentation d'une molécule dépend de la quantité d'énergie interne qui lui est transférée lors de son ionisation. D'après l'équation 4, cette énergie dépend de l'énergie d'excitation de l'espèce métastable, de l'énergie d'ionisation de la molécule analyte et de l'énergie cinétique de l'électron éjecté. Comme déjà mentionné, chaque gaz utilisé avec la source MAB possède des états métastables avec des énergies spécifiques qui leur sont associées (voir tableau 2.1). Ainsi, tout dépendant du gaz utilisé, le spectre généré fournira de l'information différente sur la molécule analyte. Deux exemples sont illustrés dans la figure 6.8 qui représente le pic **14** soit le p-hydroxybenzaldehyde et dans la figure 6.9 qui représente le pic **24** soit l'acide salicylique.

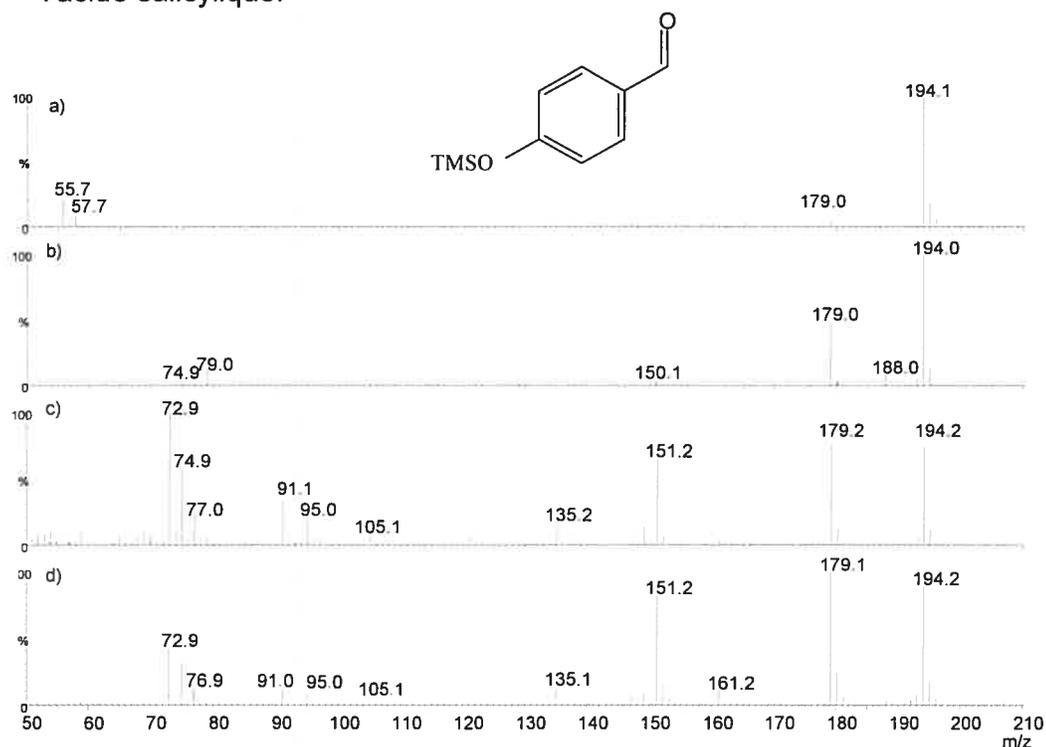


Figure 6.8 : Spectres de masse du p-hydroxybenzaldehyde (m/z 194) avec la source MAB(N₂^{*}) (a), avec la source MAB(Ar^{*}) (b), avec la source MAB(He^{*}) (c) et avec la source IE(70eV) (d)

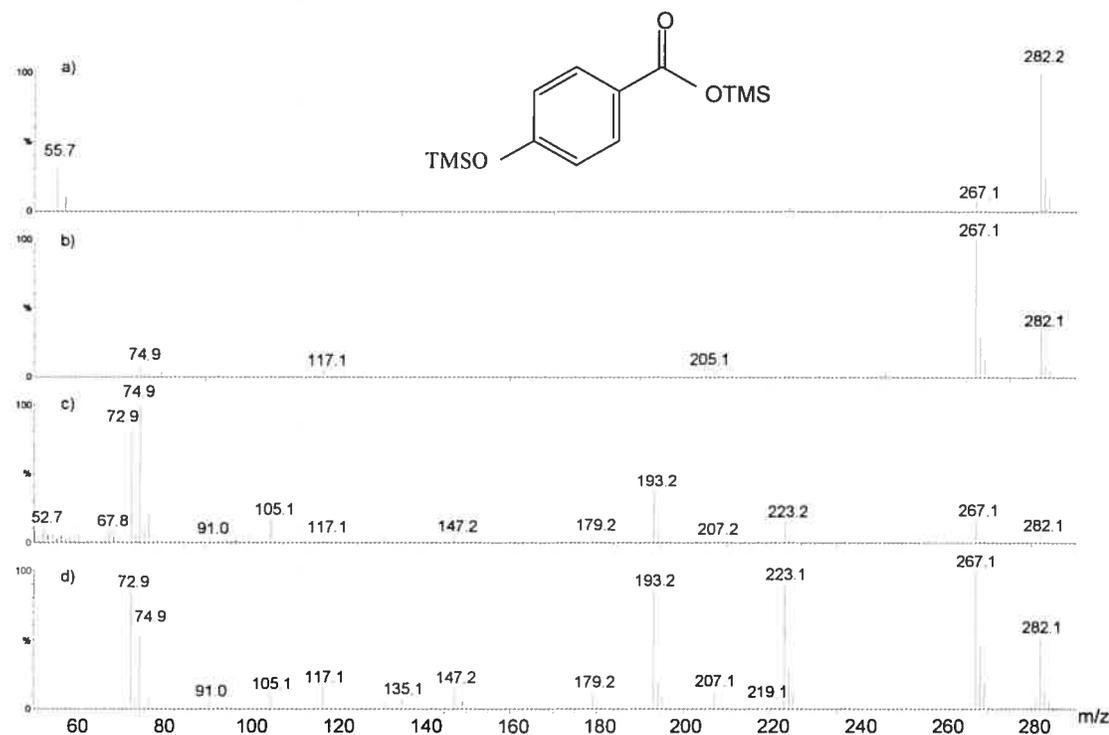


Figure 6.9 : Spectres de masse de l'acide salicylique (m/z 282) avec la source MAB(N₂^{*}) (a), avec la source MAB(Ar^{*}) (b), avec la source MAB(He^{*}) (c) et avec la source IE(70eV) (d)

En regardant les spectres des deux molécules il est possible de voir que pour la même molécule le degré de fragmentation varie avec le gaz utilisé. Ainsi, avec l'azote (figures 6.7 et 6.8 (a)) qui a une énergie d'excitation de 8,52 eV, c'est l'ion moléculaire qui est présent dans les spectres avec un très petit fragment correspondant à une perte de méthyle. Ensuite lorsque l'argon qui a une énergie d'excitation de 11,55 eV est utilisé, plus d'énergie est transférée aux molécules et la fragmentation est plus apparente qu'avec l'azote. Finalement, avec l'hélium (19,82 eV) la fragmentation est encore plus abondante étant donné la quantité d'énergie qui est transférée.

De plus, en ayant recours à des gaz moins énergétiques, l'intensité du signal de fond dans les spectres de masse est considérablement réduite. Ainsi, dans les spectres de masse obtenus avec l'hélium, il y a beaucoup de fragmentation tel qu'observé par les fragments m/z 73 (Si(CH₃)₃⁺) et

m/z 75 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{OH}^+$) surtout vers les basses masses tandis que les spectres de masses obtenus avec l'azote n'en contiennent pratiquement pas.

Par ailleurs il est possible de remarquer que le patron de fragmentation obtenu avec l'hélium est très similaire à celui obtenu avec la source par impact électronique à 70 eV et pour la figure 6.7 (c) et (d) l'intensité des fragments est quasiment la même.

De plus, avec la source MAB, en choisissant le gaz approprié, la fragmentation de l'analyte peut être contrôlée sans pour autant diminuer la sensibilité, ce qui n'est pas possible avec la source IE [15].

Un autre avantage de la source MAB est qu'on peut avoir recours à cette méthode pour confirmer la présence de l'ion moléculaire d'un composé dans le cas où celui-ci ne serait pas présent ou dans le cas où son abondance relative ne serait pas assez élevée. Par exemple, dans la figure 6.9, l'ion moléculaire (m/z 282) dans le spectre (c) est très faible et on pourrait croire qu'il ne correspond pas à l'ion moléculaire, mais en regardant le spectre obtenu avec l'azote ou l'argon comme gaz de décharge, il est possible de confirmer la présence de l'ion moléculaire étant donné que le fait d'effectuer de l'ionisation sélective augmente l'intensité des ions moléculaires.

6.5 L'identification des composés à l'aide de la banque de donnés

6.5.1 Pureté

Pour identifier les composés présents dans les échantillons de propolis, la banque de spectres qui était disponible, soit la librairie NIST a été utilisée. Pour ce faire, les spectres de masse obtenus avec la source IE et ceux obtenus avec la source MAB(He^*) ont été comparés à ceux de la banque

de donnée. Après la recherche, le logiciel fournit une série de spectres de masse correspondant le plus au spectre expérimental basé sur l'indice de pureté qui indique à quel point les spectres sont comparables. L'indice de pureté est en fait un score qui établit une relation entre le spectre de masse de la base de donnée et le spectre du composé expérimental. Ainsi, plus l'indice de pureté est élevé plus le nombre de pic dans le spectre de masse expérimental est retrouvé dans le spectre de masse du composé provenant dans la banque de donnée, donc deux spectres sont identiques lorsque que l'indice de pureté est de 1000.[29]

Les tableaux 6.4 et 6.5 suivants fournissent les indices de pureté obtenus pour chacun des échantillons avec les deux sources mentionnées précédemment.

Tableau 6.4 : Comparaison de la pureté obtenue avec la source IE et la source MAB pour l'échantillon de Gaspé.

Composé	Pureté IE	Pureté MAB He
alcool phénétylique	936	824
acide benzoïque	863	965
p-hydroxybenzaldéhyde	892	896
p-hydroquinone	984	962
acide hydrocinnamique	859	933
acide cinnamique	959	843
acide 3-hydroxy-3-phénylpropionique	826	939
acide salicylique	736	811
valérianol	617	688
alcool furfurylique	830	975
acide férulique	766	919

Tableau 6.5 : Comparaison de la pureté obtenue avec la source IE et la source MAB pour l'échantillon de Sainte-Flavie.

Composé	Pureté IE	Pureté MAB He
1,3,5-triméthylbenzène	904	949
alcool éthylénique	647	914
acide benzoïque	846	974
p-hydroxybenzaldehyde	925	816
p-hydroquinone	901	955
aldéhyde vanillique	680	866
acide cinnamique	685	758
acide vanillique	872	656
acide p-trans-coumarique	753	904
acide hexadécanoïque	787	820
acide férulique	804	715

En observant les deux tableaux, il est possible de voir que les indices de pureté trouvés avec la source MAB(He*) se rapprochent de ceux trouvés avec la source IE. Dans certains cas, les indices de pureté obtenus avec la source MAB(He*) sont supérieurs à ceux de obtenus avec la source IE. Par exemple, dans le tableau 6.4 qui correspond à l'échantillon de Gaspé, l'acide benzoïque obtient un score de 965 avec la source MAB(He*) et un score de 863 avec la source IE. Aussi, l'alcool furfurylique obtient un score de 975 avec la source MAB(He*) et un score de 830 avec la source IE. Par ailleurs, dans le tableau 6.5 qui représente l'échantillon de Sainte-Flavie, la différence est encore plus grande. En effet, l'alcool éthylique a un score de 914 avec la source MAB(He*) et un score de 647 avec la source IE. Ces exemples indiquent donc que certains spectres obtenus avec la source MAB se rapprochent davantage aux spectres de la base de donnée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les spectres contenus dans la base de donnée sont pris à partir de composés purs et que dans le cadre de ce projet des mélanges complexes ont été utilisés. Ainsi, étant donné que moins d'énergie est transférée aux molécules avec la source MAB(He*) (comparativement aux spectres obtenus avec la source IE) les spectres obtenus contiennent moins de bruit et ressemblent donc plus aux spectres de la banque de donnée.

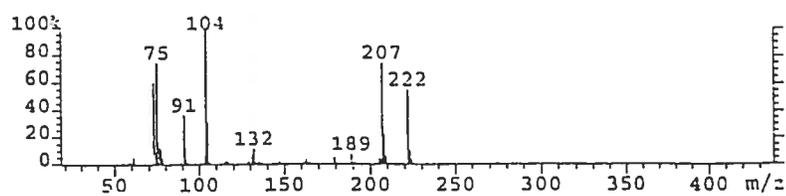
6.5.2 Comparaison de la source MAB(He*) à la source par impact électronique

Comme il a été vu précédemment, un élément intéressant avec la source MAB est qu'il est possible d'utiliser les banques de données commerciales pour identifier les composés analysés. En effet, les spectres de masse obtenus avec la source MAB(He*) donnent des patrons de fragmentation assez similaires aux spectres de masse obtenus avec la source IE (70 eV) étant donné que l'état quantique prédominant de l'hélium est à une énergie de 19.82 eV et que presque tous les mécanismes de

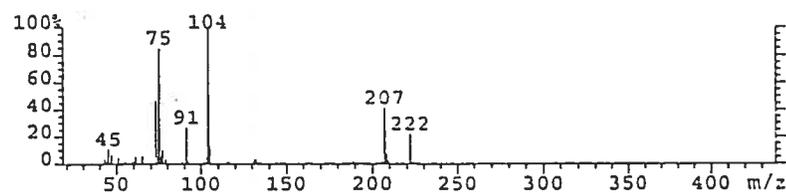
fragmentation se produisent pour la plupart des familles de composés organiques à une énergie inférieure à 20 eV [45]. Ainsi, il est possible de les comparer avec les spectres de la librairie commerciale.

Les figures suivantes présentent les spectres de masse obtenus avec les deux sources d'ionisation ainsi que les spectres de masse de la base de données qui leur correspondent.

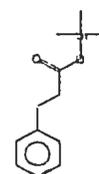
a)



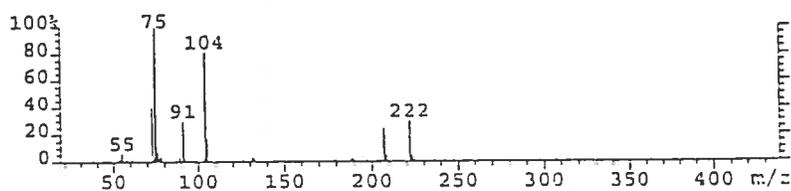
b)



Libraries 1: NIST (62235) 2: NISTREP (21249)



c)



d)

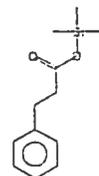
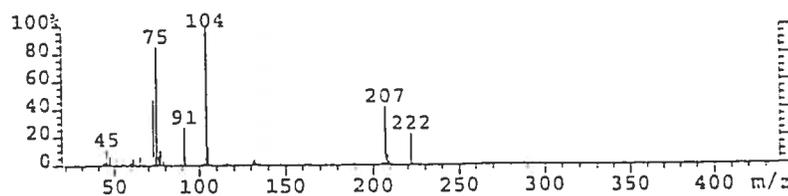
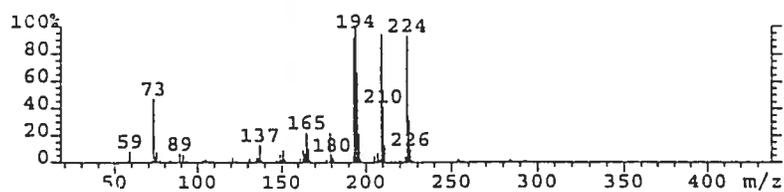
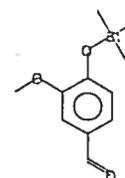
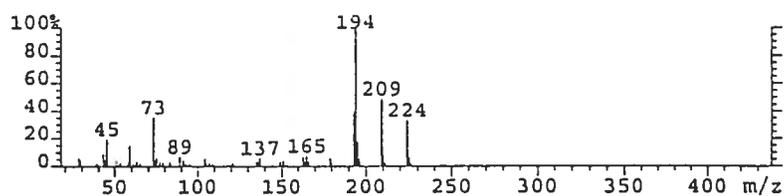


Figure 6.10: Spectre de masse de l'acide hydrocinnamique (m/z 222) avec la source IE (70eV) (a), avec la source MAB(He⁺) (c) et avec la banque de données (b et d) pour l'échantillon de Gaspé.

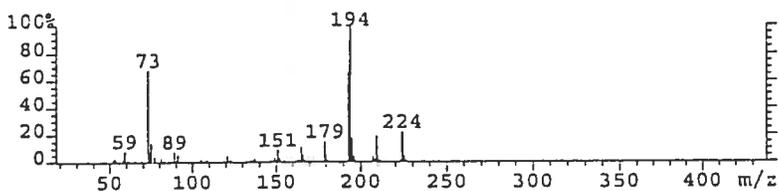
a)



b)



c)



d)

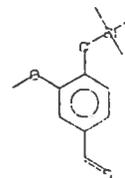
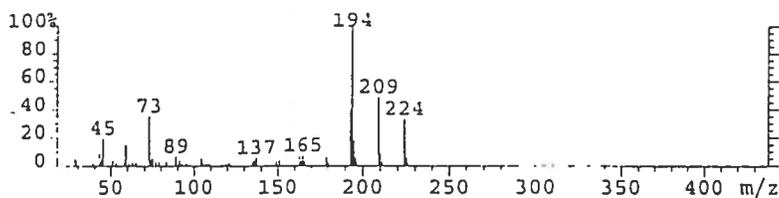
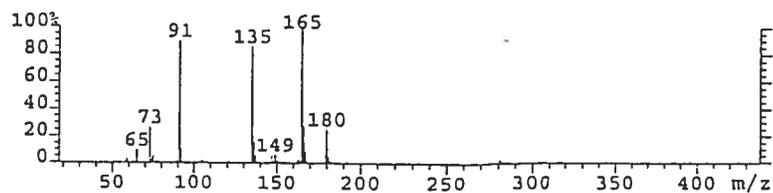
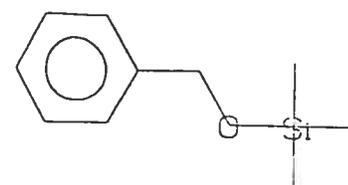
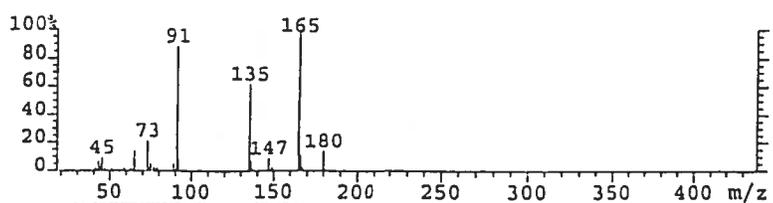


Figure 6.11: Spectre de masse de l'aldéhyde vanillique (m/z 224) avec la source IE (70 eV) (a), avec la source MAB(He^*) (c) et avec la banque de données (b et d) pour l'échantillon de Sainte-Flavie.

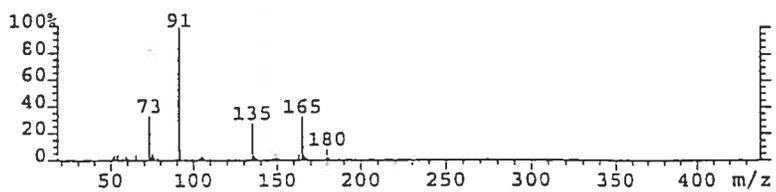
a)



b)



c)



d)

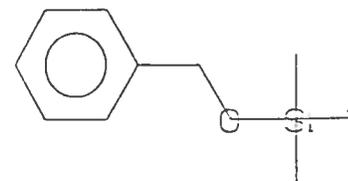
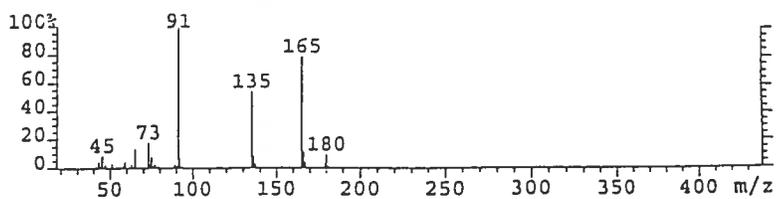
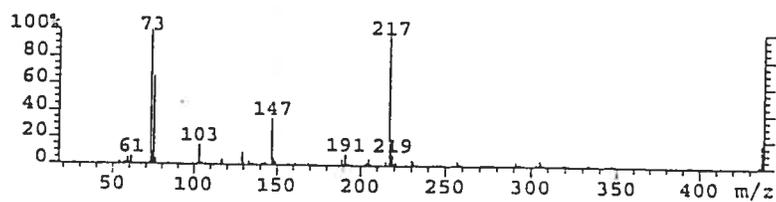
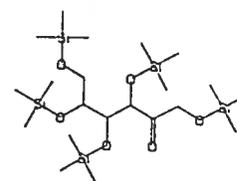
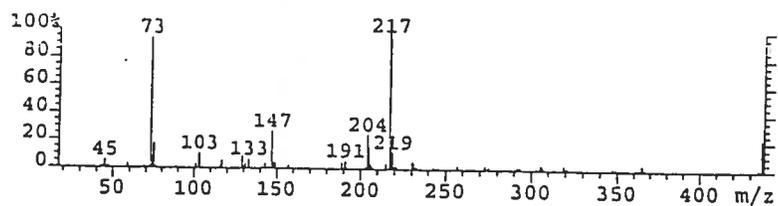


Figure 6.12 : Spectre de masse de l'alcool benzylique (m/z 180) avec la source IE (70 eV) (a), avec la source MAB(He*) (c) et avec la banque de données (b et d) pour l'échantillon de Sainte-Flavie.

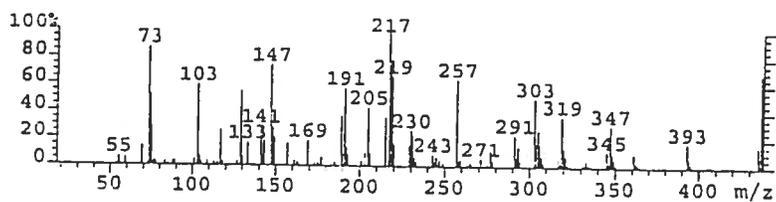
a)



b)



c)



d)

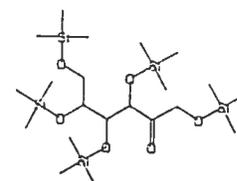
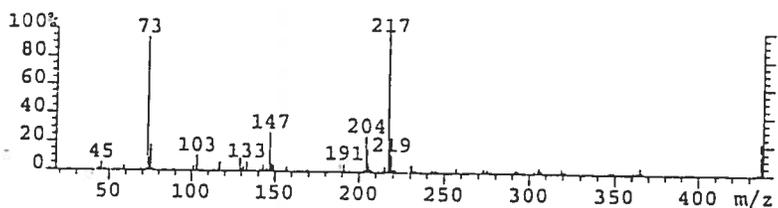


Figure 6.13 : Spectre de masse du D-fructose (m/z 540) avec la source MAB(He^*) (a), avec la source IE (70 eV) (c) et avec la banque de données (b) et (d) pour l'échantillon de Sainte-Flavie.

Les exemples précédents sont des composés appartenant à des familles différentes (acide, aldéhyde, alcool et sucre). Pour les trois premières figures (6.10 à 6.12), il est possible de voir que les spectres de masse obtenus avec la source MAB(He^{*}) et ceux obtenus avec la source IE (70eV) sont très similaires. Par conséquent, l'identification des composés à l'aide de la banque de données a été possible pour les spectres de masse obtenus avec les deux sources. Par contre, pour la figure 6.13 qui correspond aux spectres de masse du D-fructose, le spectre de masse obtenu avec la source IE contenait beaucoup de bruit et la pureté obtenue (482) ainsi que l'allure du spectre de masse n'a pas permis de confirmer avec certitude le résultat fournie par la base de données. C'est donc le spectre de masse obtenu avec la source MAB(He^{*}) qui a permis d'identifier le composé étant donné qu'il ressemblait davantage au spectre de masse de la base de donnée et que la pureté obtenue (902) était nettement supérieure. Cet exemple indique que pour certaines classes de composés, il serait plus avantageux d'avoir recours à la source MAB(He^{*}) puisque cette source génère moins d'énergie, donc moins de fragmentation que la source IE (70 eV).

L'utilisation de la source MAB avec l'hélium s'est avérée très utile pour l'identification de certains composés pour l'échantillon de Gaspé. En effet, avec la source IE, certains spectres contenaient trop de bruit donc il n'y avait aucun spectre de la base de données qui correspondait aux spectres expérimentaux. Par contre, en prenant le spectre de masse du même composé obtenu avec la source MAB(He^{*}) il a été possible d'identifier avec la base de données les composés en question.

Le tableau suivant contient les composés qui n'ont pu être identifiés qu'à partir des spectres de masse obtenus avec la source MAB(He^{*}).

Tableau 6.6 : Composés identifiés seulement par MAB(He*) et non pas par EI pour Gaspé

Produit	Temps de rétention (min)	MM
Glycérine	10,53	308
aldéhyde vanillique	14,23	224
Hexose	16,92 / 17,02	540
Hexose	16,92 / 17,02	438
Hexose	17,08	540
Hexose	17,84 / 18,41	540
acide p-trans-coumarique	18,59	308
cinnamate de cinnamyle	23,12	264

D'après le tableau 6.6 il est possible de voir que la glycérine, l'aldéhyde vanillique, les hexoses, l'acide coumarique et le cinnamate de cinnamyle sont les principaux composés qui n'ont pas pu être identifiés en prenant les spectres de masse obtenus avec la source IE. À titre d'exemple, deux spectres sont présentés dans les figures 6.14 et 6.15, soit celui du cinnamate de cinnamyle (m/z 264) et celui de l'aldéhyde vanillique (m/z 224) obtenus avec la source MAB(He*) et avec la source IE. Ces deux figures démontrent clairement que la source IE génère beaucoup trop de fragments comparativement à la source MAB(He*) et qu'il n'est donc pas possible d'avoir recours à la base de données pour identifier les composés en question, car en plus des fragments présents dans les spectres de masse obtenus avec la source MAB(He*), les spectres obtenus avec la source IE contiennent une multitude d'autres fragments qui nuisent à l'identification des composés.

De plus, il est impossible de dire que le spectre obtenu avec la source IE contient des impuretés puisqu'il s'agit du même échantillon qui a été utilisé avec la source MAB(He*).

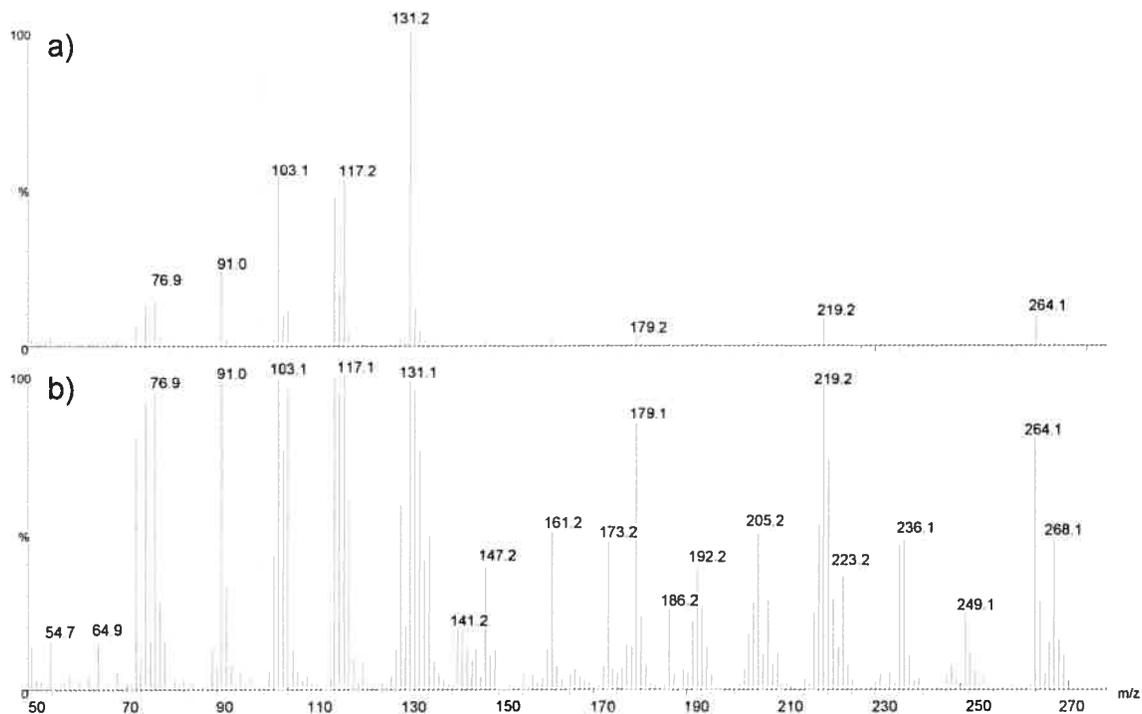


Figure 6.14: Spectre de masse du cinnamate de cinnamyle (m/z 264) avec la source MAB(He*) (a) et avec la source IE (70 eV) (b) pour l'échantillon de Gaspé

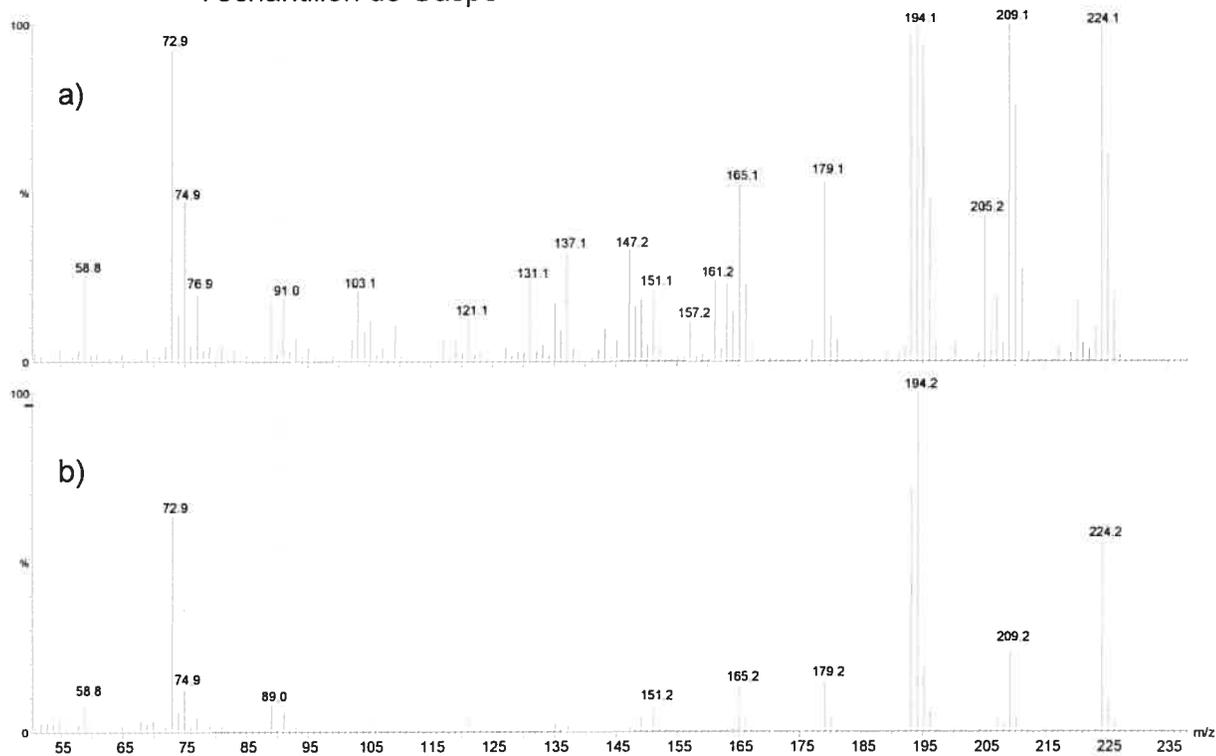


Figure 6.15: Spectre de masse de l'aldéhyde vanillique (m/z 224) avec la source IE (70 eV) (a) et avec la source MAB(He*) (b) pour l'échantillon de Gaspé.

Ainsi, il est possible de voir par ces exemples que la source MAB peut être un outil très utile pour l'identification des composés dans les produits naturels lorsque la source IE génère trop de fragmentation et que l'interprétation des spectres de masse ne peut se faire même avec la banque de données commerciale.

Chapitre 7: Conclusion

Les études effectuées sur l'analyse de la composition chimique de la propolis au cours des années s'est faite surtout en ayant recours à la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec une source d'ionisation par impact électronique. Il a été vu que, malgré les avantages de cette source qui incluent sa reproductibilité, sa grande sensibilité et la quantité importante de spectres accumulés au cours des années dans les bibliothèques spectrales qui permettent l'identification rapide et fiable des composés analysés, cette source comporte quelques limitations. En effet, dû au fait que l'énergie interne transférée aux molécules lors de l'ionisation entraîne une fragmentation considérable de ceux-ci, bien souvent, les spectres de masse obtenus sont trop complexes et ne permettent pas l'identification des composés ou dans d'autres cas, l'ion moléculaire est absent ou d'abondance relative faible, ce qui complique la détermination de la masse moléculaire des composés.

Un des objectifs de ce projet était d'utiliser une nouvelle source d'ionisation dans le but de vérifier si elle était comparable à la source d'ionisation par impact électronique. L'ionisation par bombardement d'atomes métastables (MAB), comme déjà mentionné, est une nouvelle technique d'ionisation qui permet de contrôler la fragmentation et d'effectuer de l'ionisation sélective. Ainsi, la source MAB a été utilisée pour analyser deux échantillons de propolis. Les résultats obtenus suite à l'analyse de ces deux échantillons provenant de la région de Gaspésie ont permis de tirer plusieurs conclusions.

D'abord, il a été démontré que, pour analyser les composés polaires contenus dans la propolis, il fallait enlever la cire contenue dans l'échantillon. Ainsi, l'éthanol est le solvant qui permet d'éliminer le maximum de cire.

Les échantillons de propolis analysés venaient tous deux de la région de Gaspésie et malgré cela leur composition chimique, bien que très similaire, comportait quelques différences. Dans la propolis de Gaspé, 47 composés ont pu être identifiés, majoritairement des sucres et des acides aromatiques. Dans la propolis de Sainte Flavie, 37 composés ont été identifiés et tout comme dans l'autre échantillon, il y avait principalement des sucres et des acides aromatiques. Le premier échantillon comparativement au second, contenait presque deux fois plus d'acides gras.

Malgré le fait que certaines molécules n'ont pas pu être identifiées dû aux limitations de la banque de donnée, quelques molécules de plus hautes masses ont été identifiées. En effet, dans la propolis de Gaspé il y avait le cinnamate de cinnamyle et l'émodine d'aloès qui sont des molécules biologiquement actives et dans la propolis de Sainte-Flavie, il y avait du sucrose.

Les chromatogrammes obtenus avec chacun des gaz pour la source MAB et avec la source IE ont été comparés et la majorité des pics étaient présents dans les quatre chromatogrammes, mais ils étaient plus nombreux dans le chromatogramme obtenu avec la source IE étant donné que cette dernière ionise tout ce qui passe dans la source, car elle est plus énergétique (70 eV).

Dans les chromatogrammes, la sensibilité de la source MAB était de 6 à 12 fois inférieure à la source IE dépendamment du gaz utilisé, mais cela n'a pas nui à la détection des composés étant donné qu'ils ont pu être identifiés.

Les résultats obtenus ont démontré qu'avec la source MAB, il est possible de contrôler la fragmentation des molécules et tout dépendant du gaz utilisé, le spectre de masse généré fournira de l'information différente sur la molécule analyte. Ainsi en utilisant l'azote comme gaz de décharge, on obtient

majoritairement l'ion moléculaire étant donné que ce gaz est le moins énergétique. Par contre, si l'hélium est utilisé, la fragmentation est beaucoup plus abondante puisque plus d'énergie est transférée à la molécule.

Un autre avantage rencontré avec la source MAB est qu'en ayant recours à des gaz moins énergétiques il est possible de réduire la fragmentation des ions lors de l'ionisation et des interférences dans les spectres de masse comme les fragments associés au saignement de la colonne.

Par ailleurs, il a été possible de montrer que le patron de fragmentation obtenu avec l'hélium est très similaire à celui obtenu avec la source par impact électronique à 70 eV donc que la recherche dans une banque de spectres peut être effectuée avec les résultats trouvés avec la source MAB(He^{*}). Aussi, les résultats indiquent que quelques spectres obtenus avec la source MAB se rapprochent davantage aux spectres de masse de la base de données et que dans certains cas, seuls les spectres de masse obtenus avec la source MAB(He^{*}) ont permis l'identification des composés. En effet, la source par impact électronique étant hautement énergétique, génère quelques fois trop de fragments dans les spectres et les rendent ainsi impossible à l'interpréter et ce, même à l'aide d'une banque de données commerciale.

Puisque les abeilles se servent de la propolis pour embaumer les prédateurs, stériliser leur ruche contre les infections et que les échantillons contenaient des composés actifs biologiquement, il est certain que ces échantillons ont une certaine activité biologique. Ainsi, des projets futurs pourraient porter sur l'étude de l'activité bactérienne et antivirale des deux échantillons et leur comparaison aux antibiotiques les plus utilisés.

À la lueur des résultats obtenus, on est en mesure de dire que la source MAB, même si elle ne remplace pas la source par impact électronique, peut

quand même être utilisée comme un outil complémentaire lors de la caractérisation des composés contenus dans les produits naturels étant donné qu'elle génère des spectres de masse moins complexes, donc, plus faciles à interpréter.

Références

- 1- A. dos Santos Pereira, A.C. Pinto, J.N. Cardoso, F.R. de Aquino Neto, M.F. de Souza Ramos, G.M. Dellamora-Ortiz et E.P. dos Santos, J. High Resolu. Chromatogr. 21 (1998) 396-400
- 2- G.A. Burdock, Food Chem. Toxicol. 36 (1998) 347-363
- 3- A.S. Pereira, M. Norsell, J.N. Cardoso, F.R. Aquino Neto et M.F.S. Ramos, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5226-5230
- 4- S. Castaldo, F. Capasso, Fitoterapia 73 Suppl. 1 (2002) S1-S6
- 5- J.D. Fontana, M. Passos, M.H.R. dos Santos, C.K. Fontana, B.H. Oliveira, L. Schause, R. Pontarolo, M.A. Barbirato, M.A. Ruggiero et F.M. Lanças, Chromatogr. 52 (3/4) (2000) 147-151
- 6- M. Kartal, S. Kaya et S. Kurucu, Z. Naturforsch. 57c (2002) 905-909
- 7- P.G. Pietta, C. Gardana et A.M. Pietta, Fitoterapia 73 Suppl. 1 (2002) S7-S20
- 8- W. Maciejewicz, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 24 (8) (2001) 1171-1179
- 9- V. Bankova, Al. Dyulgerov, S. Popov et N. Marekov, Z. Naturforsch. 42c (1987) 147-151
- 10- C. Garcia-Vigura, F. Ferrereo et F.A. Tomas-Barberan, Z. Naturforsch. 48c (1993) 731-735
- 11- K. Salomao, A.P. Dantas, C.M. Borba, L.C. Campos, D.G. Machado, F.R. Aquino Neto et S.L. de Castro, Lett. in Appl. Microbiol. 38 (2004) 87-92
- 12- M. Vanhaelen et R. Vanhaelen-Fastré, J.Pharm, Belg. 34 (6) (1979) 317-328
- 13- O.J. Catchpole, J.B. Grey, K.A. Mitchell et J.S. Lan, J. of Supercritical Fluids 29 (2004) 97-106
- 14- S. Moore, L. Vromet et B. Rondeau, Chemosphere 54 (2004) 453-459
- 15- S. Moore, Chemosphere 49 (2002) 121-125
- 16- M.G. Ikonomou, Anal. Chem. 74 (20) (2002) 5263-5272
- 17- S. Letarte, D. Morency, J. Wilkes et M.J. Bertrand, J. Anal. Appl. Pyrolysis 71 (2004) 13-25

- 18- M. Boutin, J. Lesage, C. Ostiguy et M.J. Bertrand, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 70 (2003) 505-517
- 19- R. Volpert et E.F. Elstner, *Z. Naturforsch.* 48c (1993) 851-857
- 20- T. Usia, A.H. Banskota, Y. Tezuka, K. Midorikwa, K. Matsushige et S. Kadota, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 673-676
- 21- S. Kumazawa, T. Hamasaka et T. Naleayama, *Food Chem.* 84 (2004) 329-339
- 22- B.J. Wang, Y-H. Lien et Z.-R. Yu, *Food Chem.* 86 (2004) 237-243
- 23- T. Nagai, R. Inoue, H. Inoue et N. Suzuki, *Food Chem.* 80 (2003) 29-33
- 24- E. Prytyk, A. Dantas, K. Salomao, S. Pereira, V.S. Bankova, S.L. de Castro et F.R. Aquino Neto, *J. Ethnophar.* 88 (2003) 189-193
- 25- Y.S. Song, C. Jin, K.J. Jung, E.-H. Park, *J. of Ethnophar.* 82 (2002) 89-95
- 26- W. Maciejewicz, M. Daniewski, K. Bal et W. Markowski, *Chromatogr.* 53 (5/6) (2001) 343-346
- 27- D. Faubert, *Développement et applications d'une source d'ionisation utilisant le bombardement par atomes métastables*, Département de chimie, Faculté des Arts et des sciences, juin 1999
- 28- R. Christov, *Application of Gas Chromatography and Mass Spectrometry for Analysis of Propolis from Different Geographic Regions*, Département de chimie, Faculté des Arts et des sciences, avril 2003
- 29- M. Boulos, *Étude comparative du potentiel de la source d'ionisation par bombardement d'atomes métastables avec des sources d'ionisation conventionnelles pour des composé organiques volatils*, Département de chimie, Faculté des Arts et des sciences, mai 2003
- 30- E. Doughty, Certificate of Analysis BSTFA, Supelco, Bellfonte, PA, USA
- 31- D.F. Hunt, *Int. J. Mass. Spectrom Ion Phys.* 45 (1982) 111
- 32- H.M. Fales, W.A. Milne, H. U. Winkles, H.D. Beckey, J.N. Damico et R. Barron, *Anal. Chem.* 47 (1975) 207
- 33- R. Davis, M. Frearson et F.E. Prichard, *Mass Spectrometry*, Jonh Wiley & Sons, Toronto, 1987
- 34- J.R. Chapman, *Practical Organic Mass Spectrometry*, Jonh Wiley & Sons, Toronto, 1993

- 35-C. Dass, *Mass Spectrometry: Clinical and Biochemical Applications*, vol. 2, D.M. Desiderio, New York, 1994
- 36-A. Amirav, *Org. Mass Spectrom.* 26 (1991) 1
- 37-A.G. Harrison, *Chemical Ionisation Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, 1983
- 38-H.R. Schulten, *Int. J. Mass. Spectrom Ion Phys.* 32 (1979) 97
- 39-J.R. Chapman, *Practical Organic Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience Publications, John Wiley & Sons Ltd, Great Britain, 1995
- 40-M. Vanhaelen et R. Vanhaelen - Fastré *J. of Chromatog.* 187 (1980) 255-260
- 41-V.S. Bankova, S.S. Popov et N.L. Marekov, *J. of Chromatog.* 242 (1982) 135-143
- 42-P.E. Siska, *Rev. Mod. Phys.* 65 (1993) 337
- 43-<http://www.mtq.gouv.qc.ca> (Gouvernement du Québec)
- 44-Yve Donadieu : <http://biogassendi.ifrance.com/biogassendi/dossierpropolis.htm#DEFINITION>
- 45-R.D. Levin et S.G. Lias, *Ionization Potential and Appearance Potential Measurements, 1971-1981*, U.S. Department of commerce, Washington D.C., 1982
- 46-F.A. Tomas-Barberan et al., *Phytochem.* 34 (1) (1993) 191-196
- 47-J.Throck, *Introduction to Mass Spectrometry*, Raven Press, NY, 1985, 351pp.
- 48-D. Faubert, G.J.C. Paul, J. Giroux et M.J. Bertrand, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Process* 124 (I) (1993) 69-77.

