HAL
open science

Développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'Harpagophytum et l'Eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine.

Cyril Colas

To cite this version:

Cyril Colas. Développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'Harpagophytum et l'Eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine. : Etude par spectrométrie de masse des harpagosides, des éleuthérosides et du cycloarténol, principes actifs utilisés en phytothérapie équine.. Chemical Sciences. Ecole Polytechnique X, 2006. English. NNT : . pastel-00002923

HAL Id: pastel-00002923

https://pastel.hal.science/pastel-00002923

Submitted on 27 Jul 2010

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

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

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Spécialité CHIMIE

Par

Cyril COLAS

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES POUR LE CONTRÔLE DE LA MÉDICATION PAR L'*HARPAGOPHYTUM* ET L'*ELEUTHEROCOCCUS*, PRINCIPES ACTIFS UTILISÉS EN PHYTOTHÉRAPIE ÉQUINE.

Thèse soutenue le 19 décembre 2006
devant la commission d'examen composée de :

Pr. Bruno LE BIZEC	Président du jury
Pr. Christine ENJALBAL	Rapporteur
Pr. Jérôme LEMOINE	Rapporteur
Dr. Marie-Agnès POPOT	Examinateur
Dr. Yves BONNAIRE	Examinateur
Dr. Stéphane BOUCHONNET	Directeur de thèse

Celui qui trouve sans chercher est celui qui a longtemps cherché sans trouver.

Gaston Bachelard (1884-1962)

Pour commencer je remercie *Yves Bonnaire*, directeur du LCH, ainsi que *Gilles Ohanessian*, directeur du DCMR, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs, ainsi que *Pascale Jaudon* sans qui cette rencontre et ce partenariat n'auraient pas été possibles.

J'adresse mes plus sincères remerciements à *Bruno Le Bizec* qui a accepté de présider ce jury de thèse, ainsi qu'à *Christine Enjalbal* et *Jérôme Lemoine* qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance aux personnes qui m'ont encadré tout au long de ce projet : *Marie-Agnès Popot* et *Stéphane Bouchonnet* pour leur disponibilité, leurs conseils avisés ainsi que leur soutien et leurs encouragements quotidiens tout au long de ces trois années.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des personnes du service *Recherche* du LCH. *Patrice*, pour sa patience, sa gentillesse, et pour tous les moments de complicité et de réflexion passés autour d'un spectro ou en salle de pause. *Sofie*, qui a accepté la lourde tâche de relire et corriger ce manuscrit, pour sa sympathie, sa spontanéité et les divers échanges que l'on a eu au cours des nombreux déjeuners dans des lieux devenus mythiques tels le *Longchamp* ou l'*Hôtel de Ville*. *Orélie*, *Maëlle* et *Emeline*, pour leur dynamisme, leur bonne humeur, ainsi que l'aide qu'elles m'ont apportée lors des études de population. *Ludovic*, *l'autre Thésard*, pour les discussions et réflexions diverses et variées que l'on a pu avoir : courage, t'es le prochain ! Je n'oublie pas non plus les différents stagiaires qui sont venus égailler notre quotidien au fil des ans.
Je remercie également *Françoise*, pour sa gentillesse et toute l'aide qu'elle m'a apportée lors des études de modélisation moléculaire. *Louis Dehennin* et *Philippe*, pour leurs précieux conseils relatifs au système endocrinien, aux enzymes et aux macros HP lors de l'étude sur le γ-orizanol. Le *Dr Garin* et *Bernard Dumeige* du centre agréé d'administration et de prélèvement de Coye-la-Forêt, qui nous ont invités à effectuer une randonnée équestre ainsi qu'une visite privilégiée de l'hippodrome de Chambourcy, pour l'obtention des échantillons biologiques qui ont permis la validation des méthodes développées. Merci également aux chevaux qui se sont prêtés aux différentes expériences.

De même, je voudrais faire un clin d'œil à d'autres compagnons de route, rencontrés lors de ce parcours, et qui ont contribué à rendre plaisantes ces trois années. *Arno*, l'autre acolyte des déjeuners, pour les nombreuses discussions que l'on a pu avoir sur tout et n'importe quoi, l'initiation au *Wanted* : les parties passées, et celles à venir… *Fred*, dit *Monsieur Qualité*, pour les différents échanges et conseils, tant chimiques, électroniques,

que généraux. *Mylène*, pour sa sympathie et son côté arrangeant : merci beaucoup de m'avoir permis d'utiliser cette merveilleuse machine qu'est le LTQ. *Yves*, sa joie de vivre, ses plaisanteries, son optimisme et ses conseils en spectrométrie de masse, en chromatographie, mais aussi en œnologie ou en gastronomie… *Jean*, pour nos discussions sur les évolutions technologiques et le matériel informatique : patience, d'ici quelques années tu pourras jouer à la console avec ton fils ! *Natali*, pour sa spontanéité et ses histoires abracadabrantesques, et oui, beaucoup de choses n'arrivent qu'à toi...

Je remercie également toutes les autres personnes avec lesquelles j'ai été amené à collaborer de près ou de loin au cours de ce projet : l'ensemble du personnel du LCH, de la FNCF et du DCMR, l'ANRT, la société Twydil, les documentalistes de la BCX, les personnes de l'EDX, ainsi que toutes celles et ceux que j'ai pu oublier de citer.

Merci également à tout mon entourage, mes parents, ma sœur, ma famille et mes amis pour leur soutien affectif et moral, et pour avoir supporté l'*éternel étudiant* tout au long de ces années…

Merci à tous.

AVANT-PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire des Courses Hippiques et le Laboratoire de Chimie des Mécanismes Réactionnels de l'École Polytechnique. Il a été financé par l'Association Nationale de la Recherche Technique, les Haras Nationaux et la Fédération Nationale des Courses Françaises.

Ce mémoire, consacré au *Développement de Méthodes Physico-Chimiques pour le Contrôle de la Médication par l'Harpagophytum et l'Eleutherococcus, Principes Actifs Utilisés en Phytothérapie Équine,* est constitué de cinq chapitres.

Le premier chapitre situe les enjeux des recherches entreprises ; il détaille le principe d'un contrôle de la médication et comment celui-ci se déroule. Les propriétés, tant botaniques que pharmacologiques, des plantes étudiées : l'*Harpagophytum procumbens* et l'*Eleutherococcus senticosus* y sont également présentées.

Dans le second chapitre, les différentes techniques expérimentales et les méthodes théoriques employées au cours de cette thèse sont détaillées. Cela concerne la préparation d'échantillon avec les différentes méthodes d'extraction, l'analyse, avec les couplages chromatographiques et la spectrométrie de masse, et la modélisation moléculaire.

Le troisième chapitre, dédié à l'étude de l'*Harpagophytum*, est présenté sur publications. L'extraction des principes actifs à partir des fluides biologiques équins, leur analyse par LC/MS, une approche théorique de la cationisation de l'harpagide par le sodium ainsi qu'une approche métabolique de l'harpagoside y sont développées.

Une application directe de ces résultats à l'étude des éleuthérocoques est présentée dans le chapitre 4, complétée par la recherche des principes actifs dans les compléments alimentaires.

Le cinquième et dernier chapitre est un bilan des applications, des résultats et des perspectives qui découlent du travail effectué au cours de ces trois années.

Au sein des différents chapitres, les références bibliographiques sont numérotées par partie et indexées à la fin de chacune d'elles. Les tableaux, les figures et les équations sont également référencés et numérotés par partie.

PLAN GÉNÉRAL

Avant-Propos ____ *i*
Plan Général ____ *iii*
Table des Matières ____ *v*
Abréviations et Acronymes ____ *xiii*
Chapitre 1 - Introduction Générale ____ *1*
I. Contrôle de la Médication ____ **3**
II. Harpagophytum ____ **13**
III. Eleutherococcus ____ **25**
IV. Objectifs de la Thèse ____ **37**
Chapitre 2 - Techniques Expérimentales et Méthodes Théoriques Utilisées ____ *39*
I. Préparation d'Échantillon ____ **41**
II. Chromatographie ____ **57**
III. Spectrométrie de Masse ____ **75**
IV. Modélisation Moléculaire ____ **123**
Chapitre 3 - Harpagophytum (sur Publications) ____ *135*
I. Présentation ____ **137**
II. Préparation d'Échantillon ____ **141**
III. Analyse par LC/MS ____ **167**
IV. Approche Théorique de la Cationisation ____ **191**
V. Approche Métabolique ____ **213**
VI. Conclusion ____ **221**
Chapitre 4 - Eleutherococcus ____ *223*
I. Présentation ____ **225**
II. Conditions Expérimentales ____ **227**
III. Résultats et Discussion ____ **233**
IV. Approche Métabolique ____ **249**
V. Conclusion ____ **255**
VI. Références ____ **257**
Chapitre 5 - Conclusion Générale ____ *259*
I. Analyse d'Échantillons de Routine ____ **261**
II. Métabolisme ____ **263**
III. Compléments Alimentaires ____ **265**
IV. Perspectives ____ **267**

Annexes _____ *269*

Annexe I AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry _____ **271**

Annexe II 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians _____ **277**

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos — *i*

Plan Général — *iii*

Table des Matières — *v*

Abréviations et Acronymes — *xiii*

Chapitre 1 - Introduction Générale — *1*

I. Contrôle de la Médication — 3
1. Présentation du LCH — 3
   1.1. Historique — 3
   1.2. Activités — 4
2. Traitements Thérapeutiques — 5
   2.1. Substances prohibées et substances interdites — 5
   2.2. Les substances à seuil — 5
   2.3. Les médications — 6
3. Déroulement d'un Contrôle de la Médication — 7
   3.1. Prélèvement de l'échantillon — 7
   3.2. Analyse de l'échantillon A — 7
      a. Screening — 7
      b. Séquence de confirmation — 9
   3.3. Cas d'un échantillon suspecté de contenir une substance prohibée — 9
      a. Analyse de l'échantillon B — 9
      b. Sanctions — 9
4. Références — 11

II. Harpagophytum — 13
1. La Plante et son Habitat — 13
   1.1. La plante — 13
      a. Classification botanique classique — 13
      b. Autres appellations — 15
      c. Description — 15
   1.2. L'habitat — 16
2. Propriétés Pharmacologiques — 18
   2.1. Principes actifs — 18
   2.2. Action pharmacologique — 19
   2.3. Mode d'action — 19
3. Références — 21

III. Eleutherococcus — 25
1. La Plante et son Habitat — 25
   1.1. La plante — 25
      a. Classification botanique classique — 25
      b. Autres appellations — 27
      c. Description — 28
   1.2. L'habitat — 29
2. Propriétés Pharmacologiques — 30
   2.1. Principes actifs — 30
      a. Composition de E. senticosus. — 30
      b. Les éleuthérosides — 30
   2.2. Action pharmacologique — 32
3. Références — 34

IV. Objectifs de la Thèse — 37

Chapitre 2 - Techniques Expérimentales et Méthodes Théoriques Utilisées 39

I. Préparation d'Échantillon 41
1. LLE – Extraction Liquide-Liquide 41
1.1. Présentation 41
1.2. Principe 41
a. Processus d'extraction 41
b. Constante de distribution 42
c. Efficacité de l'extraction 43
d. Extractions multiples 43
2. SPE – Extraction sur Phase Solide 44
2.1. Présentation 44
2.2. Développement d'une méthode de SPE 44
a. Choix du type de phase 44
b. Protocole d'extraction 48
2.3. Matériel utilisé 49
3. ASE – Extraction par Solvant à Chaud et sous Pression 51
3.1. Présentation 51
3.2. Utilisation de l'ASE 51
a. Préparation d'une cellule 51
b. Fonctionnement de l'ASE 52
4. Bibliographie 55

II. Chromatographie 57
1. Généralités 57
1.1. Historique 57
1.2. Principes 57
a. Principe général de la chromatographie 57
b. Grandeurs utilisées en chromatographie 58
c. Objectif d'une méthode chromatographique 60
2. LC – Chromatographie Liquide 61
2.1. Le système de pompage 61
a. Mode isocratique 62
b. Gradient d'élution 62
2.2. L'injecteur 63
2.3. La colonne 64
2.4. Matériel utilisé 65
2.5. Les développements récents en HPLC 66
a. UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography 66
b. HTLC – High-Temperature Liquid Chromatography 66
c. Nouvelles colonnes 67
3. GC – Chromatographie Gazeuse 68
3.1. L'injecteur 68
a. Injection avec division de flux 68
b. Injection sans division de flux 69
3.2. Le four et la colonne capillaire 70
4. Références 73

III. Spectrométrie de Masse 75
1. Généralités 75
1.1. Qu'est-ce qu'un spectromètre de masse ? 75
1.2. Historique 76
1.3. Principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse 76
a. La source 76
b. L'analyseur 77
c. Le détecteur 78
2. Sources d'Ionisation 79
2.1. ESI – Ionisation par électronébullisation 79
a. Généralités 79
b. Description de la source 80
c. Formation des ions 80

d. Avantages et inconvénients de la source ESI 84
2.2. APCI – Ionisation chimique à pression atmosphérique 84
a. Généralités 84
b. Description de la source 85
c. Formation des ions 86
d. Avantages et inconvénients de la source APCI 87
2.3. EI – Ionisation électronique 87
a. Généralités 87
b. Principe de fonctionnement 87
c. Description de la source 88
d. Avantages et inconvénients de la source EI 89
3. Analyseurs Quadripolaires 90
3.1. Généralités 90
a. Historique 90
b. Paramètres caractéristiques d'un analyseur 92
c. Les différents modes de balayage 93
3.2. Principe de fonctionnement des analyseurs quadripolaires 98
a. Filtre quadripolaire 98
b. Piège quadripolaire 3D 99
c. Piège quadripolaire 2D 101
3.3. Approche théorique du fonctionnement des analyseurs quadripolaires 103
a. Équations de Mathieu 103
b. Filtre de masse quadripolaire 104
c. Piège quadripolaire 3D 105
d. Piège quadripolaire 2D 109
4. Détecteurs 111
4.1. Dynode de conversion 111
4.2. Multiplicateur d'électrons 111
5. Spectromètres de Masse Utilisés 114
5.1. Filtres quadripolaires 114
a. MSD 5973 114
b. TSQ Quantum Ultra 114
5.2. Pièges quadripolaires 3D 115
a. LCQ Deca 115
b. LCQ Deca XP Max 115
5.3. Piège quadripolaire 2D 116
a. LTQ 116
6. Références 118

IV. Modélisation Moléculaire 123
1. Généralités 123
1.1. Présentation 123
1.2. Stratégie en fonction de la taille du système 124
1.3. Méthode de Monte-Carlo 124
2. Méthodes Semi-Empiriques 125
2.1. Généralités 125
2.2. AM1 – Austin Model 1 125
3. Méthodes de Chimie Quantique 127
3.1. Introduction 127
a. Historique 127
b. Équation de Schrödinger 127
3.2. Méthodes Hartree-Fock et post-Hartree-Fock 128
a. HF – Hartree-Fock 128
b. MP2 – Møller-Plesset d'ordre 2 129
3.3. DFT – Théorie de la Fonctionnelle de Densité 130
a. Présentation 130
b. Principe 130
c. Les différentes générations de fonctionnelles 131
3.4. Les bases d'orbitales atomiques 132
a. Présentation 132
b. Les bases 132

4. Références 134

Chapitre 3 - Harpagophytum (sur Publications) 135

I. Présentation 137
1. Introduction 137
2. Présentation du Chapitre 138
2.1. Préparation d'échantillon 138
2.2. Analyse par LC/MS 139
2.3. Approche théorique de la cationisation 139
2.4. Approche métabolique 140

II. Préparation d'Échantillon 141
1. Abstract 141
2. Introduction 142
3. Experimental 144
3.1. Chemicals 144
3.2. Solid-phase extraction 144
3.3. LC/MS^n conditions 144
3.4. Extraction procedure 146
a. Plasma 146
b. Urine 148
c. Solid-phase extraction 148
3.5. Extraction recoveries 148
a. Apparent extraction recoveries 148
b. Real extraction recoveries 148
4. Results and Discussion 150
4.1. Plasma 150
a. Comparison of SPE cartridges 150
b. Further optimization on the plasma extraction procedure with PPL BondElut cartridges 152
c. Selectivity and limits 153
d. Real extraction recoveries of the selected method 154
4.2. Urine 154
a. Comparison of SPE cartridges 154
b. Final optimization of the extraction procedure with AbsElut Nexus cartridges 158
c. Selectivity and limits 160
d. Real extraction recoveries of the selected methods 161
4.3. Application of the methods to post-administration samples 162
5. Conclusion 164
6. Literature Cited 165

III. Analyse par LC/MS 167
1. Abstract 167
2. Introduction 168
3. Experimental 170
3.1. Chemicals 170
3.2. Sample preparation 170
a. Extraction from plasma 170
b. Extraction from urine 170
3.3. Instrumentation 171
a. High-performance liquid chromatography (HPLC) 171
b. Mass spectrometry 171
3.4. Criteria in mass spectrometry 172
3.5. Limits of detection and quantitation 173
3.6. Equine samples 173
4. Results and Discussion 174
4.1. ESI-MS detection of HG, HS and 8PCHG 174
a. Full scan MS 174
b. Fragmentations of harpagide 175
c. Fragmentations of harpagoside 177
d. Fragmentations of 8PCHG 179
4.2. Effects of cation attachment with alkali salts 179

4.3. Comparison of mass spectrometers 181
a. LCQ Deca XP Max 182
b. TSQ Quantum Ultra 183
c. LTQ 183
d. Selectivity 184
4.4. Semi-quantitative approach of Harpagoside in post-administration samples 185
a. Quantitation in plasma 185
b. Quantitation in urine 185
c. Application to post-administration samples 186
5. Conclusions 188
6. References 189

IV. Approche Théorique de la Cationisation 191
1. Abstract 191
2. Introduction 192
3. Computational Methods 194
3.1. Semi-empirical calculations 194
3.2. DFT (Density Functional Theory) calculations 194
4. Results and Discussion 196
4.1. Geometry of the neutral form 196
4.2. Geometry of the protonated form 197
4.3. Geometry of the Na^+-cationized form 198
5. Method Validation 203
6. Determination of Proton and Cation Sodium Affinities 204
7. Microsolvation: Effect of a Methanol Molecule Complexation to Each Reagent and Product of Reaction *(1)* 206
8. Conclusion 209
9. References and Notes 210

V. Approche Métabolique 213
1. Bibliographie 213
2. In Vivo 215
2.1. Utilisation d'un triple quadripôle 215
a. Recherche d'ions précurseurs 215
b. Recherche de perte de neutres 216
2.2. Utilisation d'un piège quadripolaire 2D 217
3. In Vitro 218
a. Mode opératoire 218
b. Analyse 218
4. Références 219

VI. Conclusion 221

Chapitre 4 - Eleutherococcus 223

I. Présentation 225

II. Conditions Expérimentales 227
1. Préparation d'Échantillon 227
1.1. Extraction plasmatique 227
a. Préparation de l'échantillon 227
b. Extraction sur phase solide 227
1.2. Extraction urinaire 228
a. Préparation de l'échantillon 228
b. Extraction sur phase solide 228
1.3. Extraction dans les compléments alimentaires 228
a. Préparation de l'échantillon 228
b. Extraction par ASE 229
2. Couplage LC/MS 229
2.1. Conditions chromatographiques 229
2.2. Détection par spectrométrie de masse 229
3. Couplage GC/MS 231
3.1. Dérivation au TMS 231

3.2. Conditions chromatographiques 231
3.3. Détection par spectrométrie de masse 231

III. Résultats et Discussion 233
1. Fragmentations 233
1.1. Full scan MS 233
1.2. Fragmentations de l'éleuthéroside B 234
1.3. Fragmentations de l'éleuthéroside E 236
a. Mode ESI positif 236
b. Mode ESI négatif 236
2. Extraction 238
2.1. SPE dans les plasmas 238
a. Influence du pH 238
b. Rendement d'extraction 238
2.2. SPE dans les urines 239
a. Influence du pH 239
b. Influence du volume 240
c. Rendement d'extraction 241
d. Limites de détection et de quantification 242
2.3. ASE 242
a. Influence des paramètres d'extraction 242
b. Influence du facteur de dilution 243
c. Répétabilité 244
d. Quantification 244
3. Sélectivité 245
4. Application à des Échantillons Réels 246
4.1. Analyse dans les plasmas 246
4.2. Analyse dans les urines 246
4.3. Analyse dans les compléments alimentaires 247

IV. Approche Métabolique 249
1. Introduction 249
2. Formation des Aglycones 251
3. Analyse par GC/MS 252
3.1. Spectre de référence 252
3.2. Analyse des échantillons 252

V. Conclusion 255

VI. Références 257

Chapitre 5 - Conclusion Générale 259

I. Analyse d'Échantillons de Routine 261

II. Métabolisme 263

III. Compléments Alimentaires 265

IV. Perspectives 267

Annexes 269

Annexe I AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry 271
General Analytical Requirements 271
Chromatography 271
Low Resolution Mass Spectrometry 272
Reference materials 274

Annexe II 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians 277
1. Summary 277
2. Introduction 278
3. Material and Methods 280
3.1. Chemicals 280

3.2. Animal experiments 280
a. Harpagophytum 280
b. Eleutherosides 280
3.3. Analysis of post-race negative urine routine samples 280
3.4. Analytical methods 281
a. Urine sample preparation for HS, HG and 8PCHG 281
b. Urine sample preparation for EE 281
3.5. Instrumentation 281
a. LC/MS for HS, HG, 8PCHG and EE on LTQ 281
b. LC/MS for HS on LCQ Deca XP Max 282
4. Results 283
4.1. Harpagophytum study 283
a. Detection of HS, HG and 8PCHG in post-administration samples 284
b. Detection of HS in post-race samples tested negative 285
4.2. Application of the method to the detection of EE in urine samples. 285
a. Detection of EE in post-administration urine samples 285
b. Detection of EE in post-race routine urine samples 286
5. Conclusion 287
6. References 288

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

8PCHG	8-*para*-Coumaroyl Harpagide
AF	Acide formique
AGC	Auto Gain Control
AM1	Austin Model 1
ANRT	Association Nationale de la Recherche Technique
AORC	Association of Official Racing Chemists
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
API	Atmospheric Pressure Ionisation
ASE	Accelerated Solvent Extraction
B3LYP	Becke gradient-exchange correction and Lee-Yang-Paar correlation functional
CID	Collision-Induced Dissociation
CRM	Consecutive Reaction Monitoring
DC	Direct Currant
DCMR	Département de Chimie – Laboratoire des Mécanismes Réactionnels
DFT	Density Functional Theory
DVB/NP	divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone
E	Energie
EB	Eleuthéroside B
EE	Eleuthéroside E
EI	Electron Ionization
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	Electrospray Ionization
G	Enthalpie libre
GC	Gas Chromatography
Glc	Glucose
H	Enthalpie
Har	Harpagide (ou HG)
HF	High Flow
HG	Harpagide (ou Har)
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balanced copolymer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Harpagoside
LC	Liquid Chromatography
LCH	Laboratoire des Courses Hippiques
LCQ	Liquid Chromatography Quadrupolar ion trap
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LoD	Limit of Detection
LoQ	Limit of Quantitation
MCX	Mixed-mode Cation eXchange
LTQ	Linear Ion Trap Quadrupole
MS	Mass Spectrometry
MS^n	multi-step tandem Mass Spectrometry
m/z	Rapport masse sur charge
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OHL	Hydroxylidocaïne
PA	Proton Affinity
PBA	Phenylboronic Acid
pH	potentiel Hydrogène
PK/PD	Pharmacokinetic/Pharmacodynamic
PS-DVB	Poly(styrene-divinylbenzene)copolymer
RMS	Root Mean Square
RSD	Relative Standard Deviation
S	Entropie
SA	Sodium Affinity
S/N	Signal-to-Noise ratio
SPE	Solid-Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
TFA	Trifluoroacetic Acid
TSQ	Triple Stage Quadrupole
XDB	eXtra-Density Bonded
ZPVE	Zero Point Vibrational Energy

Chapitre 1 - INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. CONTRÔLE DE LA MÉDICATION

1. PRÉSENTATION DU LCH

1.1. Historique

Le laboratoire de contrôle de la médication dédié aux chevaux a d'abord été accueilli dans les locaux de la Faculté de Pharmacie de Paris jusqu'en 1974 où il s'installe à Châtenay-Malabry sous le nom de LAB (Laboratoire d'Analyses Biologiques). A cette époque, il est sous le contrôle de la Société d'Encouragement pour l'Amélioration des Races de Chevaux (entité de la future France Galop).

Son activité s'étend au contrôle de la médication effectué lors des courses de chevaux en France pour les deux spécialités pratiquées : le trot et le galop (plat et obstacles). En raison du caractère pluridisciplinaire des activités du laboratoire, la FNCF (Fédération Nationale des Courses Françaises) prend le Laboratoire sous sa responsabilité en 1990 : le LAB devient un service de la FNCF.

En 1993, le Ministère de la Jeunesse et des Sports donne également son agrément au laboratoire de la FNCF pour réaliser les contrôles à l'issue des manifestations sportives équestres effectuées sous sa responsabilité : concours complet, saut d'obstacles, voltige, dressage…

Depuis 1997, le laboratoire est accrédité COFRAC (Comité Français d'Accréditation).

En 2001, à l'issue d'un appel d'offre international, le LAB est choisi par la FEI (Fédération Équestre Internationale) comme Laboratoire Central pour une durée de 4 ans. Le LCH est reconduit en 2005 pour la même durée.

En octobre 2003, lors de son déménagement à Verrières le Buisson, le LAB devient le LCH (Laboratoire des Courses Hippiques) et il s'installe dans des locaux neufs, spécialement conçus pour son activité.

Le LCH change de statut en avril 2004 : de service de la FNCF il devient une entité individuelle à part entière, régie par la loi du 1er juillet 1901 sous le nom de *Association de gestion du Laboratoire des Courses Hippiques de la Fédération Nationale des Courses Françaises*. Les membres de cette association sont : France Galop, la SECF (Société d'Encouragement à l'élevage du Cheval Français) et la FNCF. L'assemblée générale du LCH est composée des trois membres précités, d'un représentant du Ministère de l'Agriculture et d'un Contrôleur d'État.[1]

1.2. Activités

L'activité principale du LCH est l'analyse des échantillons biologiques équins pour la recherche des substances prohibées par les Codes des Courses.[2-6] Dans ce cadre, le LCH analyse près de 30 000 prélèvements biologiques par an (environ 2/3 d'urine et 1/3 de sang).

L'essentiel des échantillons provient des Courses Françaises (trot et galop). Les autres prélèvements proviennent d'organisations sportives (françaises et étrangères) et de sociétés de courses étrangères (Portugal, Espagne, Belgique, Suisse, Maroc, Tunisie, Liban, Italie, Pays-Bas, Qatar, Inde…)

Le LCH est également en charge du contrôle de la médication des jockeys.

Le LCH procède à l'analyse d'aliments ou de compléments alimentaires pour chevaux afin de rechercher la présence d'éventuels *contaminants alimentaires*. Un contaminant alimentaire est une molécule qui est présente dans certaines plantes, naturellement ou par contamination du milieu environnant (phytoestrogène, dioxine, phytosanitaire…), mais qui est prohibée par les Codes des Courses en raison de ses propriétés pharmacoactives (caféine, morphine, atropine…)

Le LCH effectue également des analyses de contrôle de la médication sur des urines de chiens ou de camélidés.

Ponctuellement, le LCH collabore avec l'industrie pharmaceutique vétérinaire pour la détermination de paramètres pharmacologiques de médicaments spécifiquement destinés aux chevaux.

La section Recherche et Développement du LCH travaille à la fois sur la détection de nouvelles molécules actives (plantes thérapeutiques, hormones recombinantes…) et la détection de principes actifs dans d'autres milieux biologiques, comme les crins et les crottins, afin d'étendre les possibilités du contrôle de la médication.[1]

2. TRAITEMENTS THÉRAPEUTIQUES

2.1. Substances prohibées et substances interdites

Les substances prohibées

Une substance prohibée est une substance ayant au moins l'une des propriétés suivantes : substances susceptibles d'agir à tout moment sur un ou plusieurs des systèmes corporels des mammifères (système nerveux, cardio-vasculaire, système respiratoire, système digestif, système urinaire, système reproducteur, système musculo-squelettique, système hémolymphatique et la circulation sanguine, système immunitaire à l'exception des substances présentes dans les vaccins agréés pour la lutte contre les agents infectieux, système endocrinien), sécrétions endocrines et leurs homologues synthétiques, et les agents masquants.[2-3]

Les substances interdites

Une substance interdite est une substance appartenant à l'une des familles suivantes : stéroïdes anabolisants, substances agissant sur l'érythropoïèse, transporteurs d'oxygène synthétiques, ou toute substance ayant des propriétés analogues aux substances précitées. Ces substances ne doivent en aucun cas être utilisées sur un cheval.[2-3]

La prohibition et l'interdiction de ces substances reposent sur le principe selon lequel un cheval doit concourir avec ses propres atouts, sans que ceux-ci ne soient avantagés par l'usage de substances thérapeutiques. Lors de la reproduction, les chevaux sont sélectionnés sur leurs performances, et le fait de prohiber ou d'interdire ces substances permet aux propriétaires de sélectionner les chevaux d'après leurs caractéristiques génétiques. Cela permet également de préserver la santé des chevaux en leur évitant de concourir sous l'action d'un médicament qui masquerait une mauvaise forme, une boiterie ou une maladie.[7]

2.2. Les substances à seuil

Certaines substances appartenant à la liste des substances prohibées présentent un seuil de tolérance car elles sont soit endogènes, soit naturellement présentes dans l'alimentation du cheval. Il s'agit de l'acide salicylique, de la théobromine, de la méthoxytyramine, du diméthylsulfoxyde, du dioxyde de carbone, de l'arsenic, de l'hydrocortisone, de la testostérone, de la boldénone et de l'estranediol (uniquement chez les mâles à l'exception des hongres (mâles castrés) pour les deux dernières substances).[2-4]

2.3. Les médications

Les chevaux ont naturellement le droit de recevoir des soins. Il est donc possible de trouver des substances prohibées dans des fluides biologiques prélevés à l'entraînement. Dans ce cas, l'entraîneur doit être en mesure de justifier la présence de ces substances en présentant les ordonnances prescrites, qui doivent être tenues à jour dans un classeur et présentées au vétérinaire lors du contrôle.

Cependant, un cheval déclaré partant à une course ne peut en aucun cas être en cours de médication. Pour être en mesure de concourir, il doit avoir éliminé de son organisme toute trace d'une précédente prescription. Chaque principe actif possède son propre temps d'élimination qui peut varier selon qu'il est utilisé seul ou avec d'autres médicaments. L'entraîneur doit donc s'informer auprès de son vétérinaire pour savoir à partir de quel moment son cheval sera en mesure de concourir. Actuellement, les laboratoires de contrôle de la médication réalisent des expérimentations dans le but de déterminer les temps d'élimination des principes actifs couramment utilisés dans les traitements vétérinaires.[2-3,7]

Suite à une médication, un entraîneur qui a un doute de l'élimination totale des principes actifs peut faire une demande volontaire, appelée *analyse de dépistage*, afin de vérifier que son cheval est en mesure de concourir.[8] Dans ce cas, l'échantillon ne subit pas un *screening* complet, mais seuls les produits prescrits par le vétérinaire sont recherchés. De la même façon, il n'est pas rare qu'un propriétaire demande un *screening* complet avant d'acheter un cheval, afin de vérifier que ses bonnes performances ne seraient pas liées à l'utilisation de substances thérapeutiques ou interdites.

3. DÉROULEMENT D'UN CONTRÔLE DE LA MÉDICATION

Le déroulement du contrôle de la médication présenté dans cette partie est celui applicable aux chevaux dans le cadre des Courses Françaises (trot et galop).

3.1. Prélèvement de l'échantillon

Les conditions de prélèvement des échantillons biologiques sont mentionnées dans l'*Article 200* et détaillées dans l'*Annexe 5* du Code des Courses au Galop ainsi que dans l'*Article 77* et l'*Annexe 1* du Code des Courses au Trot.[2-4]

Les échantillons, généralement de l'urine et/ou du sang, sont prélevés par un vétérinaire agréé. Les prélèvements peuvent avoir lieu à l'entraînement ou à l'issue d'une course. Ils concernent les chevaux classés, et éventuellement, sur demande des Commissaires des Courses, quelques autres chevaux pris au hasard ou dont le comportement paraît anormal. Chaque prélèvement biologique est divisé en deux parties appelées *échantillon A* et *échantillon B*. Chaque échantillon est minutieusement collecté, étiqueté, scellé et envoyé au LCH, accompagné d'un volet du procès-verbal où sont mentionnés l'entité organisatrice de l'épreuve ou de la course, l'âge et le sexe du cheval. Le procès-verbal est signé par le vétérinaire ayant effectué les prélèvements ainsi que par la personne responsable du cheval. Le volet du procès-verbal portant l'identité du cheval est placé sous scellé et envoyé à la FNCF afin de garantir l'anonymat de l'analyse. La correspondance entre les différentes parties du procès-verbal est assurée par le numéro de prélèvement.

Lorsque l'échantillon parvient au laboratoire, il est simplement identifié par un code barre. À leur arrivée, les parties A et B sont séparées : la partie B est conservée scellée dans une chambre froide (congelée pour l'urine, réfrigérée pour le sang) alors que la partie A est préparée en vue d'être analysée.

3.2. Analyse de l'échantillon A

a. Screening

Un *screening* de routine au LCH est caractérisé par la recherche large spectre de différentes familles de molécules, souvent classées par activité thérapeutique :

Les anabolisants stéroïdiens

Les anabolisants stéroïdiens sont des molécules qui sont utilisées pour accroître la masse musculaire. Ces molécules sont généralement éliminées sous forme de glucuro- ou sulfoconjugués, ce qui nécessite un traitement de l'échantillon en vue d'obtenir la forme libre (hydrolyse enzymatique et solvolyse). Leur recherche dans les urines s'effectue en GC/MS

après une dérivation au TMS (triméthylsilyle). La boldénone ou le stanozolol sont deux représentants de la famille des anabolisants stéroïdiens.

Les AINS – Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

Les AINS, comme leur nom l'indique, sont des principes actifs qui permettent de lutter contre l'inflammation, en particulier au niveau des articulations. La phénylbutazone et la flunixine sont parmi les AINS les plus utilisés.

Les alcalins

La famille de molécules que l'on nomme *alcalins* tient son nom de l'époque où les extractions liquide-liquide étaient les plus utilisées dans le domaine du contrôle de la médication. En effet, il s'agit de molécules dont les propriétés physico-chimiques font qu'elles sont extraites à pH basique. Parmi ces molécules, on peut citer la caféine (stimulant), la lidocaïne (anesthésique local) ou encore des antihistaminiques comme la pyrilamine.

Les alcalins hydrolysés

Les alcalins hydrolysés correspondent généralement aux métabolites de phase I et II des alcalins. Ces molécules sont généralement plus polaires que les molécules mères, et sont liées à d'autres fonctions, d'où la nécessité de les hydrolyser pour en obtenir la forme libre. Les β-agonistes (clenbutérol, terbutaline, salbutamol…) sont extraits en même temps que les alcalins hydrolysés.

Les diurétiques

Les diurétiques (furosémide, hydrochlorothiazine…) sont des substances qui peuvent être utilisées dans le but de masquer l'administration d'un autre principe actif par dilution de l'urine.

Les composés détectés par tests ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Les tests ELISA utilisent le principe de reconnaissance de l'immunoaffinité. Ils sont principalement utilisés pour détecter des substances difficiles à déceler par d'autres méthodes. Le cas de l'EPO (érythropoïétine) en est une parfaite illustration. Ils sont utilisés pour la détection des corticostéroïdes, des benzodiazépines et des sédatifs.

L'échantillon qui parvient au laboratoire pour un contrôle de la médication sera analysé sur chacun des postes impartis à la détection des composés mentionnés ci-dessus afin de vérifier l'absence de toute trace de substance prohibée dans les fluides biologiques du cheval. Si toutes les analyses se révèlent négatives, ce qui se produit dans la majorité des cas, alors l'analyse de l'échantillon est terminée. En cas de doute sur la présence d'une

substance, des analyses complémentaires peuvent être effectuées : l'échantillon est à nouveau prélevé et analysé au poste concerné afin de lever l'incertitude. Si la présence d'une substance prohibée est détectée, alors une séquence de confirmation est réalisée.

b. Séquence de confirmation

Une séquence de confirmation est une analyse qui permet de montrer la présence d'une substance prohibée selon des critères d'identification (*Cf. Annexe I*). Cette séquence est composée d'un blanc réactif et de trois échantillons : un échantillon blanc, un échantillon blanc supplémenté, et l'échantillon suspect qui seront analysés dans l'ordre suivant :

- Échantillon blanc
- Échantillon suspect
- Blanc réactif (méthanol en LC/MS ou acétate d'éthyle en GC/MS)
- Échantillon blanc supplémenté

Cet ordre d'analyse est destiné à lever le doute quant à une éventuelle contamination de l'appareil.

3.3. Cas d'un échantillon suspecté de contenir une substance prohibée

a. Analyse de l'échantillon B

Dans le cas où l'échantillon A serait suspecté de contenir une substance prohibée, moins de 1 % des cas dans le cadre des Courses Françaises, la FNCF en informe l'organisme représentant les entraîneurs qui désigne un laboratoire pour effectuer l'analyse de la seconde partie du prélèvement (échantillon B). L'anonymat est levé dès que l'analyse de l'échantillon B est commencée, et l'entraîneur est alors informé des résultats de l'analyse de l'échantillon A. Les résultats de l'analyse de l'échantillon B sont transmis à la FNCF qui en informe les Commissaires afin qu'ils puissent engager les procédures prévues par les Codes des Courses.

b. Sanctions

Les sanctions applicables lorsque l'analyse des prélèvements biologiques révèle la présence de substances prohibées sont répertoriées dans l'*Article 201* du Code des Courses au Galop et dans l'*Article 78* du Code des Courses au Trot.[2-3]

Applicables au cheval

Si l'analyse du prélèvement biologique effectué chez le cheval fait apparaître la présence d'un stéroïde anabolisant, d'un facteur de croissance, d'une substance agissant sur l'érythropoïèse, d'un transporteur d'oxygène synthétique ou d'une substance ayant des

propriétés analogues à celles précitées, alors une enquête est ouverte. A l'issue de l'enquête les Commissaires doivent interdire au cheval de courir pour une durée allant de six mois à deux ans et si le prélèvement a été effectué lors d'une course, le cheval doit être distancé pour celle-ci.

Si l'analyse du prélèvement biologique révèle la présence d'une autre substance prohibée, alors une enquête est ouverte. A l'issue de l'enquête le cheval doit être distancé si le prélèvement a été effectué à l'occasion d'une course, et les Commissaires peuvent interdire au cheval de courir pour une durée maximale de trois mois.

Applicables à l'entraîneur

Si l'analyse du prélèvement biologique révèle la présence d'une substance prohibée, alors les Commissaires peuvent infliger une amende allant jusqu'à 15 000 € à l'entraîneur et lui suspendre ou lui retirer ses agréments.

4. RÉFÉRENCES

1. **Laboratoire des Courses Hippiques.**
   Manuel Qualité, Indice 8, **2005**.
2. **Société d'Encouragement à l'Élevage du Cheval Français.**
   Code des Courses au Trot. http://www.cheval-francais.com/sinforme/code/code2006.pdf, **2006**, 298 p.
3. **France Galop.**
   Code des Courses au Galop. http://www.france-galop.com/INSTITUT/docadmi/CO2006.pdf, **2006**, 177 p.
4. **France Galop.**
   Modifications au Code des Courses au Galop. http://www.france-galop.com/INSTITUT/docadmi/CODPLT06.pdf, **2006**, 13 p.
5. **Fédération Équestre Internationale.**
   Equine Anti-Doping and Medication Control Rules. 1st Edition, http://www.fei.ch/PDFS/FEI/05_01/EADMCR-2006.pdf, **2006**, 21 p.
6. **Fédération Équestre Internationale.**
   General Regulations. 21st Edition, http://www.fei.ch/PDFS/FEI/05_01/General%20Regulations_June_2006.pdf, **2006**, 61 p.
7. **Fédération Équestre Internationale.**
   The FEI Competitor Guide to Doping and Medication Control. http://www.fei.ch/PDFS/FEI/05_01/Competitor_Guide.pdf, **2006**, 2 p.
8. **Fédération Nationale des Courses Françaises.**
   Note aux Entraîneurs Relative au Contrôle de la Médication. http://www.france-galop.com/INSTITUT/docadmi/BTrainer.pdf, **2005**.

II. HARPAGOPHYTUM

1. LA PLANTE ET SON HABITAT

1.1. La plante

a. Classification botanique classique

Le *Tableau II-1* présente la classification botanique classique de l'*Harpagophytum* et de ses espèces *H. procumbens* (Burch.) DC (De Candolle) et *H. zeyheri* Decne.[1-4] Les deux espèces de l'*Harpagophytum* sont morphologiquement et anatomiquement très proches, ce qui les rend difficiles à distinguer.[5] L'espèce *H. procumbens* est divisée en deux sous-espèces (ssp. pour *sub-species*) : *H. procumbens* ssp. *procumbens* et *H. procumbens* ssp. *transvaalensis* alors que l'espèce H. zeyheri est divisée en trois sous-espèces : *H. zeyheri* spp. *zeyheri*, *H. zeyheri* spp. *schijffii*, et *H. zeyheri* spp. *sublobatum*.[4,6-7]

Tableau II-1 *Classification botanique classique de l'Harpagophytum.*[1]

Règne	*Plantae*
Sous-règne	*Tracheonbionta*
Division	*Magnoliophyta*
Classe	*Magnoliopsida*
Sous-classe	*Asteridae*
Ordre	*Lamiales*
Famille	*Pedaliaceae*
Genre	*Harpagophytum*
Espèces	*H. procumbens, H. zeyheri*

La *Figure II-1* est une planche botanique qui représente les différentes propriétés de l'*Harpagophytum procumbens* : la forme des feuilles, des fleurs, des fruits, la racine principale et les tubercules secondaires.

Figure II-1. *Planche botanique illustrant les propriétés de l'Harpagophytum procumbens.*

b. Autres appellations

L'*Harpagophytum* possède un grand nombre d'appellations, mais la plupart sont liées à la forme de ses fruits (*Figure II-2*). En France, on l'appelle *griffe du diable* ou *racine de Windhoek*, outre Manche on le nomme *devil's claw*, *grapple plant*, *wood spider* ou encore *Windhoek's root*, alors qu'outre Rhin les termes *Teufelskralle* (griffes du diable) ou *Trampelklette* sont utilisés pour le désigner.[8-9] L'appellation scientifique *Harpagophytum* (du grec *harpagos :* crochet, grappin et *phytos* : plante) y fait elle-même référence et le terme de *procumbens* (en latin) désigne une plante avec une tige rampante.

Figure II-2. *Fruit de l'Harpagophytum, qui lui vaut son surnom de griffe du diable. Ce fruit peut mesurer de 7 à 20 cm de longueur et jusqu'à 6 cm de diamètre.*[10]

c. Description

L'*Harpagophytum* est constitué d'une tige rampante qui porte des feuilles avec des limbes ovoïdes et des fleurs en trompette de couleur rouge violacé (*Figure II-3*) qui donneront des fruits.[6] Ces fruits lignifiés, en forme de crochets avec des aiguillons (*Figure II-2*), causent de nombreuses blessures aux animaux.[1] C'est le moyen qu'utilise la plante pour assurer sa dissémination : lorsque les animaux s'accrochent dans ses fruits, ils se débattent pour se libérer des crochets et répandent ainsi les graines sur le sol. Le fruit de l'*Harpagophytum* peut contenir jusqu'à 48 graines de forme allongée, de couleur noirâtre et d'une longueur de 7 à 8 mm.[2] La germination a lieu à la saison des pluies, entre novembre et mars. Pendant cette période, la plante développe sa racine principale qui peut descendre

jusqu'à 2 m de profondeur et, afin de résister au climat aride, elle développe un réseau tuberculinique de racines secondaires qui lui sert de réserve d'eau à la saison sèche. Ce réseau est la partie de la plante qui est utilisée en phytothérapie.[11-14] La récolte de la plante a lieu entre les mois de juin et août, elle peut se dérouler tous les 18 mois pendant 4 ans (il s'agit d'une herbe pérenne).[15] Lors de la récolte des tubercules, il faut veiller à ne pas endommager la racine principale (*Figure II-3*). Il est cependant fréquent qu'elle soit récoltée pour augmenter le rendement, ce qui provoque inexorablement la mort de la plante. Il en est de même si les trous creusés ne sont pas rebouchés après la récolte des tubercules.[15] Les racines sont lavées, coupées en rondelles et séchées rapidement en raison de leur forte teneur en eau.[6] Les conditions de séchage sont primordiales pour préserver les principes actifs.[16] Une structure radiale marquant les étapes de la croissance de la racine apparaît à la fin du séchage.[11]

Figure II-3. *Harpagophytum procumbens avec, à gauche les feuilles ovoïdes et les fleurs violacées de la plante et à droite la racine principale et les tubercules qui sont récoltés en creusant un trou d'environ 1,50 m de profondeur au pied de la plante.*

1.2. L'habitat

L'*Harpagophytum* est une herbe native d'Afrique du Sud qui pousse dans les étendues de sable sec du désert du Kalahari et dans les steppes de Namibie entre 1100 et 1800 m d'altitude.[3-4,15,17] Les deux espèces d'*Harpagophytum* ne poussent pas aux mêmes endroits géographiques (*Cf. Figure II-4*). *H. procumbens* se trouve en Namibie (à l'est et au centre), au Botswana et en Afrique du Sud (au nord de la province de Cape) alors que

H. zeyheri se rencontre en Angola, au nord de la Namibie, en Afrique du Sud et le long de la frontière entre le Botswana et le Zimbabwe.[2-3]

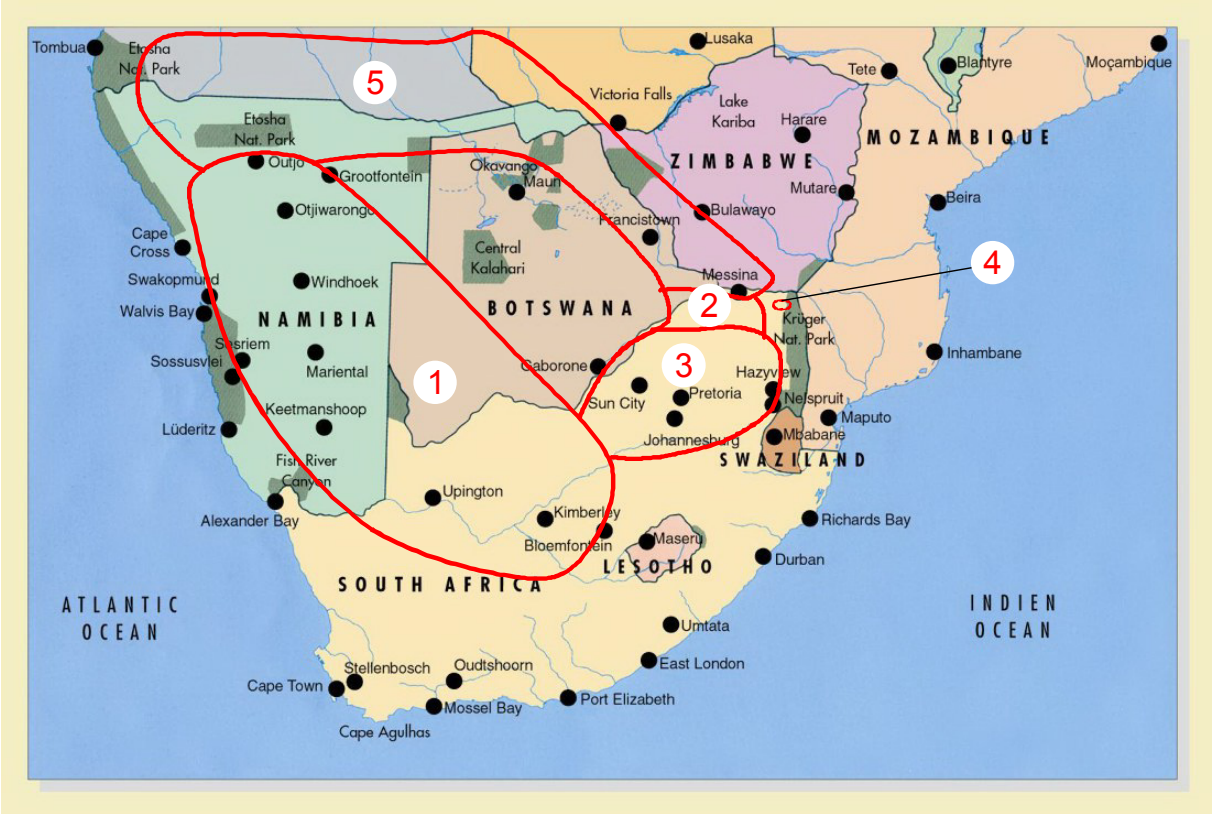


Figure II-4. *Distribution de Harpagophytum procumbens et Harpagophytum zeyheri en fonction de leurs espèces : (1) H. procumbens ssp. procumbens, (2) H. procumbens ssp. transvaalensis, (3) H. zeyheri ssp. zeyheri, (4) H. zeyheri ssp. schijffii et (5) H. zeyheri ssp. sublobatum.*[7,18]

2. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

2.1. Principes actifs

La racine d'*Harpagophytum* séchée est constituée de nombreux composés dont des sucres (stachyose et oses simples), des hydrocarbures, des cires et des acides gras, des phytostérols libres et hétérosidiques (dont le *β*-sitostérol), des acides et des esters triterpéniques (ursoliques, oléanoliques) ; des acides aromatiques (cinnamique, chlorogénique) ; des flavonoïdes (kaempférol, kaempféride, fisétine, lutéoline) ; des quinones (harpagoquinone). Mais surtout des molécules supposées être les principes actifs, et responsables de l'amertume[13] de l'*Harpagophytum* : les iridoïdes glycosides dont l'harpagoside (HS), le 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG), l'harpagide (HG) et le procumbide sont les principaux représentants.[6,14,19-24]

Pendant longtemps, seules les racines secondaires broyées et séchées de l'*Harpagophytum procumbens* étaient reconnues par les différentes pharmacopées. Elles portent alors le nom de *Harpagophiti radix*.[2-3,13-14] Depuis le 1er janvier 2003 la pharmacopée européenne accepte également que *H. zeyheri* soit utilisée et incluse dans cette dénomination.[4,25] Les racines sèches d'*Harpagophytum procumbens* renferment en moyenne 2 % de HS (entre 0,7 et 3 %) et 0,06 % de 8PCHG (entre 0,03 et 0,13 %).[15-16,26] Les pharmacopées suisse et européenne exigent qu'il y ait au minimum 1,2 % de HS dans les préparations commerciales.[2,15,27-28] Des comparaisons effectuées sur des produits thérapeutiques ont montré que la quantité de principe actif peut être très variable d'une préparation à l'autre.[8,29] Ceci est lié au fait qu'il est difficile de différencier les racines des deux espèces d'*Harpagophytum*, chacune ayant sa propre teneur en HS, qui peut varier en fonction des conditions de récolte.[16,26,30] De plus, lors des différentes transactions commerciales, les racines sont fréquemment mélangées avant de parvenir à l'acheteur.[4,7]

Différentes méthodes ont été développées pour contrôler l'identité et la pureté des lots. La première est basée sur le fait que le 8PCHG est un constituant principalement présent dans *H. zeyheri*.[31] Le rapport HS/8PCHG est calculé. Il est inférieur à 1 dans le cas de *H. zeyheri*, compris entre 20 et 38 dans le cas de *H. procumbens* et intermédiaire s'ils sont mélangés.[3] Une alternative consiste à calculer le rapport HS/(HS+8PCHG). Ce rapport est inférieur à 10 dans le cas de *H. procumbens* et supérieur à 31 dans le cas de *H. zeyheri*.[26,32] Une méthode plus récente, basée sur la découverte de la présence de 6-acétylacétoside uniquement dans *H. procumbens* peut être utilisée pour différencier les racines, mais elle ne permet pas de déceler les mélanges.[32-33]

2.2. Action pharmacologique

L'*Harpagophytum* est utilisé depuis des siècles par les Africains pour soigner la malaria, les indigestions, le cancer de la peau, la fièvre, les allergies, les rhumatismes, l'arthrite et bien d'autres maux.[2,4,17] En Europe, où son utilisation est plus récente (de l'ordre d'un demi-siècle), l'*Harpagophytum* y est employé pour soulager le diabète, les allergies, les effets de la sénescence, stimuler l'appétit et aider à la digestion, mais son activité principale est dans le traitement de l'ostéoarthrite et le soulagement des douleurs chroniques.[2,14] L'*Harpagophytum* est disponible sous différentes formes thérapeutiques : infusion, onguent, drogue pulvérisée ou encore capsules de nébulisat.[34]

Les vertus analgésiques et anti-inflammatoires de la plante lors de maladies rhumatismales dégénératives ont fait l'objet de nombreuses études tant sur les animaux que sur les hommes pour confirmer ces propriétés.[14,19,35-39] Un grand nombre d'entre elles ont été menées sur des patients qui souffrent de douleurs lombaires chroniques,[38-43] ou d'ostéoarthrite, une maladie douloureuse liée à une inflammation des articulations.[3,20,32,37-38,44-46] Au terme de ces études, les patients soignés avec de l'*Harpagophytum* ont besoin, comparativement à des traitements classiques, de moins d'AINS, ces derniers présentant une certaine toxicité et des effets secondaires sur le long terme.[47] Au cours des différentes études menées sur l'*Harpagophytum*, seuls quelques patients se sont plaints de douleurs digestives, mais aucun autre effet secondaire, ni aucune toxicité n'ont été rapportés.[32,41,47]

2.3. Mode d'action

Le mode d'action de l'*Harpagophytum* est encore mal connu : la plupart des anti-inflammatoires non stéroïdiens agissent par inhibition de la synthèse des prostaglandines, mais il semble que l'*Harpagophytum* n'agisse pas uniquement de cette façon.[2] Contrairement aux inhibiteurs synthétiques de la cyclooxygénase-2 (COX-2), l'harpagoside influence également la formation de leucotriènes (médiateurs de l'inflammation et de réactions allergiques) et la libération du facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα).[19,48-49] La *Figure II-5* représente les effets connus de l'*Harpagophytum* dans le cycle de l'acide arachidonique sur lequel l'harpagoside intervient de façon dose-dépendante.[50-51] Les effets ne sont pas uniquement dus à l'harpagoside, car l'activité des racines ou des extraits de racines est supérieure à celle de l'harpagoside seul.[12,35,51] Certaines études montrent même que HS ou HG seuls n'ont pas d'effet thérapeutique.[48]

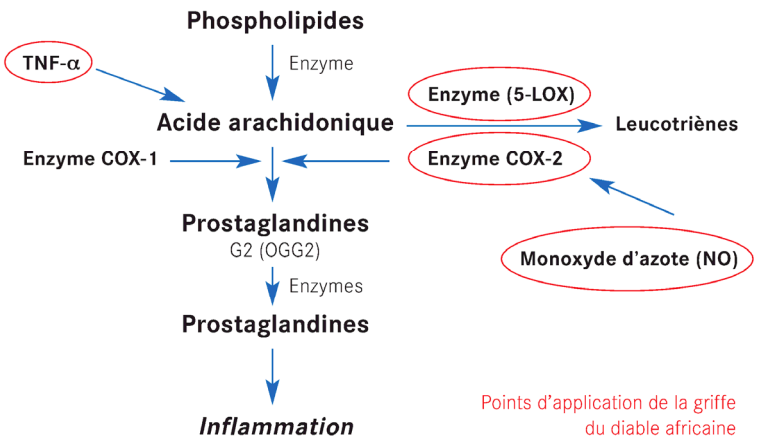


Figure II-5. *Effets connus de l'Harpagophytum sur le cycle arachidonique.*[50]
COX : cyclooxygénase – LOX : lipoxygénase – NO : voie du monoxyde d'azote qui intervient dans les processus infectieux, notamment avec la COX-2.

3. RÉFÉRENCES

1. **Wikipédia.**
Harpagophytum. http://fr.wikipedia.org/wiki/Harpagophytum.

2. **Smith M., Goliath J., Jefthas E., Langenhoven P., Letchamo W., Simon J.**
Devil's claw. Agribusiness in Sustainable Natural African Plant Products (ASNAPP-DCFS), **2001**. http://www.asnapp.org/library/devilsclaw.pdf.

3. **Baghdikian B., Lanhers M.C., Fleurentin J., Ollivier E., Maillard C., Balansard G., Mortier F.**
An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*. *Planta Medica*, **1997**, 63(2), pp. 171-176.

4. **Kathe W., Barsch F., Honnef S., Walter S.**
Trade in Devil's Claw (Harpagophytum procumbens) in Germany – Status, Trends and Certification, Final draft. Devil's claw report prepared for the Food and Agriculture Organisation of the United Nations Non-Wood Forest Products Programme, **2003**, 40 p.

5. **Czygan F.C., Krüger A.**
Pharmazeutisch-biologische untersuchungen der gattung *Harpagophytum*. *Planta Medica*, **1977**, 31, pp. 305-307.

6. **Haag-Berrurier M., Kuballa B., Aanton R.**
Dosage des glucoiridoïdes totaux dans la racine d'*Harpagophytum procumbens* DC. *Plantes médicinales et phytothérapie*, **1978**, 12(3), pp. 197-206.

7. **Stewart K.M., Cole D.**
The commercial harvest of devil's claw (*Harpagophytum* spp.) in southern Africa: the devil's in the details. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 100(3), pp. 225-236.

8. **Mestdagh O., Torck M.**
Étude de la qualité de gélules d'Harpagophyton. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **1995**, 53(3), pp. 135-137.

9. **Ragusa S., Circosta C., Galati E.M., Tumino G.**
A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* DC – I. Scanning electron microscope observations. *Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, 11(3), pp. 245-257.

10. **Kemper K.J.**
Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) http://www.mcp.edu/herbal/default.htm.

11. **Schneider E.**
Sustainable use in semi-wild populations of *Harpagophytum procumbens* in Namibia. *Medicinal Plant Conservation*, **1997**, 4, pp. 7-9.

12. **Circosta C., Occhiuto F., Ragusa S., Trovato A., Tumino G., Briguglio F., De Pasquale A.**
A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* DC – II. Cardiovascular activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, 11(3), pp. 259-274.

13. **Poukens-Renwart P., Tits M., Angenot L.**
Quantitative densitometric evaluation of harpagoside in the secondary roots of *Harpagophytum procumbens* DC. *Journal of Planar Chromatography*, **1996**, 9, pp. 199-202.

14. **European Scientific Council on Phytotherapy.**
Harpagophiti radix – Devil's claw root (2nd edn). Thieme, New York, E/S/C/O/P Monographs, **2003**, pp 233-240.

15. **Wegener T.**
Devil's claw – From African traditional remedy to modern analgesic and antiinflammatory. *Herbal Gram*, **2000**, 50, pp. 47-54.

16. **Joubert E., Manley M., Gray B.R., Schulz H.**
Rapid measurement and evaluation of the effect of drying conditions on Harpagoside content in *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53(9), pp. 3493-3502.

17. **Watt J.M., Breyer-Brandwijk M.G.**
The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 2nd Ed. E&S Livingstone Ltd., London, United Kingdom, **1962**, 830 p.

18. **Wegener T.**
Zur klinischen Wirksamkeit der südafrikanischen Teufelskrallenwurzel (Harpagophiti radix) bei Patienten mit Cox- und Gonarthrose – Ergebnisse und Bewertung einer klinischen Studie der Phase IV. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Universität Osnabrück, **2005**, 108 p.

19. **Pharmeuropa.**
General information: Devil's claw root (1095). *Pharmeuropa*, **2002**, 14(3), pp. 426.

20. **Andersen M.L., Santos E.H.R., Seabra M.L.V., Da Silva A.A.B., Tulfik S.**
Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvent-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology,* **2004**, 91(2-3), pp. 325-330.

21. **Van Haelen M.**
La biochimie et l'activité de Harpagophytum procumbens et de Glycyrrhiza glabra. Toxicité de Symphytum consolida. Journal de Pharmacie de Belgique. **1986**, 41, pp. 172-182.

22. **Bruneton J.**
Iridoïdes. In *Pharmacognosie – Phytochimie – Plantes médicinales*. 2nde Ed., Tec & Doc Lavoisier, **1997**, pp. 475-492.

23. **Qi J., Chen J.J., Cheng Z.H., Zhou J.H., Yu B.Y., Qiu S.X.**
Iridoid glycosides from Harpagophytum procumbens DC (devil's claw). Phytochemistry, **2006**, 67(13), pp. 1372-1377.

24. **Clarkson C., Stærk D., Hansen S.H., Smith P.J., Jaroszewski J.W.**
Discovering new natural products directly from crude extracts by HPLC-SPE-NMR: chinane diterpenes in *Harpagophytum procumbens*. *Journal of Natural Products*, **2006**, 69(4), pp. 527-530.

25. **Clarkson C., Stærk D., Hansen S.H., Smith P.J., Jaroszewski J.W.**
Identification of major and minor constituents of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) using HPLC-SPE-NMR and HPLC-ESIMS/APCIMS. *Journal of Natural Products*, **2006**, 69(9), pp. 1280-1288.

26. **Eich J., Schmidt M., Betti G.**
HPLC analysis of iridoid compounds of *Harpagophytum taxa* – Quality control of pharmaceutical drug material. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, **1998**, 8(2), pp. 75-78.

27. **Pharmacopoeia Helvetica.**
Pharmacopoeia Helvetica, Editio VII, **1991**.

28. **European Pharmacopoeia.**
European Pharmacopoeia, 3rd Edn, Suppl. 2000. Council of Europe, Strasbourg, France, **1999**.

29. **Guillerault L., Ollivier E., Elias R., Balansard G.**
Determination of harpagide, 8-*para*-coumaroyl harpagide, and harpagoside by high performance liquid chromatography in *Harpagophytum procumbens* drugs and in commercial extract. *Journal of Liquid Chromatography*, **1994**, 17(13), pp. 2951-2960.

30. **Levieille G., Wilson G., Robin J.R., Cambornac M.**
In vitro micropropagation of fertile plants of *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri* (devil's claw). *Medicinal Plant Conservation*, **2000**, 6, pp. 10-11.

31. **Kikuchi T., Matsuda S., Kubo Y., Namba T.**
New iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* DC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1983**, 31(7), pp. 2296-2301.

32. **Chrubasik S.**
Addendum to the ESCOP monograph on *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine*, **2004**, 11(7-8), pp. 691-695.

33. **Munkowmbwe N.M.**
Acetylated phenolic glycosides from *Harpagophytum procumbens*. *Phytochemistry*, **2003**, 62, pp. 1231-1234.

34. **Pourrat H., Texier O., Vennat B. Pourrat A., Gaillard J.**
Étude de la stabilité des iridoïdes d'*Harpagophytum procumbens* DC au cours de la préparation de poudres d'atomisats. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **1985**, 43(6), pp. 601-606.

35. **Lanhers M.C., Fleurentin J., Mortier F., Vinche A., Younos C.**
Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Medica*, **1992**, 58, pp. 117-123.

36. **Loew D., Möllerfeld J., Schrödter A., Puttkammer S., Kaszkin M.**
Investigations on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **2001**, 69(5), pp. 356-364.

37. **Chrubasik S.**
Osteoarthritis: pharmacology and clinical indications of selected botanicals. *The Pain Clinic*, **2004**, 16(1), pp. 1-16.

38. **Chrubasik S., Conradt C., Black A.**
The quality of clinical trials with *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine*, **2003**, 10(6-7), pp. 613-623.

39. **Gagnier J.J., Chrubasik S., Manheimer E.**
Harpagophytum procumbens for ostheoarthitis and low back pain: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2004**, 4:13.

40. **Chrubasik S., Thanner J., Künzel O., Conradt C., Black A., Pollak S.**
Comparison of outcome measures during treatment with the proprietary *Harpagophytum* extract Doloteffin® in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine*, **2002**, 9(3), pp. 181-194.

41. **Chrubasik S., Künzel O., Thanner J., Conradt C., Black A.**
A 1-year follow-up after a pilot study with Doloteffin® for low back pain. *Phytomedicine*, **2005**, 12(1-2), pp. 1-9.

42. **Chrubasik S., Junck H., Breitschwerdt H., Conradt C., Zappe H.**
Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *European Journal of Anaesthesiology*, **1999**, 16(2), pp. 118-129.

43. **Wegener T., Lüpke N.P.**
Treatment of patients with arthrosis of hip and knee with an aqueous extract of devil's claw (*Harpagophytum procumbens* DC.). *Phytotherapy Research*, **2003**, 17(10), pp. 1165-1172.

44. **Leblan D., Chantre P., Fournié B.**
Harpagophytum procumbens in the treatment of knee and hip ostheorthritis. Four-month results of a prospective, multicenter, double-blind trial versus diacerhein. *Joint Bone Spirit*, **2000**, 67(5), pp. 462-467.

45. **Setty A.R., Sigal L.H.**
Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **2005**, 34(6), pp. 773-784.

46. **Caprasse M.**
Description, identification and therapeutical uses of the devil's claw: *Harpagophytum procumbens* DC. *Journal de Pharmacie de Belgique*, **1980**, 35, pp. 143-149.

47. **Chantre P., Cappelaere A., Leblan D., Guedon D., Vandermander J., Fournie B.**
Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, **2000**, 7(3), pp. 177-183.

48. **Fiebich B.L., Heinrich M., Hiller K.O. Kammerer N.**
Inhibition of TNF-α synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract SteiHap 69. *Phytomedicine*, **2001**, 8(1), pp. 28-30.

49. **Catelan S.C., Belantani R.M., Marques L.C., Silva E.R., Silva M.A., Caparroz-Assef S.M., Cuman R.K.N., Bersani-Amado C.A.**
The role of adrenal corticosteroids in the anti-inflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats. *Phytomedicine*, 2006, 13(6), pp. 446-451.

50. **Lenherr A.**
La griffe du diable en tant que médecine douce dans le traitement des douleurs. www.berg-apotheke.ch.

51. **Kaszkin M., Beck K.F., Koch E., Erdelmeier C., Kusch S., Pfeilschifter J., Loew D.**
Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside-dependent and independent effects. *Phytomedicine*, **2004**, 11(7-8), pp. 585-595.

III. ELEUTHEROCOCCUS

1. LA PLANTE ET SON HABITAT

1.1. La plante

a. Classification botanique classique

Le *Tableau III-1* présente la classification botanique classique de l'*Eleutherococcus* et de son espèce *senticosus* en particulier.[1] Il existe selon certaines autorités 15 espèces d'*Eleutherococcus*, toutes originaires de l'est de l'Asie entre l'Himalaya et le Japon, mais le New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening en recense environ 30.[2]

Tableau III-1. *Classification botanique classique de Eleutherococcus senticosus.*[1]

Règne	*Plantae*
Sous-règne	*Tracheonbionta*
Division	*Magnoliophyta*
Classe	*Magnoliopsida*
Sous-classe	*Rosidae*
Ordre	*Apiales*
Famille	*Araliaceae*
Genre	*Eleutherococcus*
Espèces	*Environ 30 espèces dont E. senticosus*

La *Figure III-1* est une planche botanique qui représente les différentes propriétés de l'*Eleutherococcus senticosus*. Le terme d'*Eleutherococcus* (du grec *eleutheros* : libre et *kokkos* : graine, pépin) désigne les fruits de la plante, alors que le terme de *senticosus* (du latin : plein d'épines) caractérise la tige (*Figure III-2*).

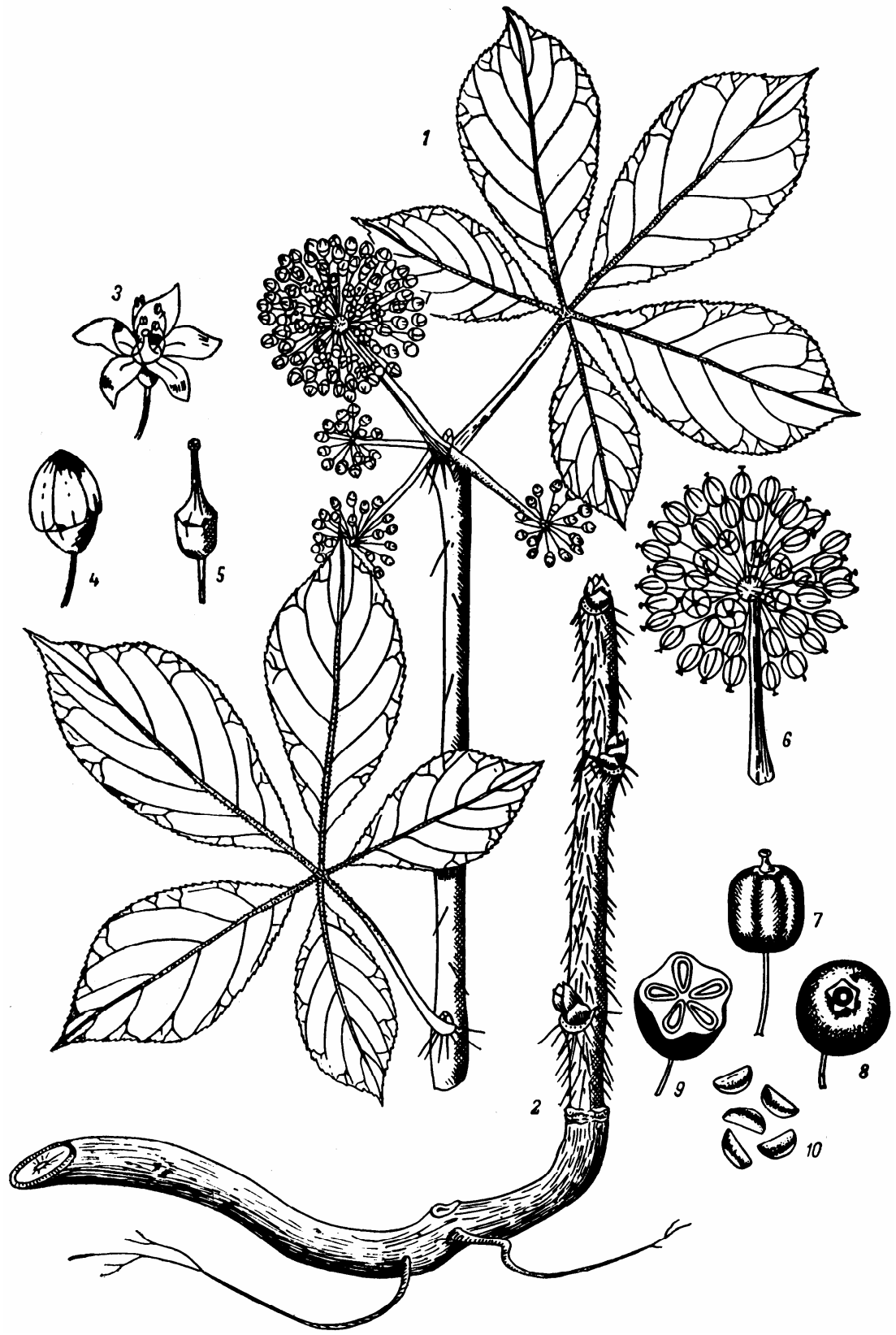


Figure III-1. *Planche botanique illustrant les propriétés de l'Eleutherococcus senticosus.*[2-3] *(1) branche en fleur, (2) portion de racine surmontée d'une jeune pousse et de bourgeons, (3) fleur éclose, (4) bourgeon de fleur, (5) pistil, (6) inflorescence, (7), (8) et (9) vues latérale, de dessus, et en coupe du fruit, (10) graines.*

b. Autres appellations

L'*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. de son vrai nom possède un grand nombre d'appellations.[4] L'appellation *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms, bien que non reconnue officiellement, est considérée comme synonyme.[5] Elle date de la période où Ruprecht et Maximowicz du Jardin Botanique Impérial de Saint-Pétersbourg ont décrit la plante alors que le genre *Eleutherococcus* n'existait pas encore.[2,6]

Le genre *Eleutherococcus* possède quelques appellations génériques qui sont souvent utilisées par abus de langage pour désigner l'espèce *senticosus* comme les termes *Eleuthero* en appellation scientifique, *éleuthérocoque* en français ou *eleutherokokk* en russe.[1-2] En revanche, le terme d'*Eleutherococci radix* désigne les racines et les rhizomes séchés de la plante *E. senticosus* qui sont utilisés en phytothérapie (*Figure III-2*).[7-9]

Figure III-2. *Eleutherococcus senticosus avec, à gauche une photographie d'un tronc et de ses épines et à droite les racines utilisées en phytothérapie sous l'appellation Eleutherococci radix.*

Le nom de *ginseng de Sibérie* (ou *Siberian ginseng*) est couramment utilisé, à tort, pour désigner *E. senticosus*. Ces plantes n'ont rien en commun : ni la composition chimique, ni même l'activité thérapeutique.[1,2] Ce terme est issu de la période où la plante *Panax ginseng* commençait à se raréfier et que les premières racines de *E. senticosus* ont été exportées de Sibérie, dans le but de se substituer au ginseng.

E. senticosus a reçu un grand nombre de noms imagés de la part des Soviétiques qui ont beaucoup travaillé sur cette plante durant la seconde moitié du XXème siècle. La plupart de ces noms sont liés à l'aspect épineux de la plante : *eleutherokokk koljuchii* (éleuthérocoque épineux), *nedotroya* (intouchable), *dyavol'skii kust* (buisson du diable), *dikii perets* (poivre large), *svobodnojagodnik koljuchii* (porteur épineux de baies libres) ou encore *tajozhnyi koren* (racines de la taïga).[2] Ce dernier est également repris par les Allemands : *Taigawurzel*, qui utilisent également le terme *Teufelskrallenwurzel* (racine de la griffe du diable, à ne pas confondre avec *Teufelskrallen* qui désigne l'*Harpagophytum*).[2] Les Anglais ont préféré le terme de *devil's shrub* (buisson du diable).[1,8]

c. Description

L'*Eleutherococcus senticosus* est un arbuste épineux qui mesure couramment 2 m de hauteur et qui peut atteindre jusqu'à 7 m.[1-2,8-10] Il est composé d'une multitude de tiges, qui ne possèdent généralement pas de branches. Les jeunes tiges sont densément recouvertes d'épines flexibles, alors que les plus vieilles peuvent en être dépourvues. Ses feuilles sont composées de trois à cinq pétales de forme elliptique, finement dentelées et qui peuvent mesurer jusqu'à 12 cm. Les fleurs de *E. senticosus* forment une inflorescence finie (ensemble de fleurs disposées au sommet d'une tige) de petites fleurs blanches composées de cinq pétales. Chaque fleur donne ensuite naissance à une drupe (fruit charnu à noyau) de couleur bleu-nuit qui renferme une graine (*Cf. Figure III-3*).[2]

Figure III-3. *Eleutherococcus senticosus avec, à gauche les feuilles et les fleurs et à droite les fruits.*

La propagation de l'*Eleutherococcus senticosus* est difficile. En effet, 18 mois sont nécessaires pour que les embryons contenus dans les graines du fruit parviennent à maturité (*somatic embryo*), et il faut 18 autres mois pour rompre cette phase de dormance

avant que la germination ne débute.[9,11] La propagation vers le sud de *E. senticosus* est limitée géographiquement à 40° de latitude Nord car une chaleur trop importante endommage les graines et les empêche de germer.[5] La technique du bouturage n'est pas adaptée aux *Eleutherococcus* et des méthodes de germination *in vitro* sont en cours de développement.[8] Dans un avenir proche ces méthodes pourraient également servir de sources en éleuthérosides B et E, les principes actifs de *E. senticosus*.[5,9,11-16]

1.2. L'habitat

Les plantes du genre *Eleutherococcus* sont localisées en Extrême-Orient : au sud-est de la Sibérie, en Chine, et du Japon aux Philippines.[1] Cependant, l'espèce *senticosus* ne se trouve que dans l'extrême est de la Russie (dans les provinces du bord de l'Amur, le Krai de Primorsk (la *Province Maritime*) et l'île de Sakhalin), le nord du Japon et le nord-est de la Chine (*Cf. Figure III-4*).[2,9]

Figure III-4. *Distribution géographique de l'Eleutherococcus senticosus.*

2. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

2.1. Principes actifs

a. Composition de E. senticosus.

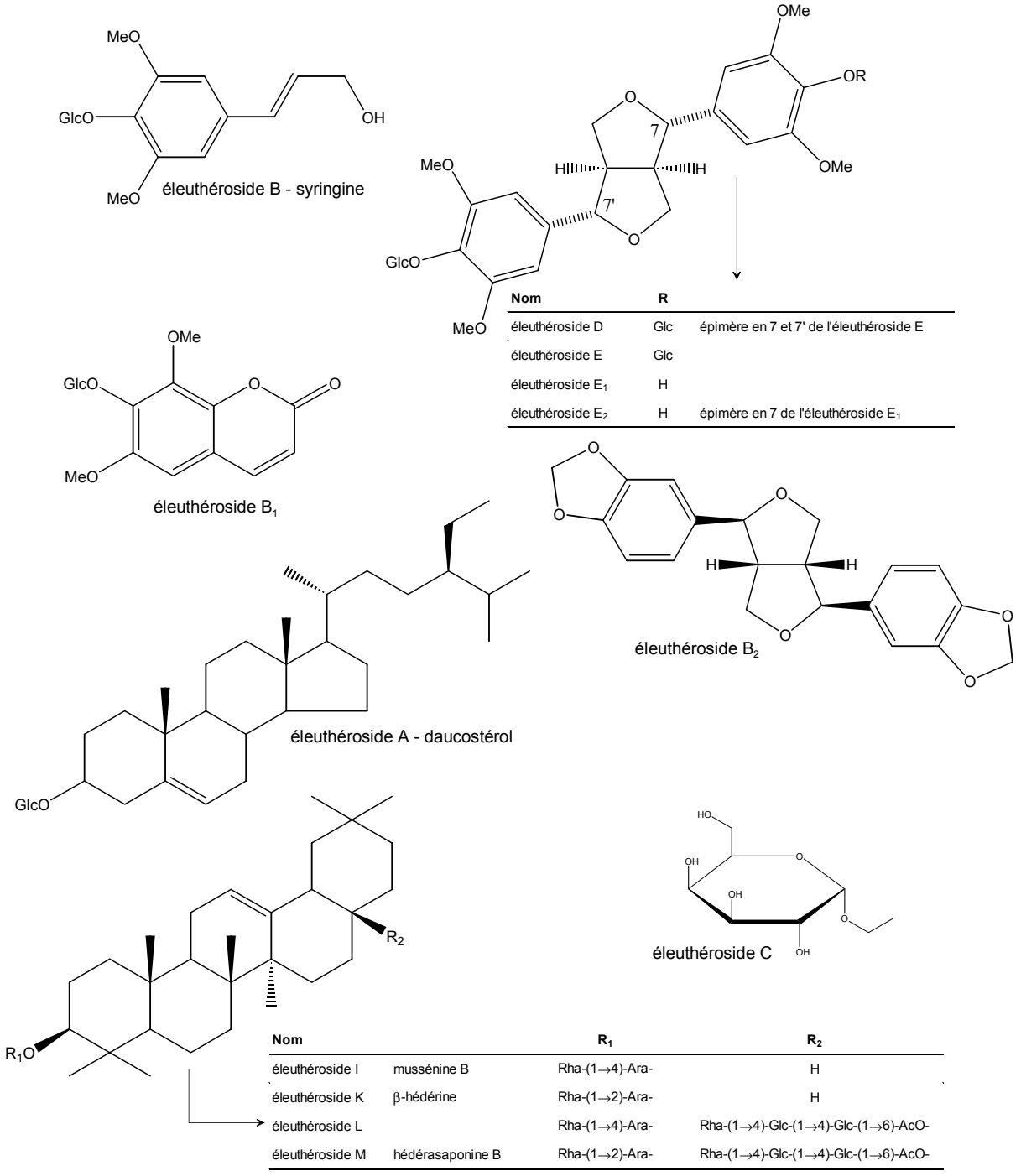
Ce sont les racines et les rhizomes qui constituent les parties de *E. senticosus* utilisées en phytothérapie pour leurs propriétés pharmacologiques. Il a été montré que les feuilles contiennent également des principes actifs.[2,5] De nombreuses substances ont été identifiées parmi lesquelles des phénylpropanoïdes (syringine, acide caféique, alcool sinapylique, aldéhyde conyféryle), des lignans (sésamine, syringarésinol et glycosides), des saponines (daucostérol, *β*-sitostérol, hédérasaponine B), des coumarines (isofraxidine et glycosides), de l'acide bétulinique, des triterpènes, des vitamines et des pro-vitamines (*β*-carotène).[3,6,8,17-18]

b. Les éleuthérosides

Parmi les composés qui viennent d'être cités, certains possèdent également un nom trivial du type *éleuthéroside* suivi d'une lettre. Le terme *éleuthérosides* regroupe des substances de structures et de propriétés physico-chimiques très variées contrairement aux ginsénosides.[2,6] Historiquement, ces appellations furent données aux sept premières substances (de A à G) isolées des *Eleutherococcus* et qui n'étaient pas encore connues.[10,19] La *Figure III-5* représente quelques-uns des 17 éleuthérosides que l'on connaît aujourd'hui. Dans un souci de clarté, Wagner a tenté de classer les éleuthérosides en deux classes. D'un côté les saponines triterpénoïdes avec les glycosides de l'acide oléanolique (éleuthérosides I, K, L et M), de l'autre côté les dérivés du phénylpropane, dont la plupart sont des glucosides (éleuthérosides B, B_1, B_2, D, E, E_1, E_2).[2,20-21]

Les éleuthérosides D et E appartiennent à la famille des *lignans*.[22] Ce terme permet de désigner les molécules optiquement actives issues de la dimérisation de deux phénylpropanes (l'éleuthéroside B). Si la molécule n'est pas optiquement active, on parle de néolignan. La plante produit des lignans dans le but de se protéger des radicaux libres.[2,23-24] Les éleuthérosides peuvent représenter jusqu'à 2 % du poids sec de la racine.[10] Les éleuthérosides B et E sont les marqueurs de *E. senticosus* dont ils représentent environ 80 % des éleuthérosides.[25-27] Quantitativement, l'éleuthéroside B est présent à hauteur de 1,2 mg/g dans la tige et 0,4 mg/g dans les racines ; l'éleuthéroside E est à hauteur de 0,8 mg/g dans la tige et 0,6 mg/g dans les racines.[27] Dans l'organisme les éleuthérosides B et E sont accumulés dans le foie, les reins, la rate et le cœur (par ordre d'accumulation décroissante).[28]

Il existe d'autres plantes que *E. senticosus* qui contiennent des éleuthérosides B et E, parfois même en abondance supérieure. Cependant, il est fréquent que ces sources de substitution en éleuthérosides, contrairement à *E. senticosus*, renferment également des agents toxiques. Pour exemple on peut citer une plante couramment utilisée en ce sens : *Periploca sepium*.[29]



Nom	R	
éleuthéroside D	Glc	épimère en 7 et 7' de l'éleuthéroside E
éleuthéroside E	Glc	
éleuthéroside E_1	H	
éleuthéroside E_2	H	épimère en 7 de l'éleuthéroside E_1

Nom		R_1	R_2
éleuthéroside I	mussénine B	Rha-(1→4)-Ara-	H
éleuthéroside K	β-hédérine	Rha-(1→2)-Ara-	H
éleuthéroside L		Rha-(1→4)-Ara-	Rha-(1→4)-Glc-(1→4)-Glc-(1→6)-AcO-
éleuthéroside M	hédérasaponine B	Rha-(1→2)-Ara-	Rha-(1→4)-Glc-(1→4)-Glc-(1→6)-AcO-

Figure III-5. *Représentation de quelques éleuthérosides. (Glc = glucose, Rha = rhamnose, Ara = arabinose).*

2.2. Action pharmacologique

Le terme *adaptogène* a été défini par les Soviétiques vers la fin des années 1950 pour désigner la propriété d'une substance à exercer un effet tant sur des malades que sur des personnes saines, en corrigeant les dysfonctionnements et sans produire d'effet indésirable.[2] Ceci se traduit par une augmentation de la résistance non spécifique de l'organisme à des *stimuli* extérieurs physiques, chimiques ou biologiques.[30-31] *E. senticosus* est une plante qui appartient à la famille des *adaptogènes*, elle est efficace, non dangereuse, et n'induit pas de fatigue après l'effort, car contrairement au ginseng, ce n'est pas un stimulant.[3,6,10,31-33] C'est dans ce contexte, dans le cas d'une baisse des capacités physiques et mentales telles que de la fatigue, des faiblesses passagères, des pertes de concentration, ou lors d'une convalescence que l'ESCOP (*European Scientific Council on Phytotherapy*) recommande la prise d'*Eleutherococci radix*.[6]

Dans l'ex-URSS, de nombreuses études ont été menées à grande échelle sur plusieurs milliers de personnes dans des écoles, des usines, des centres sportifs ou militaires pour évaluer les capacités adaptogènes de *E. senticosus*.[10,32-33] Il ressort de ces études que la plante favorise le sommeil, régule la tension artérielle (hyper- et hypotension), soulage le patient dans le cas de problèmes rénaux, de bronchites chroniques et même de certains cancers.[3,10,32,34] Ces études révèlent également qu'après la prise d'éleuthérocoques les patients améliorent leur concentration, leur résistance au stress et ils appréhendent mieux les efforts physiques (surcharge de travail, déplacement, bruit, chaleur), ce qui permet également d'accroître les performances athlétiques ainsi que le rendement horaire pour des opérations qui requièrent de l'attention et de la tension nerveuse.[10,32,34-36]

Une étude réalisée dans le cadre de la fièvre Méditerranéenne familiale (FMF), une maladie génétique caractérisée par des états fébriles récurrents, accompagnés de douleurs dans les articulations, la poitrine et la cavité péritonéale, a permis de montrer que les patients soignés avec des extraits d'*Eleutherococcus* présentent une baisse de la fréquence, de la durée et de l'intensité des attaques.[37-38] D'autres études montrent que les éleuthérocoques sont capables de contribuer à ralentir le processus de sénescence de l'organisme et de combattre les effets du vieillissement, ce qui permet d'améliorer les conditions de vie des personnes âgées.[39-40] Ces effets seraient dus à une stimulation du système nerveux central (SNC) et des glandes endocrines.[1,34] La réduction des maladies liées au froid et aux mauvaises conditions climatiques, de même que l'immunostimulation contre les rhinovirus serait, quant à elle, liée à une augmentation du nombre de lymphocytes T.[3,32,38,41-43]

E. senticosus est particulièrement réputé pour son action anti-stress, généralement attribuée à l'éleuthéroside E.[38,44] En réalité la plante agit comme un régulateur de stress.[45] Elle limite le transport des hormones du stress à leurs récepteurs et inhibe la catéchol-*O*-méthyl transférase (COMT).[17,46]

D'autres études menées sur les constituants de *E. senticosus* suggèrent des propriétés antioxydantes qui permettraient à la plante d'avoir une action protectrice ou inhibitrice vis-à-vis des radicaux libres.[2,34,47] Parmi les autres activités attribuées à cette plante, on peut citer une amélioration des acuités visuelle et auditive, une inhibition des dommages liés à une irradiation, une aide à la régulation des taux d'insuline et de cholestérol.[2,48]

3. RÉFÉRENCES

1. **Wikipédia.**
Éleuthérocoque. http://fr.wikipedia.org/wiki/Eleutherococcus.

2. **Davydov M., Krikorian A.D.**
Eleutherococcus senticosus (Rupr. & Maxim.) Maxim. (*Araliaceae*) as an adaptogen: a closer look. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 72(3), pp. 345-393.

3. **Brekhman I.I.**
Eleutherokokk (*Eleutherococcus*). Nauka Publishing House, Leningrad, USSR, **1968**.

4. **Soejarto D.D., Farnsworth N.R.**
The correct name for Siberian ginseng. *Harvard University, Botanical Museum Leaflets*, **1976**, 26, pp. 339-343.

5. **Choi Y.E., Yang D.C., Yoon E.S.**
Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **1999**, 58(2), pp. 93-97.

6. **Apers S., Naessens T., Van Miert S., Pieters L., Vlietinck A.**
Quality control of roots of *Eleutherococcus senticosus* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, **2005**, 16(1), pp. 55-60.

7. **European Scientific Council on Phytotherapy.**
Eleutherococci radix – Eleutherococcus (2nd Edn). Thieme, New York, E/S/C/O/P Monographs, **2003**, pp 142-149.

8. **World Health Organization.**
Radix Eleutherococci. In *World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants*, Vol. 2, World Health Organization, Genève, Suisse, **2002**, pp 83-96.

9. **Choi Y.E., Kim J.W., Yoon E.S.**
High frequency of plant production via somatic embryogenesis from Callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Annals of Botany*, **1999**, 83(3), pp. 309-314.

10. ***Anonyme*.**
An analysis of Primorye and its active ingredients: adaptogens. http://www.oxyfreshww.com/rc/nutrition/pdfs/srpadaptogenreport.pdf.

11. **Jeong J.H., Jung S.J., Murthy H.N., Yu K.W., Paek K.Y., Moon H.K., Choi Y.E.**
Production of eleutherosides in in vitro regenerated embryos and pantlets of *Eleutherococcus chiisanensis*. *Biotechnology Letters*, **2005**, 27(10), pp. 701-704.

12. **Choi Y.E., Katsumi M., Sano H.**
Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Science*, **2001**, 160(6), pp. 1183-1190.

13. **Park S.Y., Ahn J.K., Lee W.Y., Murthy H.N., Paek K.Y.**
Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science*, **2005**, 168(5), pp. 1221-1225.

14. **Seo J.W., Jeong J.H., Shin C.G., Lo S.C., Han S.S., Yu K.W., Harada E., Han J.Y., Choi Y.E.**
Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry*, **2005**, 66(8), pp. 869-877.

15. **Shohael A.M., Chakrabarty D., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y.**
Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiflorus* somatic embryos in an air-lift bioreactor and production of eleutherosides. *Journal of Biotechnology*, **2005**, 120(2), pp. 228-236.

16. **Shohael A.M., Ali M.B., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y.**
Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. *Plant Cell – Tissue and Organ Culture*, **2006**, 85(2), pp. 219-228.

17. **Shin K.H., Lee S.**
The chemistry of secondary products from *Acanthopanax* species and their pharmacological activities. *Natural Product Science*, **2002**, 8(4), pp. 111-126.

18. **Wanying Y., Hua Z., Weidong H., Jiping C. Xinmiao L.**
Analysis of the volatile oil from the stem of *Acanthopanax Senticosus* (Rupr. et Maxim.) harms with several hyphenated methods of chromatography. *Frontiers of Chemistry in China*, **2006**, 1(2), pp. 193-198.

19. **Solovyeva A.G., Petukhova T.V., Greshnykh R.D.**
Analysis and standardization of *Eleutherococcus* roots and rhizomes and its liquid extracts by the amount of biologically active compounds. *Farmatsiia*, **1989**, 38, pp. 25-27.

20. **Wagner H.**
Analytik von *Eleutherococcus* Extrakten. *Naturheilpraxis*, **1980**, 8, pp. 928-930.

21. **Jiang W., Li W., Han L., Liu L., Zhang Q., Zhang S., Nikaido T., Koike K.**
Biologically active triterpenoid saponins from *Acanthopanax senticosus*. *Journal of Natural Products*, **2006**, *in press*.

22. **Haworth R.D.**
Annual Reports on the Progress of Chemistry, **1936**, 33, pp. 266-279.

23. **Ovodov Y.S., Frolova G.M., Nefedova M.Y., Elyakov G.B.**
Glycosides of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. II – The structure of éleuthérosides A, B_1, C and D. *Khimia Prirodnykh Soedinenii*, **1967**, 1, pp. 63-64.

24. **Slanina J., Glatz Z.**
Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B*, **2004**, 812(1-2), pp. 215-229.

25. **Yat P.N., Arnason J.T., Awang D.V.C.**
An improved extraction procedure for the rapid, quantitative high-performance liquid chromatographic estimation of the main eleutherosides (B and E) in *Eleutherococcus senticosus* (eleuthero). *Phytochemical Analysis*, **1998**, 9(6), pp. 291-295.

26. **Slacanin I., Marston A., Hostettmann K., Guédon D., Abbe P.**
The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, **1991**, 2, pp. 137-142.

27. **Kang J.S., Linh P.T., Cai X.F., Kim H.S., Lee J.J., Kim Y.H.**
Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high-performance liquid chromatography. *Archives of Pharmacal Research*, **2001**, 24(5), pp. 407-411.

28. **Feng S.L., Hu F.D., Zhao J.X., Liu X., Li Y.**
Determination of eleutheroside E and eleutheroside B in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2006**, 62(3), pp. 315-320.

29. **Awang D.V.C.**
Siberian ginseng toxicity may be case of mistaken identity. *Canadian Medical Association Journal*, **1996**, 155(9), p. 1237.

30. **Farnswoth N.R., Kinghorn A.D., Soejarto D.D., Waller D.P.**
Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Current status as an adaptogen. In *Economic and Medicinal Plant Research*. Vol. 1. Wagner H., Hikino H., Farnsworth N.R. Eds., Academic Press, New-York, New-York, **1985**, pp. 155-215.

31. **Barenboim G.M.**
Part V – *Eleutherococcus* and adaptogens. Generalizations and hypotheses – *Eleutherococcus*: application and mechanism of action. https://www.oxyfreshww.com/rc/primorye/pdfs/eleuthroandadaptogens.pdf.

32. **Barenboim G.M., Kozlova N.B.**
Part III – *Eleutherococcus* extract as an agent increasing the biological resistance of man exposed to unfavourable factors – Use of *Eleutherococcus* extract for increasing the biological resistance of man exposed to different unfavourable environmental factors. https://www.oxyfreshww.com/rc/primorye/pdfs/eleuthrobioresist.pdf.

33. **Bucci L.R.**
Selected herbals and human exercise performance. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2000**, 72(Suppl), pp. 624S-936S.

34. **Deyama T., Nishibe S., Nakazawa Y.**
Constituents and pharmacological effects of Eucomia and Siberian ginseng. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2001**, 22(12), pp. 1057-1070.

35. **Kimura Y., Sumiyoshi M.**
Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 95(2-3), pp. 447-453.

36. **Narimanian M., Badalayan M., Panosyan V., Gabrielyan E., Panossian A., Wikman G., Wagner H.**
Impact of Chisan® (ADAPT-232) on quality-of-life and its efficacy as an adjuvant in the treatment of acute non-specific pneumonia. *Phytomedicine*, **2005**, 12(10), pp. 723-729.

37. **Amaryan G., Astvatsatryan V., Gabrielyan E., Panossian A., Panosyan V., Wikman G.**
Double-blind, placebo-controlled, randomized, pilot clinical trial of ImmunoGuard® - A standardized fixed combination of *Andrographis paniculata* Nees, with *Eleutherococcus senticosus* Maxim, *Schizandra chinensis* Bail. and *Glycyrrhiza glabra* L. extracts in patients with familial Mediterranean fever. *Phytomedicine*, **2003**, 10(4), pp. 271-285.

38. **Kaplan E.Y., Sokolov I.K., Losev A.S., Airapetyan G.M., Slepyan L.I., Solovyova R.V., Burkin A.I., Frolova L.L.**
Part I – *Eleutherococcus* extract: action range – Study of the range of the adaptogenic action of *Eleutherococcus senticosus* Rupr. et Maxim. https://www.oxyfreshww.com/rc/primorye/pdfs/ eleuthroactionrange.pdf.

39. **Cicero A.F.G., Derosa G., Brillante R., Bernardi R., Nascetti S, Gaddi A.**
Effects of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus* Maxim.) on elderly quality of life: a randomised clinical trial. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **2004**, 38(S1), pp. 69-73.

40. **Menvielle-Bourg F.J.**
Plantes et vieillissement, données actuelles. *Phytothérapie*, **2005**, 3(2), pp. 57-71.

41. **Bohn B., Nebe C.T., Birr C.**
Immunopharmacological effects of *Eleutherococcus senticosus* extract as determined by quantitative flow cytometry. *International Journal of Immunopharmacology*, **1988**, 10(S1), p. 67.

42. **Glatthaar-Saalmüller B., Sacher F, Esperester A.**
Antiviral activity of an extract derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Antiviral Research*, **2001**, 50(3), pp. 223-228.

43. **Steinmann G.G., Esperester A., Joller P.**
Immunopharmacological *in vitro* effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, **2001**, 51(1), pp. 76-83.

44. **Gaffney B.T., Hügel H.M., Rich P.A.**
Panax ginseng and *Eleutherococcus senticosus* may exaggerate an already existing biphasic response to stress via inhibition of enzymes which limit the binding of stress hormones to their receptors. *Medical Hypotheses*, **2001**, 56(5), pp. 567-572.

45. **Gaffney B.T., Hügel H.M., Rich P.A.**
The effects of *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng* on steroidal hormone indices of stress and lymphocyte subset numbers in endurance athletes. *Life Sciences*, **2001**, 70(4), pp. 431-442.

46. **Medon P.J., Ferguson P.W., Watson C.F.**
Effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts on hexobarbital metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, 10(2), pp. 235-241.

47. **Lee S., Son D., Ryu J., Lee Y.S., Jung S.H., Kang J., Lee S.Y., Kim Y.S., Shin K.H.**
Anti-oxidant activities of *Acanthopanax senticosus* stems and their lignans components. *Archives of Pharmacal Research*, **2004**, 27(1), pp. 106-110.

48. **Li X.L., Zhou A.G.**
Preparation of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* and its inhibition against irradiation-induced injury of rat. *Carbohydrate Polymers*, **2006**, *in press*.

IV. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Dans les parties précédentes il a été montré que les plantes utilisées en phytothérapie ont de réelles propriétés thérapeutiques, en particulier dans le cas de l'*Harpagophytum*, et de l'*Eleutherococcus*. Or les racines de ces plantes sont fréquemment incorporées dans la préparation de compléments alimentaires à usage vétérinaire, et en particulier équin. De telles substances étant considérées comme prohibées, il est important pour respecter les Codes des Courses et dans un souci d'équité entre les chevaux, que le Laboratoire des Courses Hippiques dispose de méthodes analytiques capables de détecter l'administration de ces substances. Tel est l'objectif de cette thèse.

Le développement d'une méthode de contrôle de la médication se déroule en plusieurs étapes. Si la médication utilisée consiste en une phytothérapie et non en une substance thérapeutique issue de la synthèse pharmaceutique, alors la première étape consiste à déterminer le ou les principe(s) actif(s) de la plante qui serviront de marqueurs à son administration. Lorsque ces marqueurs sont identifiés, il est nécessaire de les caractériser par spectrométrie de masse et de développer des méthodes d'analyse en couplage avec la chromatographie liquide ou gazeuse, selon la nature des composés.

Ensuite, des méthodes d'extraction et de purification des marqueurs d'administration à partir des fluides biologiques équins (urine et plasma) doivent être développées. Cette partie du travail est longue et fastidieuse, elle est néanmoins très importante car c'est en grande partie d'elle que dépendent la qualité et la robustesse des techniques développées. En parallèle, les paramètres du couplage chromatographique sont optimisés de manière à obtenir une bonne sélectivité de l'ensemble de la méthode.

Afin de vérifier leur validité, les méthodes analytiques développées sont confrontées à des échantillons issus d'expérimentations animales. Une expérimentation animale consiste à administrer, sous contrôle vétérinaire, la préparation thérapeutique étudiée à un cheval. A cette occasion, des échantillons d'urine et de plasma sont collectés à des instants donnés et envoyés au laboratoire pour y être analysés. Ce type d'expérimentation ne présente aucun danger pour le cheval, en particulier dans le cas de phytothérapies. Ces expérimentations permettent également de recueillir les premières informations sur la pharmacocinétique/pharmacodynamique de la substance étudiée. Dans certains cas ces expérimentations peuvent également permettre l'identification d'un ou de plusieurs métabolites des substances administrées. Les expérimentations qui sont reportées dans ce mémoire ont été réalisées par le Dr Garin au centre agréé d'administration et de prélèvement de Coye-la-Forêt où résident sept chevaux pur-sang qui appartiennent à la Fédération Nationale des Courses Françaises.

En 2003, lorsque ce projet a été initié, aucune étude analytique préalable n'avait été réalisée par le Laboratoire des Courses Hippiques concernant les méthodes de détection de l'*Harpagophytum* ou de l'*Eleutherococcus*. Il existait relativement peu de littérature scientifique sur le sujet (propriétés des plantes, méthodes d'analyse…). A titre d'exemple, Davydov recensait en 2000 environ 230 publications relatives à *E. senticosus* ; la plupart en langue russe, le nombre de références relatives à l'*Harpagophytum* étant du même ordre de grandeur. L'extraction à partir de milieux biologiques et la spectrométrie de masse ne représentent qu'une infime partie de cette littérature. C'est donc toute la méthodologie décrite précédemment qui doit être développée au cours de cette thèse afin de mettre en place les méthodes de détection de l'*Harpagophytum* et de l'*Eleutherococcus*.

L'objectif final est d'obtenir une méthode qui soit applicable à un dépistage large spectre d'une famille de molécules (les glucosides), mais également des méthodes de confirmation qui soient en accord avec les recommandations de l'AORC (*Association of Official Racing Chemists*, *Cf. Annexe I*). Idéalement les différentes substances seront détectées pendant le temps correspondant à la durée effective d'activité thérapeutique.

Chapitre 2 - TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODES THÉORIQUES UTILISÉES

I. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON

1. LLE – EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

1.1. Présentation

L'extraction liquide-liquide ou LLE (*Liquid-Liquid Extraction*) est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles. Elle consiste à extraire une ou plusieurs molécules (les *solutés*) d'un milieu liquide (la *solution*) au contact d'un solvant dans lequel les solutés sont solubles. Le solvant qui contient alors les solutés est désigné sous le terme d'*extrait*, et la solution qui a perdu la majorité de ces mêmes constituants est appelée *raffinat*. Cette opération est fréquemment utilisée pour séparer d'un mélange liquide des constituants dont les volatilités sont faibles ou très voisines, ou qui donnent des azéotropes.[1-2]

Pour que l'opération soit réalisable il est nécessaire :

- que les deux phases ne soient pas complètement miscibles
- que leurs masses volumiques soient différentes
- qu'il n'existe pas de réactions chimiques entre les divers constituants du mélange

Cette technique est très utilisée dans les industries alimentaires, pharmaceutiques ainsi que dans les milieux de l'hydrométallurgie et de la pétrochimie. Elle a été utilisée au cours de la thèse pour tenter d'extraire l'harpagoside de l'urine, mais la polarité liée à la fonction glucose de l'harpagoside est trop élevée et ce dernier demeure dans la phase aqueuse. L'utilisation de l'extraction sur phase solide s'est donc montrée inévitable.

1.2. Principe

a. Processus d'extraction

L'extraction liquide-liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules à décanter, colonnes, mélangeurs…). La séparation des phases s'obtient ensuite par décantation gravimétrique ou centrifuge.

Le passage du soluté dans le solvant aboutit à un équilibre dans la composition des phases. L'obtention de cet équilibre est liée à la vitesse de diffusion du soluté d'une phase à l'autre. Les vitesses d'extraction sont d'autant plus grandes que les différences de concentration en soluté des deux phases sont importantes et que la surface d'échange entre

les phases est grande. L'agitation du milieu a pour effet d'augmenter la surface de contact entre les phases et de favoriser la diffusion du soluté au sein de chacune d'elles.[2]

La séparation ou décantation comprend la coalescence des fines gouttelettes de la phase dispersée en grosses gouttes, le regroupement de ces gouttes et leur rassemblement en une phase continue, distincte de l'autre. La décantation est d'autant plus rapide que les liquides ont des tensions superficielles élevées, et des masses volumiques suffisamment éloignées. Les différentes étapes de l'extraction liquide-liquide sont représentées sur la *Figure I-1*.

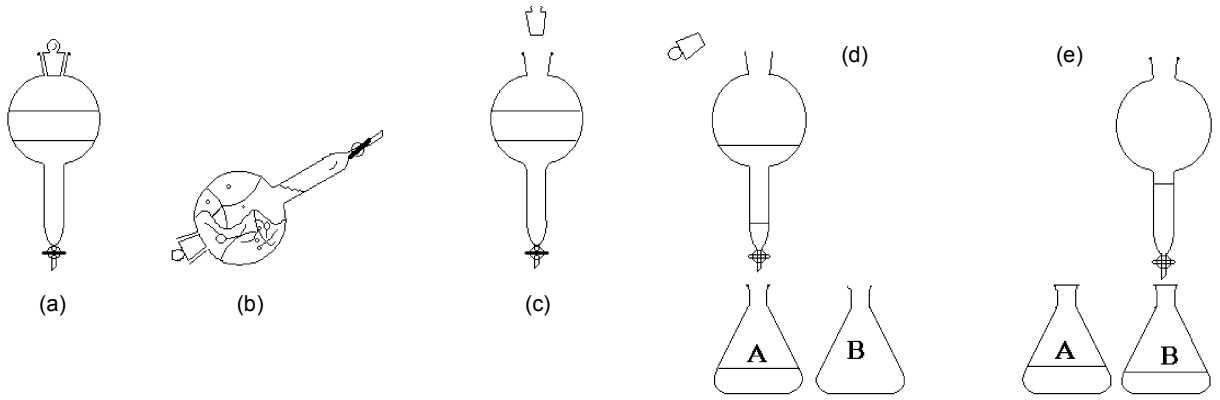


Figure I-1. *Extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter. (a) Ajout du solvant à la solution. (b) Agitation pour augmenter la surface d'échange entre les deux phases. (c) Séparation des deux phases par décantation. (d) Récupération du raffinat (si la densité de la solution est supérieure à celle du solvant). (e) Récupération de l'extrait.*

Bien que le principe de l'extraction liquide-liquide paraisse simple, sa mise en place est assez complexe, car il faut choisir le système liquide-liquide et l'appareil qui donneront les meilleures performances pour un soluté donné.

b. Constante de distribution

La distribution d'un soluté entre les deux phases à l'équilibre est donnée par la constante de distribution *D*. Cette grandeur est définie comme le rapport des concentrations du soluté entre l'extrait : S_E et le raffinat : S_R lorsque l'équilibre est atteint ***(1)***.[3]

$$D = \frac{S_E}{S_R} \qquad \textbf{(1)}$$

La constante *D* est liée à la température et à la nature de l'analyte et du solvant. Elle est peu influencée par la pression.

c. Efficacité de l'extraction

L'efficacité E de l'extraction représente la quantité de soluté extraite par rapport à la quantité totale de soluté dans les deux phases ***(2)*** :

$$E = \frac{S_E V_E}{S_E V_E + S_R V_R} = \frac{D}{D + \frac{V_R}{V_E}} \qquad \textbf{(2)}$$

V_E et V_R sont respectivement les volumes d'extrait et de raffinat

L'efficacité d'une extraction peut être améliorée en augmentant le volume de solvant utilisé. Le volume de solvant est généralement trois fois supérieur au volume de la solution à extraire.[3]

d. Extractions multiples

Une autre possibilité pour augmenter l'efficacité d'une extraction consiste à effectuer des extractions multiples : le raffinat obtenu lors de la précédente extraction devient la nouvelle solution à extraire. On note W_i la quantité de matière initiale, W_r la quantité de matière restante et n le nombre d'extractions ***(3)*** :

$$W_r = W_i \left(\frac{V_R}{D.V_E + V_R} \right)^n \qquad \textbf{(3)}$$

Cette méthode permet d'extraire une plus grande quantité de soluté avec un volume de solvant très inférieur à celle nécessaire à une extraction simple. Il est fréquent que trois extractions successives permettent de récupérer la quasi-totalité du soluté. En milieu industriel, où les extractions se font en flux continu, les extractions multiples sont réalisées grâce à l'utilisation de plateaux.[3]

2. SPE – EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE

2.1. Présentation

L'extraction sur phase solide ou SPE (*Solid-Phase Extraction*) compte actuellement parmi les techniques les plus performantes pour une préparation d'échantillon rapide et sélective. Les cartouches SPE peuvent être utilisées pour différents usages : purification ou concentration d'analytes à l'état de traces, changement de solvant (passage d'un milieu aqueux à un milieu organique), dessalage, dérivation (la molécule est fixée sur la phase solide, dérivée, puis éluée) ou encore fractionnement d'un échantillon.

Globalement, la SPE présente un grand nombre d'avantages par rapport à des méthodes plus traditionnelles, comme l'extraction liquide-liquide. En effet, elle permet d'obtenir des taux de recouvrement élevés, de concentrer les analytes, d'obtenir des éluats de haute pureté ; elle est facile à automatiser, compatible avec la plupart des méthodes d'analyse et permet de réduire la consommation de solvant. Ainsi, la SPE s'est considérablement développée au cours de ces dernières années ; le nombre de phases disponibles a augmenté et la robustesse des cartouches a été grandement améliorée.[4-6]

Le principe de la SPE est très semblable à celui de la chromatographie liquide. Il implique en effet d'un équilibre entre un analyte, une phase solide et un solvant.

2.2. Développement d'une méthode de SPE

a. Choix du type de phase

Le choix de la phase est un paramètre crucial : c'est de lui que dépend la qualité des résultats obtenus. Ces dernières années, le nombre de types de phase disponibles s'est considérablement étendu, multipliant les types d'interactions possibles, et les rendant parfois très spécifiques de certaines fonctions chimiques. Les principales catégories de phases sont présentées ci-dessous.[4-6]

Phases polaires

Historiquement les phases polaires sont les plus anciennes, car elles sont directement dérivées des colonnes réalisées par les organiciens pour purifier un produit de synthèse. Elles peuvent être à base de silice, d'aluminium ou de cellulose. Les principales silices greffées de cette catégorie portent des groupements cyano, amino, ou dihydroxy à l'extrémité de chaînes alcanes en C_3. Ces supports se comportent comme des colonnes HPLC de phase normale, et les solvants utilisés sont généralement de nature apolaire.

Phases apolaires

Parmi les cartouches constituées de silice greffée avec des groupements apolaires, la cartouche dite C_{18} ou *ODS* (*Octa Decyl Silica*) est de loin la plus répandue, sous toutes ses formes : avec ou sans *end-caping* (technique de greffage permettant de supprimer les silanols libres), mono- ou trifonctionalisée… D'autres greffons du même type, mais plus courts et donc moins apolaires sont également disponibles : C_8, C_4, C_2, C_1. Il existe également des greffons phényle ou cyclohexyle proposant des affinités particulières avec certaines familles de molécules. Ces supports se comportent comme des colonnes HPLC de phase inverse, et sont généralement utilisés avec des solvants polaires.

Les supports échangeurs d'ions

Il existe deux grandes catégories de supports échangeurs d'ions : les échangeurs de cations, et les échangeurs d'anions. Dans les deux cas, il s'agit de silice greffée avec des groupements fonctionnels. Ils peuvent être utilisés de deux manières : soit ils retiennent très efficacement l'analyte d'intérêt, ce qui permet d'éliminer au mieux les interférents matriciels, soit ils retiennent les interférents ionisables, lorsque l'on cherche à purifier des analytes neutres.

Les supports échangeurs de cations possèdent généralement une fonction acide carboxylique, ou un acide sulfonique. Ils sont principalement utilisés pour l'extraction des ammoniums quaternaires. Ces supports sont activés par un conditionnement à pH acide, et les analytes sont libérés lors de l'élution à pH basique. Les supports échangeurs d'anions fonctionnent exactement de façon opposée : ils sont conditionnés à pH basique, et les analytes sont élués avec un solvant à pH acide. Ces supports sont généralement composés de fonctions aminées et permettent de retenir des composés qui présentent des fonctions acides.

Les supports mixtes

Ces supports présentent à la fois les caractéristiques des supports apolaires (généralement C_8) et celles des supports échangeurs d'ions. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils permettent d'utiliser les interactions secondaires de certaines molécules afin de mieux les fixer sur la phase. De ce fait, il est possible d'effectuer des rinçages plus *agressifs*, et donc d'obtenir des échantillons plus propres. Ils permettent également d'extraire efficacement des molécules dont le caractère apolaire seul, ou ionique seul ne permet pas une extraction sélective avec les supports précités.

Les phases polymériques

Ces supports sont souvent constitués d'une base apolaire PS-DVB (polystyrène-divinylbenzène), mais des fonctions acide, alcool, amine ou des hétérocycles y sont fréquemment ajoutés afin d'en modifier le comportement. Ce type de cartouche est celui qui a fait l'objet du plus de recherches et de développement ces dernières années. Il est très fréquent que les constructeurs gardent secrètes les constitutions chimiques de ces phases, ce qui ne facilite pas le développement des méthodes sur ce type de support.

Les supports particuliers

De plus en plus de cartouches SPE sont développées sur des supports particuliers, ou développent des interactions spécifiques de certaines molécules. Parmi ces cartouches, certaines sont capables de créer des liaisons covalentes avec les analytes *via* l'utilisation d'acides phénylboroniques, ce qui les rend spécifiques des cis diols 1,2. On peut également citer les cartouches à base de carbone graphite, *a priori* particulièrement appropriées pour l'extraction de composés polaires plans.

C'est dans le domaine de l'environnement que s'est développé le plus grand nombre de cartouches spécifiques. Les catalogues récents des constructeurs présentent en effet un grand nombre de cartouches dédiées spécifiquement à l'extraction de l'atrazine, des herbicides, des phénols, des HPA (hydrocarbures polyaromatiques)… Ces cartouches sont principalement destinées à l'extraction de composés polaires dans les milieux aqueux. Elles doivent présenter un fort pouvoir de rétention car il n'est pas rare de devoir concentrer 2 L d'eau ou plus sur une même cartouche, en raison des faibles concentrations attendues.

Les MIP – Molecular Imprinted Polymers ou polymères à empreinte moléculaire

Ce type de cartouches SPE, encore peu commercialisé, est très spécifique d'une molécule donnée. En effet, les résines utilisées pour réaliser ces supports sont polymérisées avec l'analyte (ou un analogue proche), ce qui leur confère une reconnaissance spatiale proche de ce que l'on peut obtenir avec des colonnes d'immunoaffinité.

L'usage des cartouches SPE requiert des connaissances précises sur la molécule ainsi que sur le milieu dont on veut l'extraire. La *Figure I-2* présente un diagramme qui permet de choisir le type de support solide le plus adapté pour effectuer une extraction en répondant à quelques questions simples relatives à la nature de la matrice, de l'analyte et des interférents.

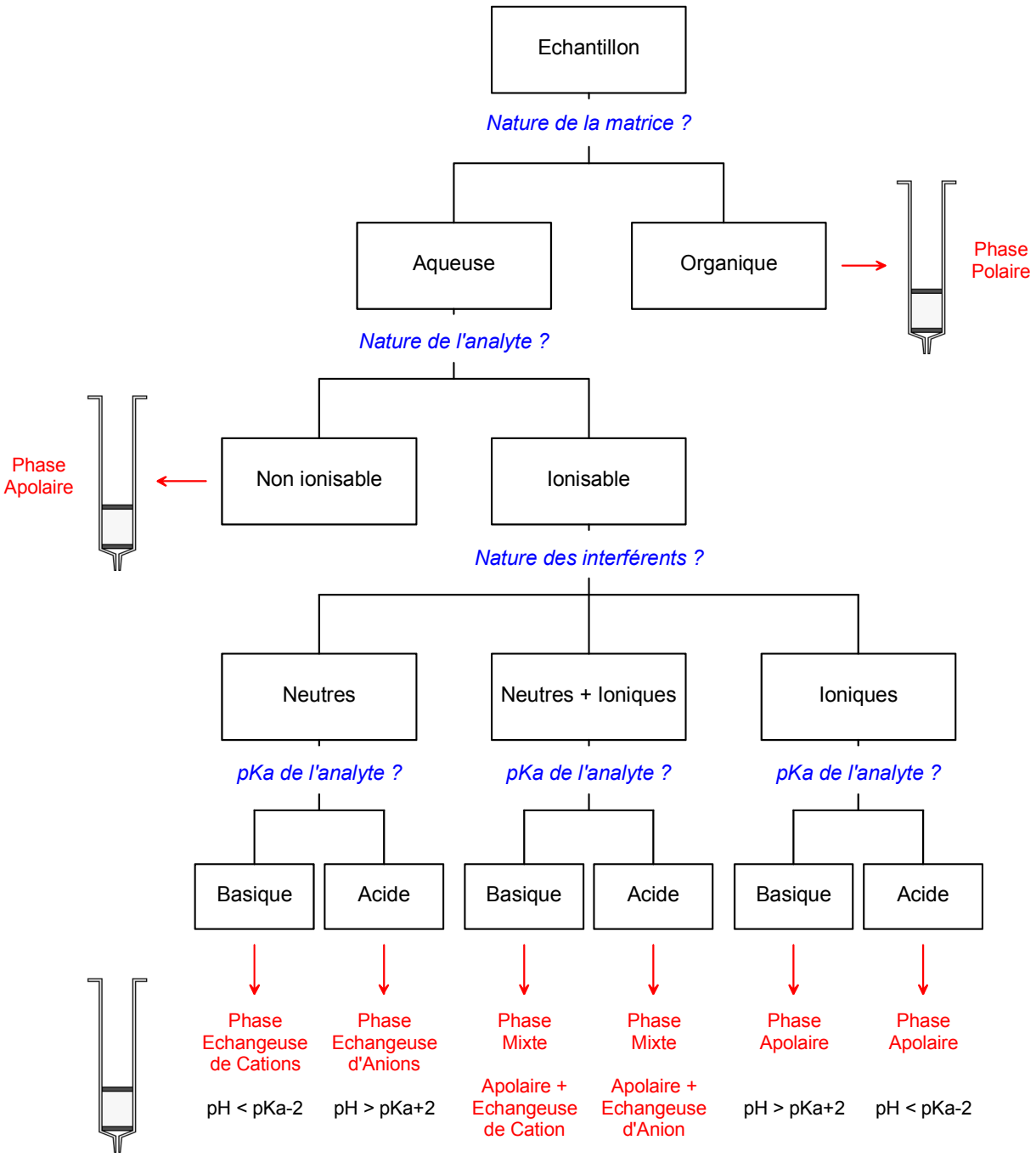


Figure I-2. *Diagramme de sélection d'un mécanisme en SPE.*

b. Protocole d'extraction

Une extraction SPE se déroule en six étapes principales, décrites sur la *Figure I-3*.[4-7]

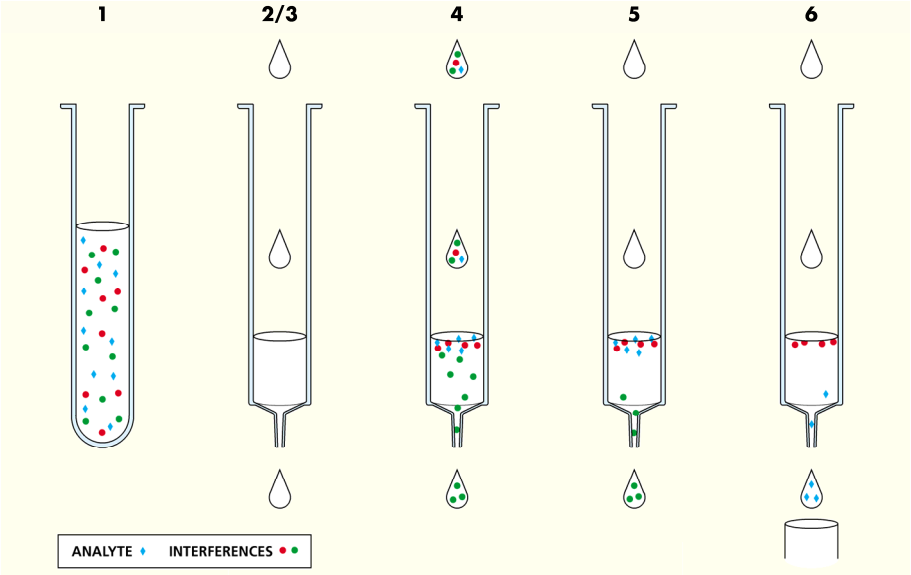


Figure I-3. *Étapes de l'extraction SPE.*[6]

1 – Prétraitement de l'échantillon

La SPE à proprement parlée est généralement précédée d'une étape de prétraitement qui dépend de la nature de la matrice. Lors de ce prétraitement, il est possible d'être amené à centrifuger l'échantillon, le diluer, le filtrer, en ajuster le pH, effectuer une digestion enzymatique…

2 – Conditionnement de la cartouche

Cette étape a pour objectif principal de mouiller le support solide de la cartouche avec un solvant, d'en éliminer les éventuelles impuretés résiduelles liées à la fabrication ou à l'utilisation d'un solvant particulier. Certaines cartouches comme les Oasis HLB (Waters) ou les AbsElut Nexus (Varian), sont dites NC-SPE (*Non-Conditioning SPE*), mais dans la pratique il est tout de même recommandé de les conditionner.[8]

3 – Équilibrage de la cartouche

Cette étape est souvent assimilée à celle de conditionnement, son rôle étant de maximiser les performances du support solide, mais également d'accroître la reproductibilité des résultats. L'équilibrage consiste à éluer un solvant pour activer les sites du support (orientation des chaînes alcanes, état de charge…). Si les sites sont incomplètement activés,

les analytes peuvent ne pas se fixer correctement. Ceci est particulièrement primordial pour les cartouches échangeuses d'ions.

4 – Dépôt de l'échantillon

Cette étape consiste à déposer l'échantillon, qui a préalablement été traité lors de l'étape 1, sur le support solide. A noter qu'en fonction de la matrice de départ, il est possible que certains interférents (voire les analytes que l'on recherche) soient éliminés dès cette étape, comme on peut le voir sur la *Figure I-3*.

5 – Élution des interférents

Lors de cette étape, un solvant ayant la capacité d'éliminer un maximum d'interférents, tout en veillant à ce que les analytes recherchés restent fixés au support solide sera choisi. Il est possible d'effectuer cette opération avec plusieurs solvants. De même, on peut être amené à effectuer des étapes de séchage entre deux rinçages, tout en veillant à ne pas fixer les analytes de façon irréversible sur le support solide.

6 – Élution des analytes

Cette étape se déroule de la même façon que la précédente. On choisit un solvant capable d'extraire les analytes d'intérêt, en évitant d'éluer trop d'interférents. Il est également possible d'effectuer des élutions avec différents solvants, en particulier lorsque l'on veut récupérer des molécules ayant des propriétés physico-chimiques différentes (une molécule libre et son homologue conjugué, par exemple). A la fin de l'extraction, il reste des interférents sur la phase solide, mais cela n'est pas dérangeant car les cartouches SPE sont à usage unique.

2.3. Matériel utilisé

Les extractions sur phase solide ont été réalisées à l'aide d'automates *Rapid Trace SPE Workstation* (Zymark) (voir schéma *Figure I-4).* L'utilisation d'automates permet d'obtenir une très grande reproductibilité des résultats, elle permet également un gain de temps considérable par rapport aux systèmes de type *VacElut* (Varian) : l'opérateur n'a qu'à placer les échantillons et les cartouches dans les supports correspondants et s'assurer que les volumes de solvant sont corrects ; les extractions peuvent s'effectuer 24 heures sur 24.

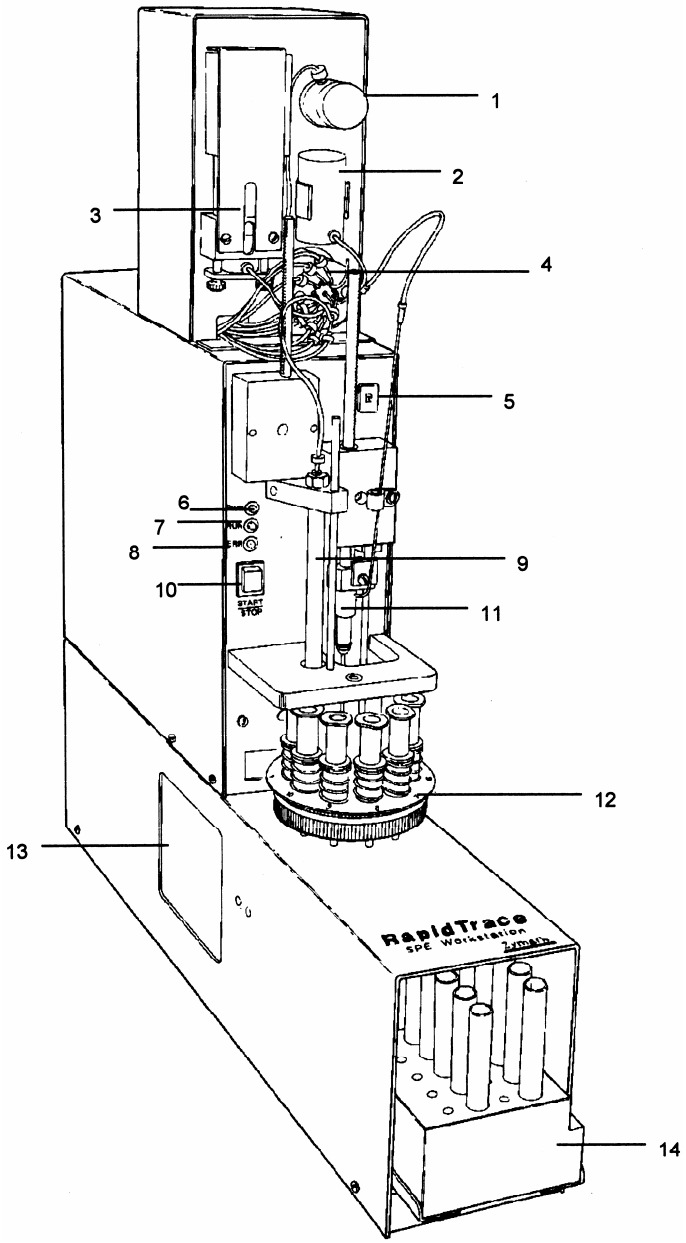


Figure I-4. *Automate Rapid Trace SPE Workstation.*[9] *(2) Chambre de mélange des solvants. (3) Seringue de prélèvement des échantillons et des solvants. (4) Vanne 12 voies pour sélectionner l'action de la seringue et les solvants. (9) Plongeur, partie de l'appareil qui assure le dépôt de l'échantillon et des solvants sur la cartouche SPE ainsi que le séchage par surpression d'azote. (11) Aiguille de prélèvement des échantillons. (12) Tourelle de support des cartouches SPE. (13) Lignes d'évacuation des poubelles. (14) Portoir des tubes échantillons et collecteurs.*

3. ASE – EXTRACTION PAR SOLVANT À CHAUD ET SOUS PRESSION

3.1. Présentation

L'ASE ou *Accelerated Solvent Extraction* est une méthode d'extraction par solvant à chaud et sous pression développée par la firme Dionex.

L'appareil utilisé permet l'extraction de composés organiques dans des échantillons solides et semi-solides de façon automatisée (*Figure I-5*), tout en augmentant la vitesse d'extraction par rapport aux méthodes traditionnelles de type Soxhlet. En effet, la haute température permet un échange plus rapide entre l'analyte, la phase solide et le solvant. Pour maintenir le solvant en phase liquide, les cellules d'extraction sont étanches et permettent de monter en pression. Une vanne d'échappement permet de libérer la pression lorsque celle-ci devient trop élevée selon le principe de la cocotte minute.[10]

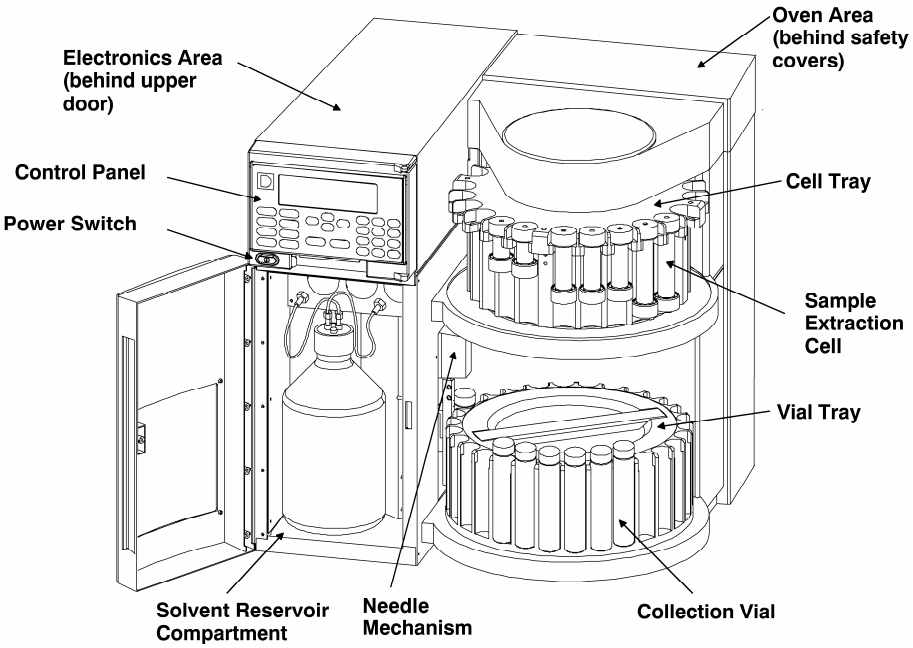


Figure I-5. *Dionex ASE 200*[10]

3.2. Utilisation de l'ASE

a. Préparation d'une cellule

Pour extraire un échantillon à l'aide de l'ASE, il faut préparer une cellule qui contiendra le solide duquel on veut extraire les analytes.

Le solide à analyser est finement broyé, soit à l'aide d'un broyeur mécanique, soit à l'aide d'un mortier et d'un pilon. La poudre ainsi obtenue est mélangée à un support solide, généralement du sable de Fontainebleau, mais d'autres supports solides, souvent des terres de diatomées comme l'Hydromatrix, ou la ChemElut (Varian) sont également utilisables. Un filtre de cellulose est placé au fond de la cellule, puis le mélange y est ajouté. La cellule est alors refermée et placée sur le carrousel de l'ASE pour extraction.

b. Fonctionnement de l'ASE

Après avoir préparé l'échantillon et placé la cellule ainsi qu'un flacon de récupération sur le carrousel de l'ASE, l'extraction proprement dite peut commencer. Une extraction ASE se déroule en huit étapes, présentées sur la *Figure I-6* :[10]

1 – Chargement de la cellule

Lors de cette étape, le carrousel se place dans un premier temps de façon à ce que le bras articulé puisse prélever la cellule et la placer dans le four. Dans un second temps, le carrousel se place de façon à ce que le flacon de récupération se trouve au niveau de l'aiguille de collecte, qui vient se bloquer en perçant le septum du flacon.

2 – Remplissage de la cellule

Lors de cette étape, le solvant est pompé et injecté dans la cellule jusqu'à ce que celle-ci soit pleine et déborde dans le flacon de récupération. La vanne statique se ferme et la pompe s'arrête lorsque la cellule optique détecte un niveau de solvant correspondant à 1 mL dans le flacon de récupération.

3 – Chauffage

La cellule est chauffée jusqu'à la température demandée en consigne lors de la programmation. La vanne statique et les vannes en amont de la cellule étant fermées, la pression augmente au sein de la cellule.

4 – Pause

Cette étape marque un temps d'arrêt à la température de consigne, de façon à permettre à la cellule de s'équilibrer thermiquement et de favoriser ainsi les équilibres entre les analytes, le solvant et le support solide. Lors des étapes 3 et 4, la vanne statique peut s'ouvrir par intermittence afin de ne pas excéder la pression de consigne.

5 – Rinçage

Lors de cette étape la vanne statique est ouverte et une partie du solvant chargé, voire saturé, en analytes est remplacé par du solvant pur. Généralement 50 à 100 % du

volume de la cellule est ainsi renouvelé. Les étapes 3, 4 et 5 peuvent être répétées *n* fois, de façon à optimiser l'extraction.

6 – Purge

Cette étape consiste à purger la cellule de tout le solvant. Pour cela, on utilise une surpression d'azote, qui chasse tout le liquide vers le flacon de récupération.

7 – Délestage final

Dans cette étape, la cellule est replacée à pression atmosphérique, *via* l'ouverture d'une vanne reliée avec l'extérieur.

8 – Déchargement de la cellule

La cellule est à pression atmosphérique (vanne ouverte), la vanne statique est également ouverte. L'aiguille libère le flacon de récupération, et le bras mécanique retire la cellule du four et la replace sur le carrousel. L'appareil est prêt à extraire l'échantillon suivant.

Au terme de ces huit étapes, on récupère l'éluat contenu dans le flacon de récupération. En fonction de la propreté de l'échantillon et de ce que l'on recherche, on peut soit procéder directement à l'analyse, soit utiliser d'autres techniques de préparation d'échantillon pour affiner l'extraction.

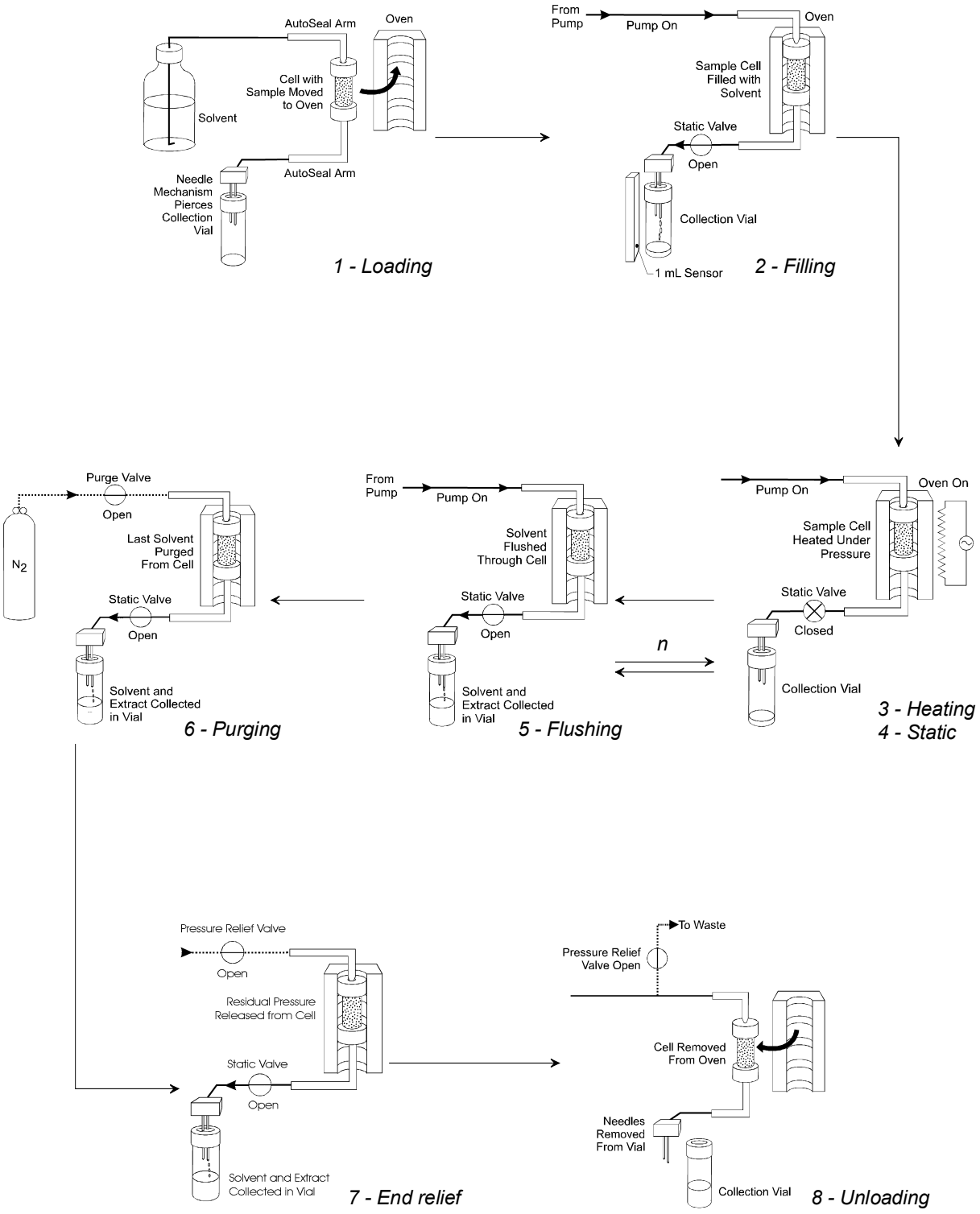


Figure I-6. *Principe de fonctionnement de l'ASE.*[10]

4. BIBLIOGRAPHIE

1. **Skoog D.A., West D.M., Holler F.J.**
   Chimie Analytique. Traduction de la 7ème édition américaine par Buess-Hermann C., Dauchot-Weymeers J., Dumont F., De Boeck Université, **1997**, 996 p.

2. **Rhode R.**
   Extraction Liquide/Liquide. Cours du Lycée Pradeau la Sède, Tarbes, **1998**.

3. **Wilkinson K.J.**
   Extraction Liquide-Liquide. Cours de chimie analytique – I, Chimie Analytique et Biophysicochimie de l'Environnement. Université de Genève, Sciences II. http://www.unige.ch/cabe/chimie_anal/extraction_liq_notes.pdf.

4. **Simpson N.J.K.**
   Solid-Phase Extraction – Principles, Techniques, and Applications. Simpson N.J.K., Ed. Marcel Dekker, New-York, NY, **2000**, 514 p.

5. **Telepchak M.J., August T.F., Chaney G.**
   Forensic and Clinical Applications of Solid-Phase Extraction. Breaugh M.J., Ed. Humana Press Inc, Totowa, NJ, **2004**, 369 p.

6. **Argonaut, IST.**
   Catalog of Sample Preparation Products and Services. **2001**, Argonaut Corporation, Foster City, CA, 131 p.

7. **McDonald P.D.**
   A Sample Preparation Primer and Guide to Solid-Phase Extraction Methods Development, 2001 PDF Edition. Waters, Milford, MA, **2001**.

8. **Waters.**
   Fast and Easy SPE Method Development Strategies for the Determination of Drugs in Biological Matrices. Waters, Milford, MA.

9. **Zymark.**
   Rapid Trace Workstation – SPE Workstation Installation and Quick Reference Guide. Rev. 5, Zymark Corporation, Hopkinton, MA, **2000**, 96 p.

10. **Dionex.**
    ASE® 200 Accelerated Solvent Extractor – Operator's Manual. Rev. 04, **1999**, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, 184 p.

II. CHROMATOGRAPHIE

1. GÉNÉRALITÉS

1.1. Historique

C'est en 1906 que le terme de chromatographie (du grec *krôma,* couleur et *graphein,* écrire) est apparu suite à l'expérience du botaniste russe Mikhaïl Semenovitch Tswett qui sépara les pigments végétaux colorés d'épinard sur une colonne remplie de carbonate de calcium et d'alumine à l'aide d'éther de pétrole.[1] Il a alors observé la formation de bandes de couleurs différentes (vert, orange, jaune…) sur la colonne. Il a également défini les termes : chromatogramme, élution et rétention.

En 1931, Khun et Lederer utilisent la méthode de Tswett, pratiquement oubliée, pour réaliser une séparation préparative des carotènes et des xanthophylles qui marque la redécouverte de la chromatographie, qui se développe ensuite rapidement grâce aux travaux de Brockmann, Karrer, Winterstein et Zechmeister.[2-3]

En 1941, Martin et Synge développent la pratique et la théorie de la chromatographie,[4] ils sont récompensés en 1952 par le Prix Nobel de Chimie pour leurs travaux sur la chromatographie de partage sur gel de silice.

Les techniques chromatographiques telles qu'on les connaît aujourd'hui ont été développées en 1952 pour la chromatographie en phase gazeuse par Martin et James,[5] et en 1967 pour la chromatographie liquide haute pression, qui s'appellera ensuite chromatographie liquide à haute performance (HPLC), avec les travaux de Huber et Huzsman.[6]

Depuis la mise en place de ces techniques séparatives, les colonnes utilisées n'ont cessé d'évoluer : la première séparation chirale sur une colonne HPLC a été rapportée en 1979 ; la taille des particules des colonnes HPLC ne cesse de diminuer pour en accroître les performances.

1.2. Principes

a. Principe général de la chromatographie

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille,

structure...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.[7]

La chromatographie peut être analytique ou préparative. Dans le cas de la chromatographie analytique, l'objectif est d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement. Pour cela, on associe la chromatographie à d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques (la spectrométrie de masse dans notre cas) : c'est le couplage. La chromatographie préparative est utilisée lorsque l'on désire purifier un produit, soit à l'issue d'une synthèse, soit dans le but d'utiliser d'autres techniques analytiques, comme la RMN par exemple.

Il existe deux grands types de chromatographie, en fonction de la phase mobile utilisée : la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC), qui regroupe la chromatographie sur colonne à pression atmosphérique, ou sous pression (communément nommée HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*), la chromatographie d'échange d'ions, d'exclusion stérique ou encore la chromatographie sur couche mince.

b. Grandeurs utilisées en chromatographie

Les grandeurs utilisées en chromatographie pour caractériser une méthode de séparation concernent essentiellement la colonne.[8]

Facteur de capacité

Le facteur de capacité *k'* permet de s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne pour exprimer le temps de rétention t_r d'un analyte de façon relative par rapport à t_0, temps mort de la colonne :

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \qquad \textbf{(1)}$$

$$t_r = t_0(1 + k') \qquad \textbf{(2)}$$

Sélectivité

La sélectivité α est une grandeur qui permet de caractériser la distance qui sépare le sommet de deux pics chromatographiques consécutifs 1 et 2 :

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad \textbf{(3)}$$

Efficacité

L'efficacité d'une colonne est caractérisée par son nombre de plateaux théoriques *N*. Afin de pouvoir comparer les efficacités de séparation de colonnes de longueurs *L* différentes, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique *H* :

$$N = 16\left(\frac{t_r}{\omega}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_r}{\delta}\right)^2 \qquad \textbf{(4)}$$

$$H = \frac{L}{N} \qquad \textbf{(5)}$$

ω : largeur du pic à la base

δ : largeur du pic à mi-hauteur

Résolution

La résolution R_s mesure la séparation qu'il existe entre deux pics chromatographiques. Plus R_s est grand, meilleure est la séparation. Si les pics chromatographiques sont gaussiens, la séparation est pratiquement complète pour R_s = 1 (2 % de recouvrement entre les deux pics).

$$R_S = 2\frac{(t_{r2} - t_{r1})}{\omega 2 + \omega 1} \qquad \textbf{(6)}$$

Perte de charge

La loi de Darcy ***(7)*** exprime la perte de charge d'une colonne chromatographique, et donc sa résistance à l'écoulement. Ce paramètre est particulièrement important en chromatographie liquide.

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{d_p^{\,2}} \qquad \textbf{(7)}$$

ΔP : perte de charge (Pa)

Φ : facteur de résistance à l'écoulement

η : viscosité dynamique de la phase mobile (Pa•s)

L : longueur de la colonne (cm)

u : vitesse linéaire de la phase mobile (cm/s)

d_p : diamètre moyen des particules (cm)

c. Objectif d'une méthode chromatographique

Lorsqu'il développe une méthode, l'objectif du chromatographiste est triple : obtenir des pics chromatographiques les plus fins possible (grande efficacité), les mieux séparés possibles (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum. La notion de résolution est directement liée à celles d'efficacité et de séparation. De l'efficacité de la colonne dépend la dispersion de l'ensemble des molécules d'un soluté autour de son temps de rétention : meilleure est l'efficacité et plus fins sont les pics chromatographiques.

La qualité de la séparation dépend également des rétentions relatives des différents analytes en mélange. La résolution augmente avec la longueur de la colonne, au détriment du temps d'analyse et de l'efficacité.[9]

2. LC – CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

La chromatographie en phase liquide est utilisée dans un grand nombre de domaines analytiques, et plus particulièrement dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'environnement, de la pharmacie et de la biologie.[10] Un chromatographe en phase liquide, souvent appelé *chaîne HPLC* ; est constitué comme le montre la *Figure II-1* de quatre modules principaux : un système de pompage, un injecteur, une colonne et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs (spectrophotomètre UV-visible, spectrofluorimètre, réfractomètre différentiel, détecteur à diffusion de lumière…) mais celui qui nous intéresse est le spectromètre de masse, qui permet à la fois de caractériser et de quantifier un analyte.

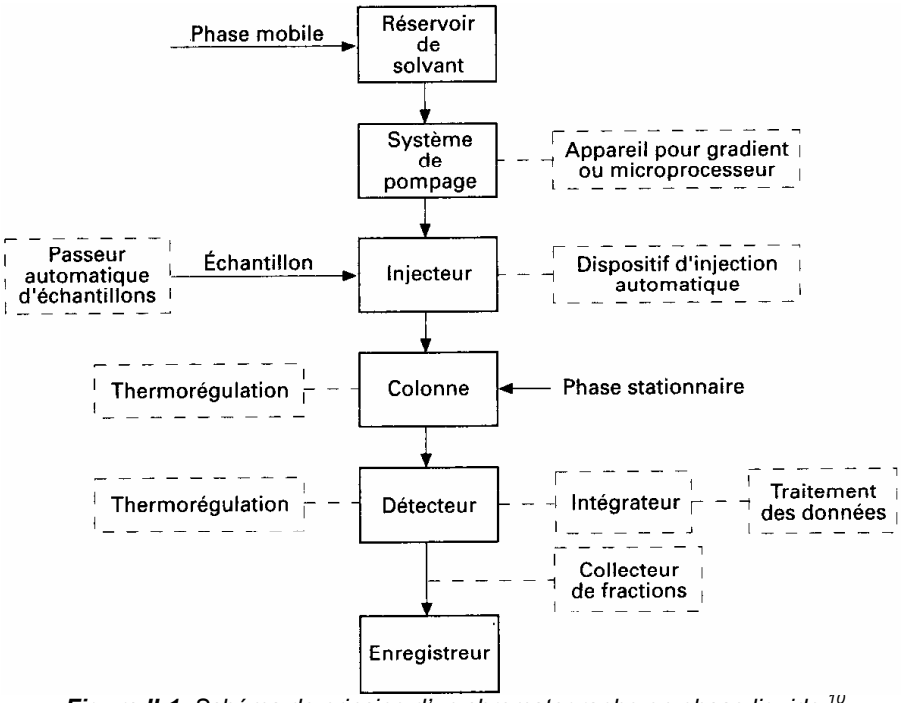


Figure II-1. *Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide.*[10]
Les éléments en trait plein sont indispensables au fonctionnement du chromatographe, alors que les éléments en pointillés concernent des modules additionnels.

2.1. Le système de pompage

Le système de pompage est la partie du chromatographe qui permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique, le système de pompage est capable de refouler le liquide jusqu'à une pression de 400 bars. En pratique, la pression de travail est généralement comprise entre 100 et 250 bars.

La plupart des constructeurs ont équipé leurs systèmes de pompage de pompes à pistons à mouvement alternatif. Ce dispositif a été choisi car il présente l'avantage d'avoir un volume de chambre faible, ce qui permet de changer facilement de solvant, et qu'il permet de réguler facilement le débit par simple changement de la fréquence du mouvement. En revanche, ce type de système nécessite de filtrer correctement les solvants d'élution pour ne pas endommager les pistons, et le pompage s'effectue par à-coups. Ce dernier point a été résolu par l'utilisation de plusieurs pistons en décalage de phase comme le montre la *Figure II-2*, et/ou par l'utilisation de systèmes d'amortissement des pulsations.

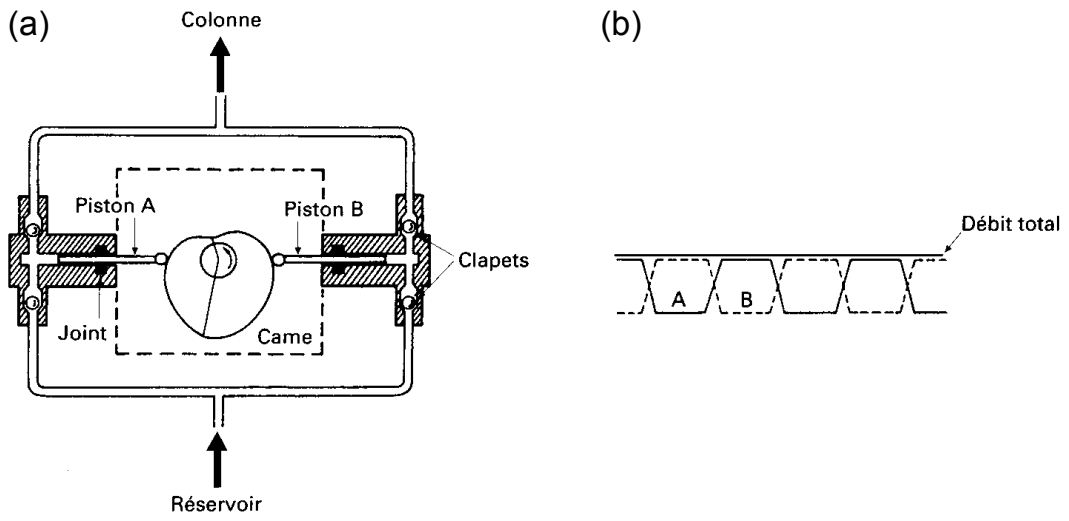


Figure II-2. *(a) Pompe à deux têtes montées en opposition de phase avec une came en forme de cardioïde. (b) Profil du débit délivré par chacun des deux pistons A et B, et du débit total.*[10]

Un système de pompage peut être utilisé soit en mode isocratique, soit en gradient d'élution.

a. Mode isocratique

Ce mode d'élution, très simple à mettre en œuvre ne nécessite pas de temps de rééquilibrage de la colonne HPLC entre deux analyses. Il consiste à faire débiter par la pompe les mêmes proportions de solvant A et B sur toute la durée de l'analyse, ou éventuellement de n'utiliser qu'un seul réservoir de solvant.

b. Gradient d'élution

Ce mode d'élution est généralement préféré pour les analyses de mélanges complexes car il permet de réduire le temps d'analyse tout en conservant une séparation satisfaisante des analytes.

Un gradient d'élution est une variation des proportions des constituants du mélange éluant. Pour appliquer un gradient d'élution, il faut au minimum deux solvants et une chambre de mélange. La chambre de mélange peut être placée avant le dispositif de pompage, on parle alors de gradient *basse pression* et les proportions des solvants sont contrôlées par l'ouverture/fermeture d'électrovannes. Dans le cas d'un gradient *haute pression* la chambre de mélange est placée après le dispositif de pompage. Le gradient basse pression est aujourd'hui celui qui est le plus utilisé par les constructeurs car il permet de s'affranchir des éventuels effets de contraction de volume ; son coût est par ailleurs inférieur.

2.2. L'injecteur

La pression en tête de colonne étant de plusieurs dizaines de bars, il n'est pas possible d'utiliser une seringue et de percer au travers d'un septum pour injecter l'échantillon comme cela se fait en chromatographie gazeuse. Il est donc indispensable d'utiliser une boucle d'échantillonnage montée sur une vanne d'injection.

Principe de fonctionnement d'une vanne d'injection

Une vanne d'injection est souvent appelée *vanne six voies*. La *Figure II-3* présente les deux temps de fonctionnement d'une vanne d'injection à boucle externe.

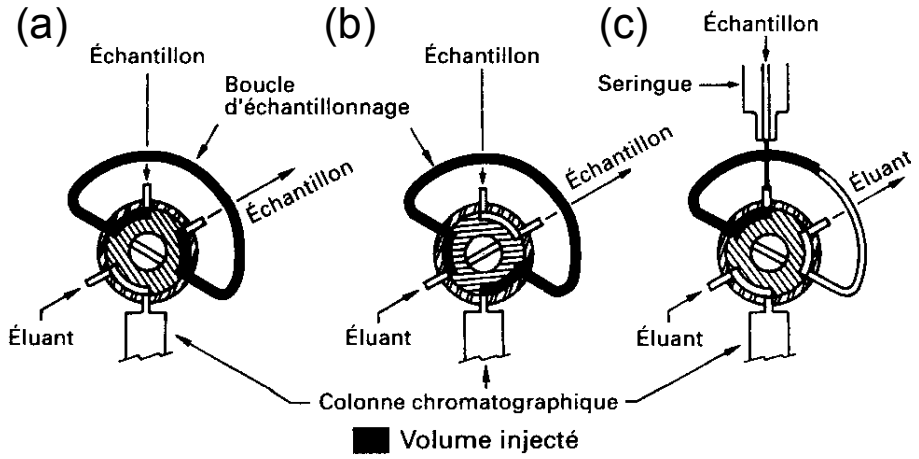


Figure II-3. *Vanne d'injection à boucle externe.*[10] *(a) Remplissage total de la boucle avec l'échantillon.*
(b) Injection du contenu de la boucle sur la colonne.
(c) Possibilité de remplissage partiel de la boucle avec l'échantillon.

Dans un premier temps, en position *Load*, la boucle d'échantillonnage est remplie à l'aide d'une seringue jusqu'à ce qu'une partie de l'échantillon déborde vers la poubelle : c'est le remplissage total. Ensuite, la vanne d'injection est basculée en position *Inject* et l'éluant issu de la pompe HPLC circule au travers de la boucle, entraînant avec lui l'échantillon dans

la colonne. Si le volume d'échantillon est insuffisant, il est possible de ne remplir que partiellement la boucle d'échantillonnage à l'aide d'une seringue graduée, mais cette méthode est moins reproductible et donc moins précise dans le cadre d'analyses quantitatives. Il est alors préférable d'adapter la taille de la boucle (de 1 à 100 µL pour de la chromatographie analytique, et au-delà pour de la chromatographie préparative) aux quantités que l'on veut injecter. Cela réduit le volume mort et améliore la résolution chromatographique.

En pratique, dans le cadre d'un couplage LC/MS, l'injecteur est toujours couplé avec un passeur d'échantillons.

2.3. La colonne

La colonne est le cœur du système : c'est en grande partie d'elle que dépend la qualité de la séparation chromatographique. Pour en optimiser les performances, il faut veiller à réduire les volumes morts au niveau des connections, de la boucle d'injection, des raccords… Pour la préserver, la tête de colonne étant généralement la partie qui se dégrade en premier, il est possible de lui adjoindre une colonne de garde ou précolonne ainsi qu'un filtre haute pression.

Une colonne HPLC est caractérisée par sa phase stationnaire, sa longueur, son diamètre et la taille de ses particules. Typiquement, une colonne HPLC a des dimensions comprises entre 5 et 30 cm pour la longueur, 1 et 4,6 mm pour le diamètre et 3 à 5 µm pour la taille des particules. Le débit de solvant est adapté en fonction du diamètre de la colonne : 20 à 100 µL/min pour une colonne de 1 mm jusqu'à 0,5 à 2 mL/min pour une colonne de 4,6 mm de diamètre. Le choix de la phase stationnaire est beaucoup plus vaste. Quelques phases stationnaires couramment utilisées en couplage avec la spectrométrie de masse sont présentées ci-après.

Les supports polymériques

Le polystyrène, des copolymères de styrène et de divinylbenzène, ou les polymétacrylates sont les polymères les plus utilisés pour fabriquer les phases stationnaires. Ils présentent l'avantage d'être stables sur une large gamme de pH (1 à 13), mais présentent une efficacité moyenne et une résistance à la pression limitée.

Les supports à base de silice

La silice vierge permet la séparation par adsorption réversible en fonction de la polarité (chromatographie de *phase normale*), mais elle se désactive en présence d'eau. A pH acide les silanols sont dissociés et peuvent se comporter comme des échangeurs de

cations. La silice présente l'avantage d'être mécaniquement résistante, mais elle craint les pH basiques et très acides.

Le grand avantage de la silice est de permettre la préparation d'un nombre important de phases stationnaires par greffage chimique sur les silanols (chromatographie de *phase inverse*). Les greffons les plus courants sont les groupements cyano, amino, diol, phényle, nitrophényle, des groupements chiraux ou échangeurs d'ions et bien évidemment les chaînes d'hydrocarbures C_2 à C_{18}. Les colonnes avec les greffons C_8 et C_{18} étant les plus utilisées. Pour augmenter la stabilité des phases greffées, les constructeurs ont développé le *end-capping* (technique qui consiste à fixer de petits greffons sur les silanols restés libres) ce qui permet d'une part d'éviter les interactions entre les analytes et les silanols libres, d'autre part de protéger la liaison Si-C qui ne résiste qu'à des pH compris entre 2,5 et 8.

Autres supports

Il existe d'autres supports qui permettent de réaliser des colonnes HPLC comme l'alumine, l'oxyde de zirconium ou le carbone graphite, mais ils demeurent moins utilisés. D'autres colonnes comme la phase HILIC ou les monolithes sont au contraire en pleine expansion.

Dans le cadre d'un couplage avec la spectrométrie de masse, on utilise généralement des colonnes polymériques, ou de phase inverse de sorte que les solvants utilisés (eau, méthanol, acétonitrile…) soient compatibles avec les sources d'ionisation.

La sortie de la colonne HPLC est reliée à la source du spectromètre de masse par un capillaire en *peek* (polymère de type plastique) ou en acier inoxydable.

2.4. Matériel utilisé

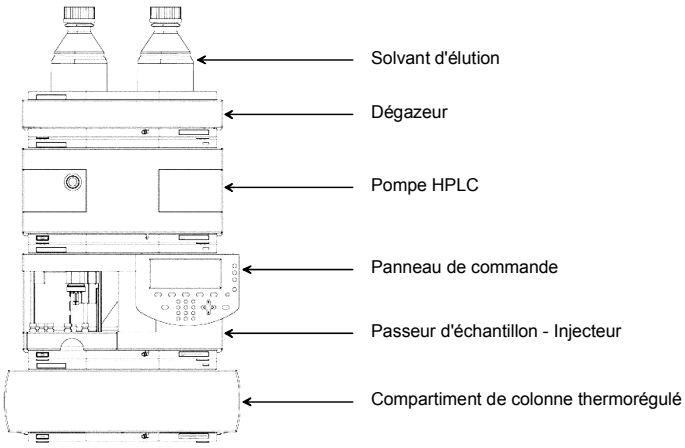


Figure II-4. *Chromatographe HPLC Agilent 1100 Series.*[11]

La *Figure II-4* représente une chaîne HPLC classiquement utilisée en couplage avec un spectromètre de masse. Cet ensemble a été utilisé en couplage avec le LTQ.

2.5. Les développements récents en HPLC

Les récentes avancées en chromatographie liquide concernent principalement le développement de méthodes plus rapides et plus résolutives que les techniques actuelles. Pour parvenir à de tels résultats, il est possible de modifier la taille des particules, la pression, la température ou plusieurs de ces paramètres en même temps.

a. UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

L'UPLC ou chromatographie liquide à ultra haute performance a été commercialisée en 2004 par la société Waters. Le principe de l'UPLC est initialement basé sur l'utilisation de *colonnes sub-2 µm*. L'utilisation de particules de petit diamètre (1,7 µm dans le cas de l'UPLC), comme le prévoit la loi de Darcy *(**7**),* requiert une très forte augmentation de la pression, d'où la nécessité d'un matériel capable de résister à des pressions de l'ordre de 1000 bars.[12]

En termes de performances, la diminution de la taille des particules entraîne une augmentation du nombre de plateaux théoriques et une diminution du temps de rétention, ce qui améliore la qualité de la séparation tout en réduisant le temps d'analyse.[12-13] Pour compenser l'augmentation de la pression, il est possible d'augmenter la température, ce qui a pour effet de diminuer la viscosité et donc la pression ; mais cela augmente également la vitesse linéaire optimale et donc le débit. Les colonnes utilisées sur ce genre de système sont généralement de faible diamètre (1 à 2,1 mm) et doivent être particulièrement résistantes à la pression.[14-15]

b. HTLC – High-Temperature Liquid Chromatography

La HTLC ou chromatographie liquide à haute température (jusqu'à 200 °C) est une autre solution envisagée pour améliorer les performances de la chromatographie liquide. Cette technique consiste à ajouter à une chaîne HPLC *classique* un module de préchauffage des solvants, un four capable de chauffer la colonne jusqu'à 200 °C et un dispositif de refroidissement du solvant en sortie de colonne.[16]

La HTLC permet de réduire l'utilisation de solvant organique : à haute température et sous pression, l'eau devient moins polaire et se comporte comme le méthanol à température ambiante.[13,16-17] En HTLC, le préchauffage des solvants permet d'obtenir un front de solvant uniforme, sans effet de bords, ce qui permet d'améliorer la forme des pics et d'augmenter la

résolution chromatographique.[16] La vitesse d'analyse peut être davantage augmentée par un gradient de température que par un gradient de solvant à haute température.[16]

Le problème majeur de cette technique réside dans la fragilité des colonnes : dans la plupart des supports, les silices peuvent se solubiliser à haute température. Il est donc nécessaire d'utiliser des supports protégés par un fort taux de greffage.[13] Les constructeurs proposent également de nouvelles phases à base de carbone graphite, de zircone ou de polymères capables de résister jusqu'à 200 °C.[18-19]

c. Nouvelles colonnes

Actuellement, les colonnes HPLC connaissent de nombreuses évolutions. La première concerne la production de colonnes avec des particules de diamètre inférieur à 2 µm comme cela a été évoqué dans le cadre de l'UPLC. De telles colonnes sont également disponibles pour une utilisation sur une chaîne HPLC classique.[20-22] Ces colonnes sont réalisées à base de silice ou de zirconium greffé, la technologie actuelle ne permettant pas de créer des particules inférieures à 3 µm pour les colonnes à base de polymères ou de carbone graphite.[13]

De nombreuses colonnes destinées à l'analyse de composés polaires ont également été développées récemment, en particulier pour le mode HILIC (*Hydrophilic Interaction Chromatography*).[13] La phase HILIC est une sorte de *phase normale aqueuse* ou *phase inverse inversée* qui permet l'utilisation de solvants aqueux (entre 10 et 20 %) avec une phase stationnaire polaire (silice, cyano, amino, diol). Ce type de support permet la rétention de composés basiques très polaires qui ne sont pas retenus en phase inverse ; il reste compatible avec la spectrométrie de masse avec environ 80 % de solvant organique dans le mélange éluant.[23]

Les colonnes monolithiques constituent un autre type de phase en plein essor. Il s'agit de colonnes à base de silice, zirconium, polymère ou silice recouverte d'oxyde de titane.[13] Du fait d'être coulées *in situ* sous forme de gel, ces phases présentent une structure continue, ce qui empêche la formation de chemins préférentiels. Dans ces colonnes, la phase mobile circule au travers d'un réseau poreux constitué de macropores et de mésopores.[12] La très grande porosité de ces colonnes leur confère une résistance à l'écoulement très inférieure aux colonnes classiques, ce qui permet de les utiliser avec des débits plus élevés. Ce type de colonne, commercialisé depuis peu devrait être amené à se développer rapidement et remplacer les colonnes fabriquées par remplissage pour un grand nombre d'applications.

3. GC – CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

La chromatographie en phase gazeuse est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Un chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs (FID, ECD, TCD…)* mais le spectromètre de masse (auquel une partie de cette thèse est consacrée) est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par de la chromatographie.

3.1. L'injecteur

L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur, classiquement de l'hélium, constitue la phase dite *mobile*. Son rôle consiste à véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne analytique. La viscosité d'un gaz variant avec la température, la plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit. Ce dernier ajuste la pression du gaz en fonction de la température, de manière à ce que le débit gazeux dans la colonne soit constant, ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe.[9]

a. Injection avec division de flux

Il existe deux familles d'injecteurs. La première regroupe les injecteurs dits *à fuite*. Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en *split* ou injection avec *division de flux*, il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne ce qui évite de saturer la phase stationnaire. Très simple à mettre en œuvre, l'injection en mode *split* présente néanmoins un inconvénient : des problèmes de discrimination sont fréquemment rencontrés lorsque la solution à analyser contient des composés dont les volatilités sont très hétérogènes (les produits *légers* auront tendance à s'échapper par la fuite alors que les produits *lourds*, mal vaporisés, resteront majoritairement dans l'injecteur). Plus rarement utilisé, l'injecteur *à aiguille de verre* ou injecteur *de Ross* permet d'injecter de grands volumes. Il est composé d'une aiguille de verre d'environ 10 cm de long, placée dans un tube muni d'une vanne de fuite et percé de deux orifices latéraux, l'un pour l'arrivée du gaz vecteur, l'autre pour

* FID : détecteur à ionisation de flamme (*Flame Ionization Detector*). ECD : détecteur à absorption électronique (*Electron Capture Detector*). TCD : détecteur à conductivité thermique (*Thermal Conductivity Detector*).

l'injection de l'échantillon. L'échantillon est déposé sur l'aiguille ; le courant de gaz vecteur permet l'évaporation du solvant qui est éliminé par la fuite. L'aiguille est alors amenée au niveau de la colonne capillaire où l'échantillon est vaporisé. Ce mode d'injection est particulièrement utilisé pour l'analyse de traces en environnement. Il permet d'injecter de grands volumes d'échantillon et de réaliser des introductions successives pour concentrer l'analyte dans l'aiguille. Il ne permet cependant pas l'analyse de produits très volatils, ces derniers étant éliminés avec le solvant.[9]

b. Injection sans division de flux

La seconde famille regroupe les injecteurs *sans fuite*. L'injection *splitless*, ou *sans division de flux*, est utilisée pour introduire des analytes en solution diluée. L'électrovanne est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière à ce qu'une quantité maximum d'analyte pénètre dans la colonne. Elle est ensuite ouverte pour purger l'injecteur d'éventuels résidus. L'échantillon est injecté à une température telle que solvant et solutés sont instantanément vaporisés à l'entrée de la colonne. Pendant l'injection, la température du four est inférieure de 20 à 30 °C à la température d'ébullition du solvant afin de condenser ce dernier en tête de colonne et de piéger les molécules. Dans un premier temps, le solvant joue le rôle de phase stationnaire vis-à-vis des différents constituants du mélange. Sa polarité doit donc être compatible avec celle de la phase stationnaire de manière à ce que le solvant se répartisse de façon homogène en tête de colonne. En raison de son pouvoir de rétention important, cette phase condensée permet de ralentir les molécules volatiles jusqu'à ce qu'elle soit entraînée par le gaz vecteur. Plus performante que le *splitless* en terme de répétabilité et de sensibilité, l'injection *on column* consiste à introduire directement l'analyte en solution dans la colonne ou dans une précolonne dont la fonction est de permettre l'injection d'un grand volume d'échantillon et/ou de protéger la colonne analytique d'éventuels polluants matriciels. Longue de 1 à 10 mètres, cette précolonne est chimiquement neutre ; elle possède un diamètre interne suffisamment important pour que l'aiguille de la seringue y pénètre. La solution étant directement injectée dans la précolonne, 100 % de l'échantillon est effectivement introduit. Ce type d'injection permet l'introduction de volumes d'échantillon dix fois supérieurs à ceux injectés en *split* ou en *splitless* (jusqu'à 10 µL en *on column*). L'injection s'opère le plus souvent *à froid* : l'échantillon est introduit à l'état liquide en tête de colonne avant d'être rapidement vaporisé et condensé. *À chaud*, en effet, l'expansion brutale du volume de la solution injectée entraînerait dans la colonne une surpression telle que le gaz refluerait vers l'injecteur.[9]

3.2. Le four et la colonne capillaire

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique : la colonne analytique. De nos jours, les colonnes utilisées en GC/MS sont des colonnes dites *capillaires*. La *Figure II-5* représente une coupe de colonne capillaire ; la colonne est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un film chimique nommé *phase stationnaire* ; la paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide qui confère souplesse et robustesse à la colonne.

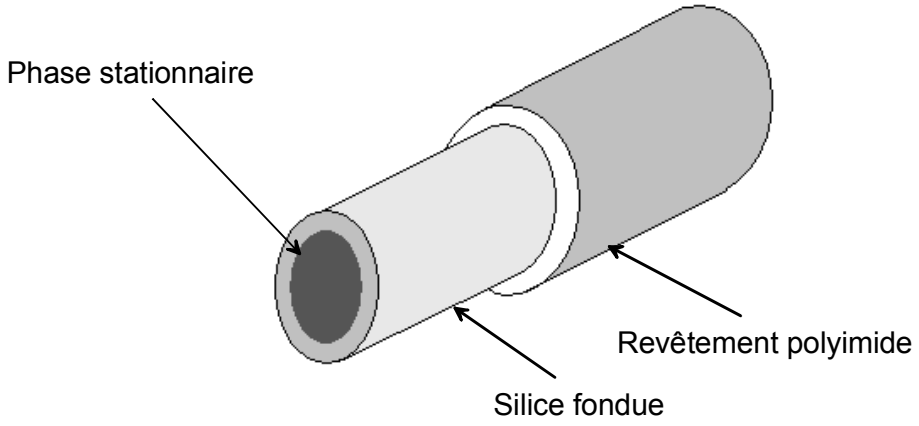


Figure II-5. *Représentation schématique d'une colonne capillaire.*[9]

La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. Si ces dernières sont peu polaires (chaînes alcanes ou groupements phényles, par exemple), la colonne est dite *peu polaire*. Si, au contraire, la phase stationnaire est constituée de composés polaires tels que, par exemple, des polyéthylènes glycols, la colonne est dite *polaire*. Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire ; leurs différences de propriétés physico-chimiques leur confèrent des vitesses d'élution différentes et ils sont donc séparés en fonction du temps. Confronté à un mélange mixte, on privilégie souvent le choix d'une colonne peu polaire, les phases stationnaires peu polaires étant généralement plus robustes et thermiquement beaucoup plus stables que leurs homologues polaires.

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques : sa longueur (de 10 à 100 m), son diamètre interne (de 0,1 à 0,5 mm), l'épaisseur de sa phase stationnaire (de 0,1 à 5 µm) ; chacun exerçant une influence déterminante sur la qualité de la séparation.

Une colonne de 15 m suffit à séparer des mélanges simples alors que l'analyse d'échantillons complexes nécessite une colonne de longueur supérieure à 30 m. La plupart des applications de GC/MS utilisent des colonnes de 25 à 30 m.

Augmenter l'épaisseur de la phase stationnaire augmente les interactions entre celle-ci et les solutés, ce qui améliore la séparation chromatographique mais augmente la durée de l'élution, donc de l'analyse. On choisit généralement une épaisseur de film importante lorsque l'on souhaite séparer des composés très volatils. L'augmentation du diamètre interne permet de raccourcir les temps d'analyse mais se traduit par une diminution de l'efficacité. Pour travailler en *fast GC*, c'est-à-dire lorsque l'on souhaite des temps d'analyse très courts (quelques secondes à quelques minutes), il faut choisir une colonne courte avec un film de faible épaisseur (0,1 µm, par exemple) ; il convient alors d'utiliser une colonne de faible diamètre interne pour ne pas trop perdre en efficacité.[24]

La colonne capillaire est placée dans un four car les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont fonction de la température. Augmenter cette dernière favorise l'élution des composés et diminue ainsi les temps d'analyse. La plupart des utilisateurs travaillent en programmation de température, il est très fréquent que des méthodes, dites de *screening* utilisent une programmation de température allant de 40 à 350 °C pour permettre la détection de toutes sortes de composés aux propriétés physico-chimiques variées.

Il convient de préciser que, dans le contexte du couplage GC/MS, nombreux sont les utilisateurs qui privilégient le temps d'analyse au détriment de la séparation chromatographique car les co-élutions partielles de pics ne posent pas de problème, chaque pic chromatographique étant intégré à partir du courant d'un ion caractéristique de l'analyte. Le changement de colonne capillaire nécessitant généralement la mise à pression atmosphérique du spectromètre et donc l'arrêt du système de pompage, les utilisateurs de GC/MS changent rarement de type de colonne capillaire. Aujourd'hui, la colonne de référence est, pour une large majorité, une colonne peu polaire (greffée à 5 % avec des groupes phényles), longue de 30 m, de diamètre interne 0,25 mm et d'épaisseur de phase stationnaire 0,25 µm. L'hélium est le seul gaz vecteur utilisé en GC/MS car les ions $He^{+\bullet}$ résultant de l'ionisation électronique n'interfèrent pas avec ceux de l'analyte en raison de leur faible rapport *m/z* ; l'hydrogène est proscrit en raison de la présence d'un filament chauffé dans la source. Le débit d'hélium est classiquement de 1 mL/min.

La colonne capillaire sort du chromatographe et entre dans le spectromètre de masse via une *ligne de transfert*. Il s'agit d'un cylindre intensément chauffé (environ 300 °C) de manière à éviter que les molécules éluées ne se recondensent entre les deux appareils. La *Figure II-6* présente le schéma d'un chromatographe en phase gazeuse destiné à être couplé avec un spectromètre de masse.

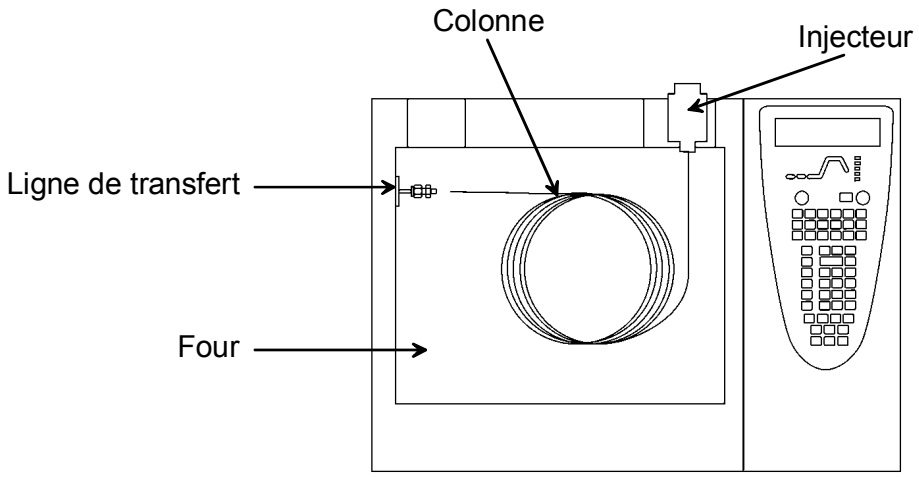


Figure II-6. *Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.*[25]

4. RÉFÉRENCES

1. **Tswett M.**
Über die nächsten Säurederivate der Chlorophylline. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1908**, 41(1), pp. 1352-1354.

2. **Kuhn R., Lederer E.**
Zerlegung des Carotins in seine Komponenten. (Über das Vitamin des Wachstums, I. Mitteil). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1931**, 64(6), pp. 1349-1357.

3. **Kuhn R., Winterstein A., Lederer E.**
Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, **1931**, 197, pp. 141-160.

4. **Martin A.J.P., Synge R.L.M.**
A new form of chromatogram employing two liquide phases - 1. A therory of chromatography - 2. Application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins. *Biochemistry Journal*, **1941**, 35, pp. 1358-1368.

5. **Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P.**
Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse. Ed. Masson, Paris, **1995**.

6. **Rosset R., Caude M., Jardy A.**
Chromatographies en Phase Liquide et Supercritique. Ed. Masson, Paris, **1991**.

7. **Richardin P.**
La chromatographie. http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chromato.htm.

8. **Caude M., Jardy A.**
Chromatographie en phase liquide – Théorie et méthodes de séparation. In *Techniques de l'Ingénieur*, **1994**, P1 456.

9. **Bouchonnet S., Libong D.**
Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *L'Actualité Chimique*, **2004**, 275, pp. 7-14.

10. **Caude M., Jardy A.**
Chromatographie en phase liquide – Appareillage et applications. In *Techniques de l'Ingénieur*, **1995**, P1 456.

11. **Agilent.**
Agilent 1100 Series Binary Pump - Reference Manual. Agilent Technologies, Santa Clara, CA, **2004**, 290 p.

12. **Rocca J.L.**
Évolution des Techniques Séparatives vers les Temps d'Analyse Plus Courts. Conférence au Club Lyonnais de Chromatographie de l'AFSEP, 9 février **2006**.

13. **Tchapla A.**
Les Colonnes HPLC : Nouvelles Perspectives. Quelles Solutions Technologiques pour l'Avenir ? Conférence à Forum Labo & Forum Biotech, **2006**.

14. **Wyndham K.D., O'Gara J.E., Walter T.H., Glose K.H., Lawrence N.L., Alden B.A., Izzo G.S., Hudalla C.J., Iraneta P.C.**
Characterization and evaluation of C_{18} HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75(24), pp. 6781-6788.

15. **Waters.**
Acquity UPLC Columns. Waters Corporation, Milford, MA, **2006**, 16 p.

16. **Marin S.J., Jones B., Felix D., Clark J.**
Replacing solvent gradient HPLC with temperature programmed HPLC. Pittcon **2003**.

17. **De Boer A.R., Alcaide-Hidalgo J.M., Krabbe J.G., Kolkman J., Van Emde Boas C.N., Niessen W.M.A., Lingeman H., Irth H.**
High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77(24), pp. 7894-7900.

18. **Yan B., Zhao J., Brown J.S., Blackwell J., Carr P.W.**
High temperature ultrafast liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72(6), pp. 1253-1262.

19. **Guillarme D., Heinisch S.**
Detection modes with high temperature liquid chromatography – A review. *Separation and Purification Reviews*, **2005**, 34(2), pp. 181-216.

20. Agilent.
Agilent Zorbax Column Selection Guide for HPLC. Agilent Technologies Inc., **2004**.

21. Thermo Electron.
Hypersil Gold HPLC Columns - Technical Guide. Vol. 2, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, **2005**, 20 p.

22. Guillarme D.
Quoi de Neuf à la Pittcon en 2006 ? Conférence au Club Lyonnais de Chromatographie de l'AFSEP, 11 mai **2006**.

23. Carles L.
Les Colonnes non Greffées à Base de Silice ou à Base de Particule Hybride BEH. Conférence au Club Lyonnais de Chromatographie de l'AFSEP, 11 mai **2006**.

24. Rouessac F., Rouessac A.
Analyse Chimique – Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes. 5ème Ed., Dunod, **2000**.

25. Thermo Electron.
PolarisQ – Hardware Manual. Rev. D, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, **2005**.

III. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

1. GÉNÉRALITÉS

Aujourd'hui de nombreux laboratoires de chimie analytique sont équipés de spectromètres de masse couplés à de la chromatographie en phase liquide ou gazeuse (LC/MS pour *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* ou GC/MS pour *Gas Chromatography Mass Spectrometry*). Ces appareils trouvent des applications dans des domaines aussi variés que l'industrie agroalimentaire, l'environnement, la médecine, la pharmacologie ou le contrôle antidopage.[1-2]

Il existe de nombreux types de spectromètres de masse et seuls les principes de fonctionnement de ceux utilisés au cours de cette thèse sont détaillés dans ce mémoire. Il s'agit d'analyseurs quadripolaires : quadripôles et pièges à ions.

1.1. Qu'est-ce qu'un spectromètre de masse ?

Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de caractériser des analytes. Par la mesure des rapports masse sur charge (*m/z*) de molécules ionisées et de leurs produits de fragmentation. La spectrométrie de masse peut apporter des informations relatives à la masse moléculaire d'un composé et des informations structurales. Elle peut également permettre une mesure de la quantité.

Tous les spectromètres de masse possèdent trois éléments en commun : une source, un analyseur et un détecteur (*Figure III-1*).[1,3] Les molécules sont introduites dans la source où sont formés les ions. Ces derniers sont guidés vers l'analyseur où ils sont séparés, puis vers le détecteur. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un logiciel qui permet également d'assurer le pilotage du spectromètre.

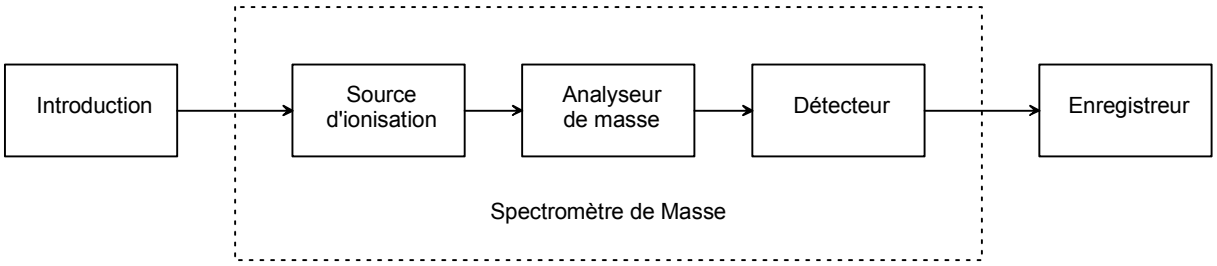


Figure III-1. *Schéma de principe d'un spectromètre de masse.*

1.2. Historique

La découverte de la spectrométrie de masse remonte au début du XXème siècle.[4] Après les expériences de Goldstein qui en 1886 découvre les ions positifs, Joseph John Thomson (Prix Nobel de Physique en 1906 pour ses travaux sur la conduction de l'électricité par les gaz) obtient en 1912 les premiers spectres de masse de gaz (N_2, O_2, CO...). Il observe ensuite des ions négatifs, des ions multichargés et des ions métastables.[5] En 1918, Dempster construit un spectromètre de masse à secteur magnétique, mais il faut attendre 1942 pour voir la commercialisation du premier appareil.

Très vite se développent de nouvelles techniques d'ionisation (SIMS en 1949, ionisation électronique en couplage GC en1957, ionisation chimique en 1967, thermospray en 1980, FAB en 1981, MALDI en 1985, ESI en 1988...) et de détection (TOF en 1948, ICR en 1949, filtre quadripolaire en 1953). Le premier piège à ions est commercialisé en 1984).[5-6]

Depuis sa création et jusqu'en 1942, la spectrométrie de masse a été essentiellement utilisée dans le cadre de l'analyse élémentaire, puis elle a servi à l'analyse de composés organiques jusque vers 1980. Depuis plus de 25 ans, elle s'est adaptée aux exigences des chimistes et des biologistes en s'orientant vers l'analyse de mélanges de plus en plus complexes et de forte polarité ainsi qu'en permettant la détermination de masses moléculaires de plus en plus élevées.[7]

1.3. Principe général de fonctionnement d'un spectromètre de masse

a. La source

La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites, le rôle de la source étant de volatiliser et d'ioniser. La nature de la source utilisée dépend des caractéristiques physico-chimiques de la molécule à analyser. On peut ainsi utiliser une source d'ionisation-désorption lorsque l'analyte est un solide, une source d'ionisation-désolvatation lorsqu'il s'agit d'un liquide, ou une source d'ionisation électronique ou chimique dans le cas d'un couplage avec un chromatographe gazeux, où les composés élués parviennent au spectromètre à l'état gazeux.[1]

Les sources d'ions peuvent se classer en sources d'ionisation *dure* ou d'ionisation *douce*. Les ionisations dures engendrent souvent des ions moléculaires à nombre impair d'électrons qui se fragmentent beaucoup, parfois même totalement, avant leur sortie de la source. Si leur durée de vie est suffisante pour qu'ils sortent intacts de la source mais qu'ils se fragmentent avant d'atteindre le détecteur, ils sont qualifiés de *métastables*. Leurs fragments peuvent être analysés et donnent des informations structurales.

Les ionisations douces engendrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons qui sont relativement stables, avec des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur et parvenir au détecteur. Ce type d'ionisation produit peu ou pas de fragments.[8]

Les principales sources d'ionisation sont les suivantes : ICP (*Inductively Coupled Plasma*) et EI (*Electron Ionization*) pour les sources *dures* ; APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*), APPI (*Atmospheric Pressure PhotoIonization*), CI (*Chemical Ionization*), FAB (*Fast Atom Bombardment*), LSI (*Liquid Secondary Ionization*), SIMS (*Secondary Ions Mass Spectrometry*) et LD (*Laser Desorption*) pour les sources *assez douces* ; MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) et ESI (*ElectroSpray Ionization*) pour les sources *douces*. Cette liste, non exhaustive, permet d'avoir un aperçu de la grande diversité des méthodes d'ionisation qui ont été développées pour satisfaire à tous types d'analyses.

b. L'analyseur

L'analyseur est la partie du spectromètre qui sépare les ions en fonction de leur rapport *m/z*. Il y règne un vide tel que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur. La source est généralement reliée à l'analyseur par l'intermédiaire d'une interface. Cette interface est composée de champs électrostatiques (lentilles et multipôles) qui permettent d'extraire les ions de la source et de les focaliser vers l'entrée de l'analyseur. Les champs électrostatiques appliqués peuvent être de l'ordre de quelques volts (quadripôles, pièges à ions), ou de plusieurs dizaines de kilovolts (secteurs magnétiques, temps de vol). Le rôle des lentilles est également de créer un gradient de vide entre les différentes parties du spectromètre.

Lorsque deux analyseurs sont couplés pour agir de façon séquentielle, on parle de spectrométrie de masse à deux dimensions : MS^2, ou *spectrométrie de masse en tandem*. Un protocole de MS^2 comporte trois étapes : *(i)* isolation d'un ion caractéristique de l'analyte dit ion *précurseur*, *(ii)* fragmentation de cet ion par collisions dans un gaz inerte et *(iii)* détection des ions fragments obtenus. Ces opérations peuvent être renouvelées plusieurs fois, ce qui permet de faire de la MS^n, un outil très puissant pour des études structurales. Les trois étapes peuvent être séparées dans l'espace (cas d'un triple quadripôle) ou dans le temps (cas d'un piège à ions). Les énergies de collision mises en œuvre en MS^2 dépendent du type d'analyseur utilisé et les schémas de fragmentation dépendent de l'énergie appliquée.[8]

c. Le détecteur

Le rôle du détecteur est double : détecter les ions proportionnellement à leur nombre et amplifier le courant correspondant (de l'ordre de 10^{-12} ampère) pour le rendre détectable par l'électronique du système. Les principaux détecteurs que l'on peut rencontrer sont les suivants : multiplicateur d'électrons, multiplicateur de photons, *channeltron* et galette micro-canaux (ou MCP pour *Micro-Channel Plate*).

2. SOURCES D'IONISATION

La *Figure III-2* représente les domaines d'application des principales sources utilisées en couplage LC/MS et GC/MS. Ce sont les propriétés de l'analyte qui conduisent au choix de la source. Les sources EI et CI sont utilisées en couplage avec la chromatographie gazeuse, alors que les sources ESI, APCI et APPI sont utilisées en couplage avec la chromatographie liquide.

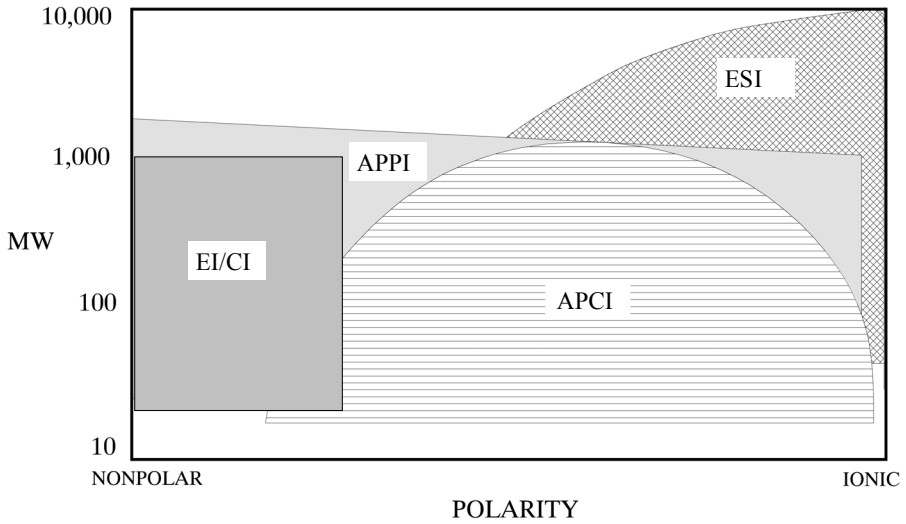


Figure III-2. *Domaine d'utilisation des principales sources utilisées en couplage LC/MS et GC/MS.*[9-10]

Les principes de fonctionnement des sources ESI, APCI et EI, qui ont été utilisées au cours de cette thèse, sont détaillés ci-dessous.

2.1. ESI – Ionisation par électronébullisation

a. Généralités

Le premier couplage entre une source ESI (*ElectroSpray Ionization*) et un spectromètre de masse, un quadripôle, est décrit par Yamashita et Fenn en 1984. Avec cet appareil, ils démontrent qu'il est possible d'obtenir des ions non fragmentés à partir de molécules non volatiles.[11-12] Il faut attendre 1989 pour que soit commercialisé le premier spectromètre de masse équipé d'une source ESI. En 2002, Fenn est récompensé par le Prix Nobel de Chimie pour ses travaux sur le développement de méthodes de d'ionisation douce pour l'analyse par spectrométrie de masse des macromolécules biologiques. Les récents développements relatifs à l'ESI concernent principalement la création de sources NSI (*NanoSpray Ionization*), plus adaptées à l'étude des protéines en raison de la faible quantité d'échantillon généralement disponible.[13-16]

L'ionisation par électronébullisation ou ESI est une méthode d'ionisation douce qui produit des ions en phase gazeuse à partir d'ions préformés en solution.[17-19] Les ions préformés peuvent également être des adduits avec des ions, Na^+ ou NH_4^+ par exemple. Cette méthode d'ionisation a rendu possible l'analyse par spectrométrie de masse d'un grand nombre d'échantillons, en particulier les composés thermosensibles et les macromolécules. Elle est particulièrement adaptée à l'analyse des molécules polaires comme les médicaments et leurs métabolites, les peptides, les protéines ou encore certains polymères industriels.

b. Description de la source

La *Figure III-3* représente la source ESI qui a été majoritairement utilisée au cours de cette thèse. Cette source est composée de la sonde ESI à pression atmosphérique (décrite dans le paragraphe relatif à la formation des ions) et de l'interface API (*Atmospheric Pressure Ionization*) sous vide.

La source ESI permet la formation des ions par un processus de désolvatation-ionisation sous l'action d'un champ électrique intense à pression atmosphérique. Les ions formés sont ensuite dirigés vers l'entrée de l'analyseur *via* l'interface par un potentiel électrique et un gradient de vide croissant.

c. Formation des ions

Le processus de formation des ions désolvatés se déroule à pression atmosphérique en trois étapes : *(i)* production de gouttelettes chargées, *(ii)* fission des gouttelettes chargées en *gouttelettes filles* et *(iii)* émission d'ions désolvatés en phase gazeuse.[20-22]

(i) – Production de gouttelettes chargées

L'application d'un potentiel électrique entre la pointe d'un capillaire métallique ***(B)*** par lequel l'échantillon en solution est introduit ***(A)*** et le cône d'échantillonnage ***(G)*** qui sert de contre électrode permet la formation de fines gouttelettes chargées ***(D)***. Le potentiel appliqué, de l'ordre de 3 à 5 kV, peut être positif ou négatif selon la polarité des ions d'intérêt. Comme le montre la *Figure III-4*, il se forme un *cône de Taylor* à l'extrémité du capillaire : il s'agit d'un cône allongé de liquide qui éclate en un spray de fines gouttelettes chargées en surface.[17,23-27] Lorsque le débit de liquide est trop important, ce qui est le cas en couplage avec la chromatographie liquide, la formation des gouttelettes est assistée par un courant d'azote coaxial appelé *gaz gaine* ***(C)***. La source ESI utilisée peut désolvater des débits allant de 3 µL/min en infusion à 1,5 mL/min en couplage.

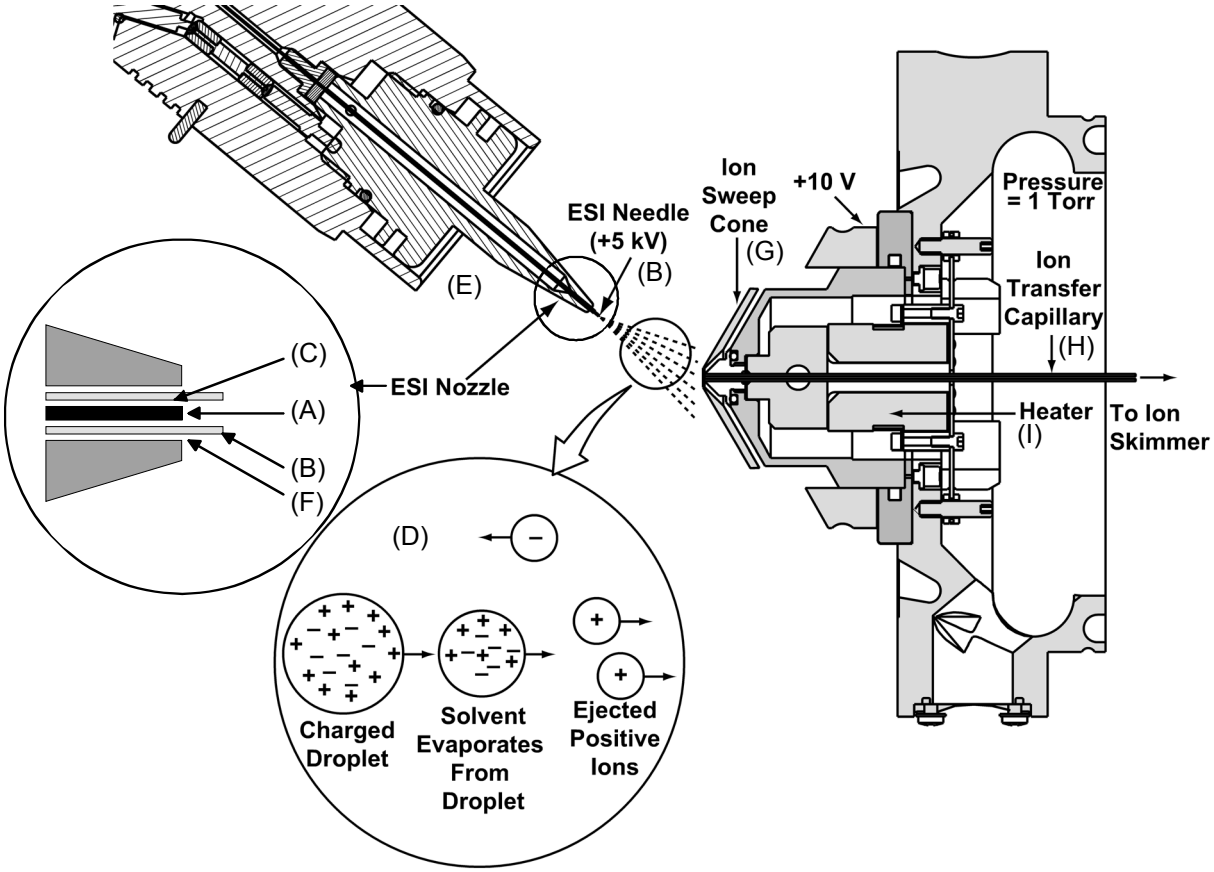


Figure III-3. *Source Ion Max™ équipée de la sonde ESI et mécanisme d'ionisation-désolvatation.*[9]

A. Capillaire de silice fondue par lequel l'échantillon est introduit
B. Capillaire métallique sur lequel est appliquée la haute tension
C. Gaz de nébulisation (azote) ou *Sheath gas* qui assiste la formation des gouttelettes
D. Fines gouttelettes produites par la source ESI
E. Gaz auxiliaire (azote) ou *Auxiliary gas* qui aide à la désolvatation des gouttelettes
F. Liquide *gaine* ou *Sheath liquid* permettant de faire de la dérivation post-colonne
G. Cône échantillonneur protégeant l'entrée du capillaire de transfert
H. Capillaire de transfert conduisant les ions formés jusqu'à l'interface
I. Élément chauffant contribuant à la désolvatation des ions

(ii) – Fission des gouttelettes chargées en gouttelettes filles

L'évaporation du solvant des *gouttelettes mères* formées à la pointe du cône de Taylor, liée à l'utilisation d'un gaz de séchage ***(E)*** ou à une augmentation de la température ***(I)***, induit une augmentation de la densité de charge à la surface du liquide. A la *limite de stabilité de Rayleigh*,[28] définie par l'équation ***(1)***, la répulsion coulombienne est plus forte que la tension de surface du liquide et la *gouttelette mère* explose en une multitude de *gouttelettes filles* : ce phénomène est connu sous le nom d'*explosion coulombienne*.

$$Q^2 = 64\pi^2\varepsilon_0\gamma R_R^{\ 3} \qquad (1)$$

Q est la charge de la gouttelette

ε_0 est la permittivité du vide

γ est la tension de surface du liquide

R_R est la valeur critique du rayon de Rayleigh

Les *gouttelettes filles* ainsi formées, de tailles hétérogènes, possèdent toutes une densité de charge plus élevée que la *gouttelette mère*. De ce fait, le phénomène d'explosion coulombienne se poursuit sur plusieurs *générations* de *gouttelettes filles*.[29-34]

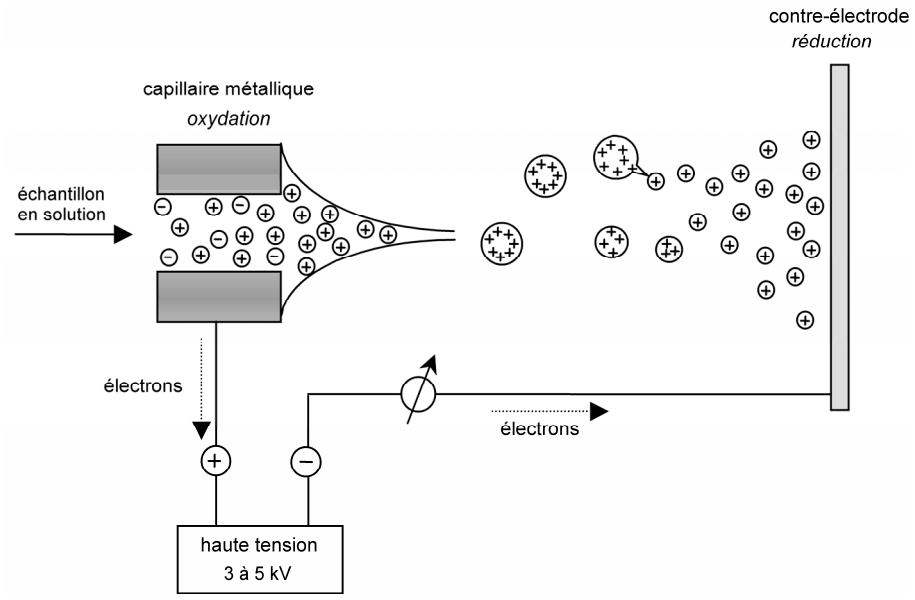


Figure III-4. *Formation de gouttelettes chargées par ESI en mode positif.*[22]

(iii) – Émission d'ions désolvatés en phase gazeuse

Il existe principalement deux théories, aujourd'hui encore assez controversées, pour décrire le processus d'ionisation-désolvatation par électronébullisation : le modèle de Dole et le modèle d'Iribarne et Thomson.

Le modèle de Dole : modèle de la charge résiduelle[35]

Dans le modèle de la charge résiduelle, proposé en 1968, Dole considère que l'évaporation du solvant et le processus d'explosions coulombiennes se répète jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un seul ion par gouttelette et que des ions *nus*, individuellement chargés, soient formés, comme le montre la *Figure III-5*.

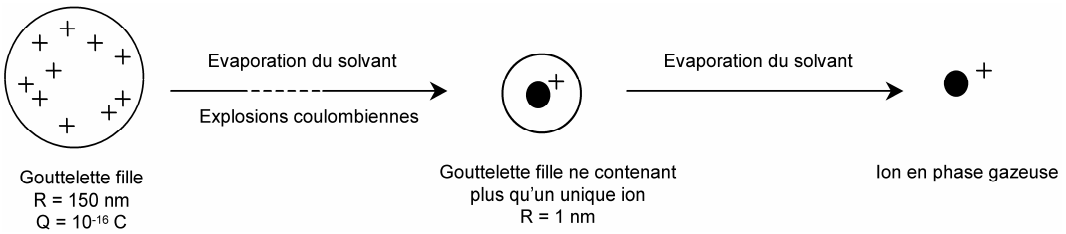


Figure III-5. *Émission des ions en phase gazeuse lors du processus d'ionisation-désolvatation Modèle de Dole.*[29,36]

Le modèle d'Iribarne et Thomson : modèle de l'évaporation ionique[37-38]

Selon ce modèle, proposé en 1976, les gouttelettes ayant un rayon inférieur à 10 nm peuvent, comme le montre la *Figure III-6*, directement émettre des ions à l'état gazeux. L'état de charge de l'ion dépend du nombre de charges qui ont été transférées depuis la surface de la gouttelette jusqu'à l'ion pendant la désolvatation.

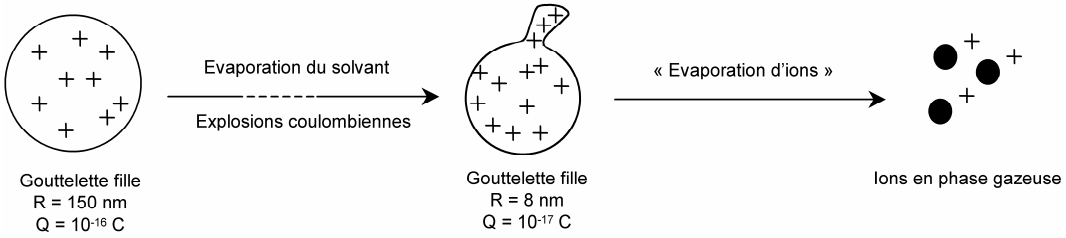


Figure III-6. *Émission des ions en phase gazeuse lors du processus d'ionisation-désolvatation Modèle d'Iribarne et Thomson.*[29,36]

Le processus de formation des ions en phase gazeuse est toujours en cours de débat, et bien que le modèle de l'évaporation ionique semble être le plus reconnu pour les petites molécules,[33,39-41] un mécanisme faisant intervenir le modèle de la charge résiduelle pourrait intervenir dans le processus d'ionisation-désolvatation des macromolécules.[22,27,42]

(iv) – Transfert des ions vers l'interface

Les ions formés sont dirigés vers l'interface API qui est composée du cône échantillonneur ***(G)***, du capillaire de transfert ***(H)*** et de son élément chauffant ***(I)***. Le cône échantillonneur agit comme une barrière physique et augmente la robustesse du spectromètre de masse en protégeant l'ouverture du capillaire de transfert. Cela implique une légère perte en sensibilité qui est compensée par une meilleure stabilité de l'appareil. Le capillaire de transfert peut être chauffé entre 250 et 450 °C. Son rôle est de permettre une bonne désolvatation des ions et de conduire ces derniers à l'entrée de l'interface. Le vide

présent à ce niveau de la source (environ 1 mbar) a également pour rôle de pomper les molécules neutres pour éviter les interférences.

d. Avantages et inconvénients de la source ESI

La source ESI offre les avantages énumérés ci-dessous :

- analytes introduits en solution, ce qui favorise le couplage avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire
- ionisation très douce, ce qui permet d'observer des molécules intactes, et permet d'étudier des interactions non covalentes
- bonne sensibilité
- possibilité de former des ions multichargés, ce qui permet l'analyse de molécules de très haute masse moléculaire
- meilleure technique d'ionisation pour les molécules qui contiennent des groupements polaires

Le principal inconvénient d'une source ESI réside dans les phénomènes de suppression ionique liés à la présence d'autres composés (et plus particulièrement de sels) en solution. Ces phénomènes se traduisent par une diminution notable de la réponse chromatographique de l'analyte considéré.

2.2. APCI – Ionisation chimique à pression atmosphérique

a. Généralités

L'APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) est également considérée comme une source d'ionisation douce, bien qu'elle ne le soit pas autant que l'ESI. L'APCI permet d'ioniser des analytes apolaires ou de faible polarité présentant une certaine volatilité avec une masse moléculaire relativement faible (jusqu'à 2000 u).[9,43]

Il est possible d'utiliser la source APCI en mode positif ou négatif. Pour la plupart des molécules, les meilleurs résultats sont obtenus en ionisation positive. Cependant, dans le cas des acides carboxyliques et des alcools avec un proton acide, l'ionisation négative engendre un courant ionique plus élevé, ce qui est très avantageux dans la mesure où le bruit chimique est généralement moindre qu'en mode positif.

b. Description de la source

La *Figure III-7* présente la source APCI utilisée au cours de cette thèse, source composée d'une sonde APCI à pression atmosphérique et d'une interface API sous un vide.

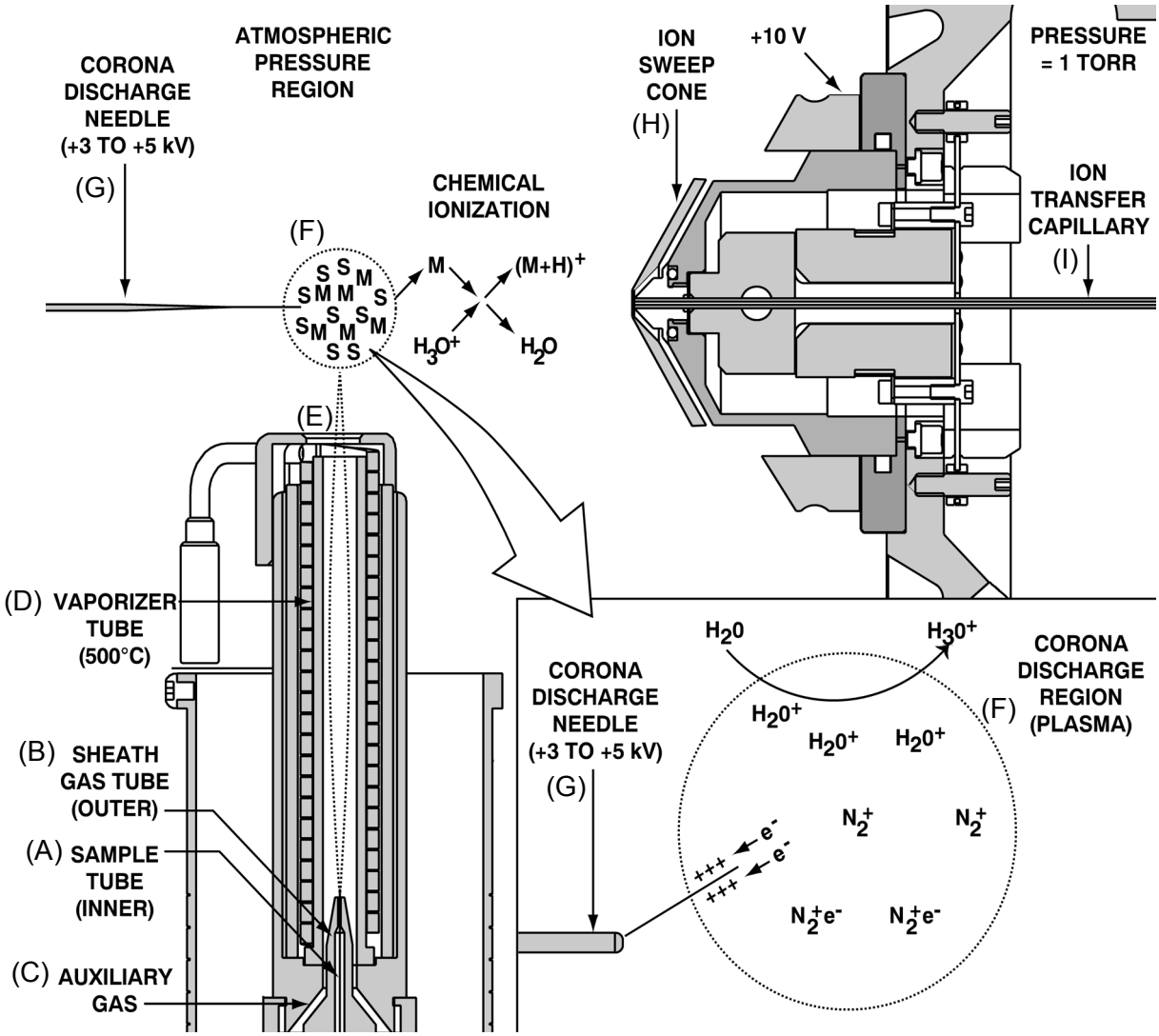


Figure III-7. *Source Ion Max™ équipée de la sonde APCI et mécanisme d'ionisation chimique.*[44]

A. Capillaire de silice fondue par lequel l'échantillon est introduit
B. Gaz gaine ou *Sheath gas* qui assiste la nébulisation
C. Gaz auxiliaire ou *Auxiliary gas* qui aide à l'évaporation du solvant
D. Tube de vaporisation en céramique où le mélange solvant + analytes passe en phase vapeur
E. Solvant + analytes en phase vapeur
F. Plasma formé suite à la décharge corona
G. Aiguille métallique qui sert à produire la décharge corona
H. Cône d'échantillonnage qui protège l'entrée du capillaire de transfert
I. Capillaire de transfert qui conduit les ions formés jusqu'à l'interface

La source APCI permet la formation des ions au moyen d'une décharge corona dans un plasma à pression atmosphérique. Une succession de réactions chimiques entre des ions formés à partir du solvant et les analytes conduit à la formation d'ions analytes. Les ions formés sont ensuite dirigés par un potentiel électrique vers l'entrée de l'analyseur *via* l'interface.

c. Formation des ions

En APCI, les gouttelettes sont formées à la sortie du nez de la sonde, sous la pression du gaz gaine ***(B)*** et du gaz auxiliaire ***(C)***. Elles traversent ensuite le tube de vaporisation en céramique ***(D)*** qui est chauffé entre 350 et 550 °C (environ 150 °C au-dessus de la température de formation des ions). Le solvant et les analytes passent en phase vapeur ***(E)*** et forment un *plasma* ***(F)*** à proximité d'une aiguille ***(G)*** sur laquelle une haute tension est appliquée, provoquant ainsi une décharge corona. Une décharge corona est une décharge électrique entraînée par l'ionisation du milieu entourant un conducteur lorsque la formation d'un arc n'est pas possible.[45-46]

Cette décharge permet d'obtenir un réactif d'ionisation chimique en phase gazeuse à partir des molécules de solvant. Le mécanisme de formation des ions en APCI résulte d'une série de réactions chimiques débutant par la formation d'un cation : c'est la réaction primaire ***(2)***. Des réactions secondaires ***(3)*** et ***(4)*** ont également lieu.[47]

$$N_2 + \bar{e} \rightarrow N_2^{+\bullet} + 2\bar{e} \qquad (2)$$

$$N_2^{+\bullet} + H_2O \rightarrow N_2 + H_2O^{+\bullet} \qquad (3)$$

$$H_2O^{+\bullet} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + {}^{\bullet}OH \qquad (4)$$

Les ions H_3O^+ et les radicaux libres ${}^{\bullet}OH$ sont présents dans la région où se produit la décharge corona, ils peuvent protoner ***(5)*** ou déprotoner ***(6)*** les analytes lors de la traversée du plasma.

$$H_3O^+ + M \rightarrow [M+H]^+ + H_2O \qquad (5)$$

$${}^{\bullet}OH + M \rightarrow [M-H]^- + H_2O^{+\bullet} \qquad (6)$$

Le choix de la polarité des ions analysés est réalisé au niveau de l'optique du spectromètre de masse, en fonction de la polarité du potentiel d'extraction appliqué.[10]

d. Avantages et inconvénients de la source APCI

La source APCI offre les avantages énumérés ci-dessous :

- très bonne désolvatation des analytes introduits en solution, ce qui favorise le couplage avec la chromatographie liquide
- bonne ionisation pour les composés peu polaires : complémentaire de l'ESI
- ionisation douce, ce qui permet d'observer des molécules intactes

La source APCI ne permet d'étudier les analytes que dans une gamme de masse restreinte à 2000 u, elle est peu adaptée à l'étude des composés thermosensibles et l'ionisation étant très sélective, toutes les molécules ne sont pas ionisées avec un rendement suffisant.

2.3. EI – Ionisation électronique

a. Généralités

L'ionisation électronique (ou EI pour *Electron Ionization*) est une source réservée à l'analyse de composés gazeux ou facilement volatilisables (point d'ébullition n'excédant pas 400 °C). La source EI est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250 °C) pour éviter la condensation des analytes.

b. Principe de fonctionnement

L'EI consiste à *bombarder* les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. L'*impact* d'un électron (on parle toujours d'*impact électronique* alors que les physiciens ont démontré l'impossibilité d'un réel impact) sur la molécule M a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire $[M]^{+\bullet}$ ***(7)***. L'énergie des électrons incidents est telle que l'ion $[M]^{+\bullet}$ acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits baptisés *ions fils* ou *ions fragments* ***(8)***.

$$M + \bar{e} \rightarrow M^{+\bullet} \qquad (7)$$

$$(M^{+\bullet})^* \rightarrow A^+ + B \qquad (8)$$

Le fait de disposer d'un standard mondial pour l'énergie des électrons ionisants (70 eV) permet de comparer les spectres de masse réalisés sur différents appareils et d'avoir recours à des bases de données (comprenant plusieurs dizaines de milliers de spectres) dispensant d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les analytes. Les

bases de données ne sont évidemment efficaces que si les spectres des composés étudiés y sont répertoriés. Dans le cas contraire, il faut tenter d'*interpréter* le spectre de masse, ce qui est souvent difficile. L'universalité de l'ionisation électronique (la quasi-totalité des molécules est *ionisable*), justifie l'immense succès de cette technique.[1,48]

c. Description de la source

La *Figure III-8* présente une source de type Nier, classiquement utilisée en ionisation électronique pour engendrer les électrons.

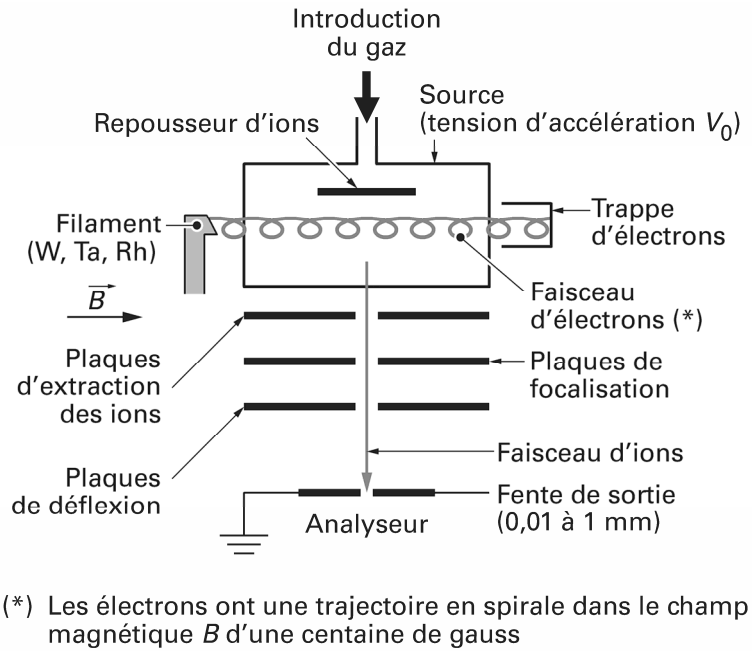


Figure III-8. *Principe d'une source EI de type Nier.*[49]

La source EI est une boîte d'environ 1 cm^3, appelée *chambre d'ionisation* dans laquelle entre le gaz à analyser par un tube électriquement isolé. Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique, le plus souvent en tungstène ou en rhénium, et accélérés par une différence de potentiel de 70 V entre le filament et la chambre d'ionisation, ce qui leur confère une énergie cinétique de 70 eV. En traversant la chambre d'ionisation, les électrons sont soumis à un champ magnétique ***B*** qui leur confère une trajectoire en spirale allongeant ainsi leur parcours et augmentant leur probabilité de rencontrer une molécule M.

Les ions positifs produits à partir de l'échantillon sont extraits perpendiculairement au faisceau d'électrons par deux plaques d'extraction et un repousseur porté à un potentiel supérieur de quelques volts à celui de la chambre d'ionisation. Les ions qui sortent de la chambre d'ionisation sont ensuite focalisés et accélérés vers l'analyseur à l'aide de lentilles électrostatiques.[49]

d. Avantages et inconvénients de la source EI

La source EI offre les avantages énumérés ci-dessous :

- un très grand nombre de molécules sont ionisables
- cette technique d'ionisation donne un grand nombre de fragments
- il existe des bases de données pour la comparaison de spectres
- son coût est faible

Le principal inconvénient des sources EI est que leur utilisation est limitée aux molécules facilement volatilisables (molécules de masse moléculaire faible à moyenne et peu polaires).

3. ANALYSEURS QUADRIPOLAIRES

3.1. Généralités

Les analyseurs quadripolaires représentent la très grande majorité des analyseurs utilisés en couplage LC/MS et GC/MS pour trois raisons principales : vitesse de balayage élevée, coût raisonnable et facilité de maintenance. Il existe deux grandes catégories d'analyseurs quadripolaires ; la première regroupe les quadripôles, la seconde est constituée des pièges à ions.

Ces spectromètres sont équipés de systèmes de pompage assurant un vide de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} mbar. La qualité du vide est un facteur déterminant pour l'analyse. Il s'agit d'évacuer les molécules résiduelles telles que l'azote, l'oxygène et l'eau atmosphériques ainsi que les molécules éluées du chromatographe qui, pour la plupart, n'ont pas été ionisées (les rendements d'ionisation sont très faibles) et qui pourraient polluer le spectromètre de masse. Il s'agit également de garantir le bon fonctionnement du multiplicateur d'électrons (et du filament dans le cas d'un GC/MS) extrêmement fragilisé par une pression trop élevée.[1]

a. Historique

C'est en 1953 que Paul et Steinwedel ont pour la première fois décrit le piège à ions quadripolaire, lors d'expériences avec un champ électrique de haute fréquence pour piéger des particules chargées dans une petite région de l'espace.[50-51] Ils donnèrent ainsi naissance au *piège de Paul*. Ils ont également décrit le filtre quadripolaire au même moment. En 1959, Fisher effectua les premiers travaux de mesure de masse à l'aide du piège quadripolaire.[52] Au début des années 1960, deux axes de développement du piège à ions vont se dégager. Le premier, mené par Dehmelt, est celui du piège utilisé pour étudier des particules chargées en phase gazeuse,[53-54] alors que le second conduit par Dawson et Whetten est celui du piège utilisé comme spectromètre de masse.[55-56] Ce n'est qu'en 1984 que le premier piège à ions quadripolaire sera commercialisé sous le nom d'ITD (*Ion Trap Detector*) par la société Finnigan-MAT, suite aux avancées réalisées par l'équipe de Stafford : amélioration du confinement des ions avec de l'hélium et possibilité de balayer tous les ions stockés dans le piège.[57-58] Ce piège ne sert alors que de simple détecteur à un chromatogramme en phase gazeuse. C'est en 1985 que la même société commercialise l'ITMS (*Ion Trap Mass Spectrometer*), le premier piège réellement utilisé comme un spectromètre de masse. Ce n'est qu'à cette époque que chimistes et biologistes s'intéressent vraiment au piège à ions.

En 1987, l'apparition de l'AGC (*Auto Gain Control*) permet de réguler le nombre d'ions qui entrent dans le piège.[59]

En 1989, Paul, Dehmelt et Ramsey reçoivent le Prix Nobel de Physique pour leurs travaux sur le confinement et la mesure de masse d'ions grâce à l'utilisation de champs électriques dynamiques. Dans le même temps, d'autres avancées technologiques améliorent les performances du piège à ions : possibilité de faire de la spectrométrie de masse en tandem temporelle,[60] augmentation de la gamme de *m/z* balayés,[61-62] amélioration de la résolution[63] et de la capacité de piégeage grâce au confinement par de l'hélium.[64] Parallèlement à ces avancées sur l'analyseur, les premières sources d'ionisation externes se développent afin de multiplier les possibilités de couplage avec le piège à ions (source EI externe,[58] LD,[65] ASGDI,[66] PB,[62] ESI[67])*.

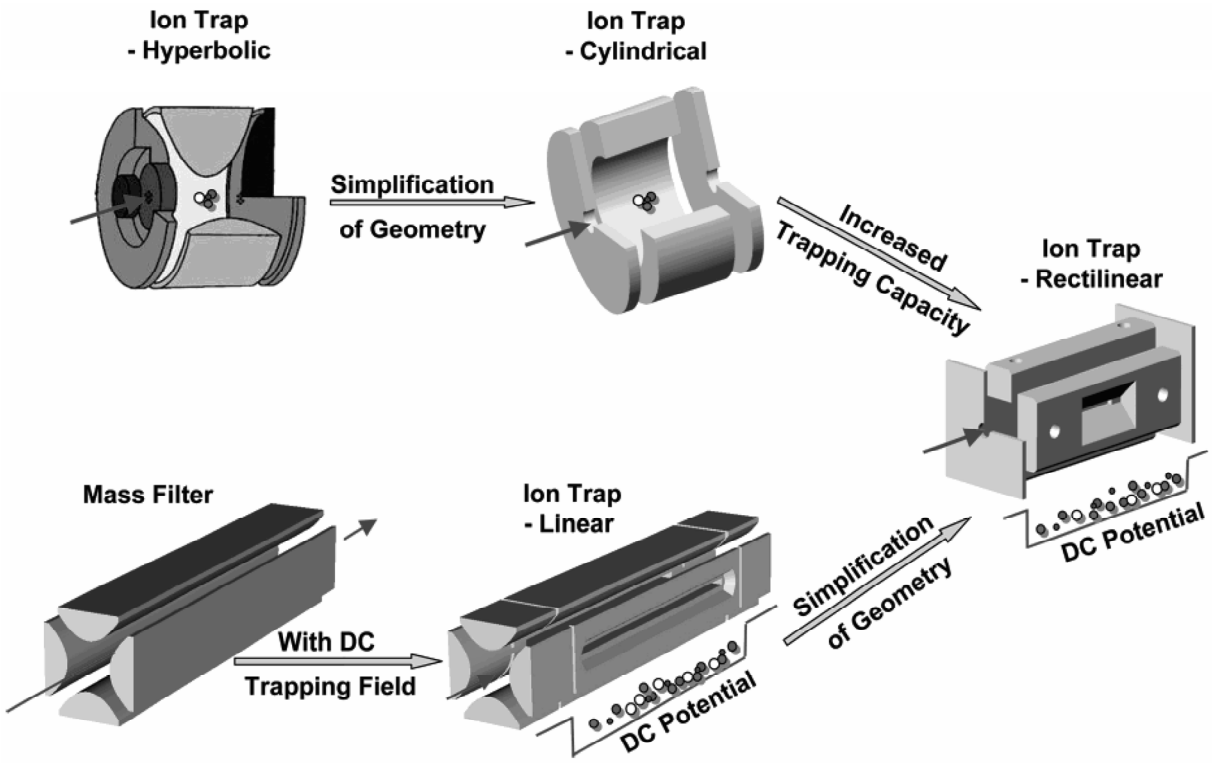


Figure III-9. *Évolution historique des analyseurs quadripolaires.*[68]

Les dernières avancées dans le domaine des pièges à ions sont l'invention de l'*Orbitrap* en 1999 (commercialisée en 2005) et l'apparition en 2002 des pièges 2D qui résultent d'une fusion entre le filtre quadripolaire et le piège à ion (*Figure III-9*).

* ASGDI : Atmospheric Sampling Glow Discharge Ionization, PB : Particle Beam.

b. Paramètres caractéristiques d'un analyseur

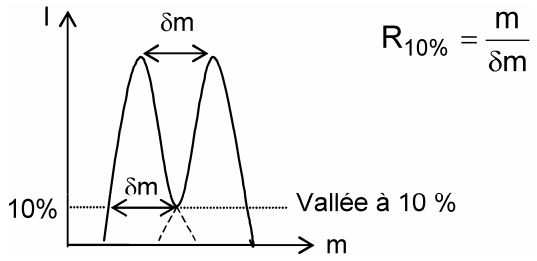
Un analyseur est caractérisé par sa résolution, la gamme de rapports *m/z* qu'il peut balayer, sa vitesse de balayage et sa transmission.[69] La résolution et la gamme de rapports *m/z* analysable caractéristiques des principaux analyseurs sont indiquées dans le *Tableau III-1*.

Tableau III-1. *Résolution et gammes de rapports m/z analysables des principaux analyseurs.*[8]

Analyseur	Résolution	Gamme m/z
Q (Quadripôle)	2 000	8 000
EB (Magnétique)	60 000	20 000
TOF (Temps de vol)	20 000	500 000
IT (Piège à ions)	5 000	6 000
Orbitrap	100 000	4 000
FT-ICR (Résonnance cyclotronique)	1 000 000	4 000

Résolution – Vitesse de balayage

La résolution correspond à la capacité de fournir des signaux distinguables pour deux ions de masses voisines. On admet que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces pics est égale à 10 % de l'intensité du pic le plus faible (on parle de résolution à 10 %) (*Figure III-10*). La résolution pour un pic isolé se calcule par le rapport entre la largeur du pic δm à 10 % de son maximum et sa masse. Il est également courant de parler de résolution FWHM (*Full Width at Half Maximum*). Dans ce cas, la largeur δm du pic est mesurée à mi-hauteur.



$$R_{10\%} = \frac{m}{\delta m}$$

Figure III-10. *Définition de la résolution à 10 % de vallée.*

La résolution traduit la précision sur la mesure des rapports *m/z* des ions. Celle d'un analyseur dit quadripolaire est liée à sa vitesse de balayage en *m/z* : plus le balayage est rapide et moins bonne est la résolution. Avec un tel analyseur, on travaille le plus souvent avec une vitesse de balayage très élevée (jusqu'à 10000 Th/s) et une résolution unitaire ; cela signifie que les rapports *m/z* des ions sont donnés sans chiffre significatif après la virgule. En balayant beaucoup moins vite, on ne pourrait accéder qu'à deux chiffres significatifs sur la mesure des *m/z*, ce qui ne présente pas un grand intérêt en couplage dans la mesure où un rapport *m/z* avec deux chiffres significatifs ne permet pas de déterminer une formule brute. Balayer très vite permet en revanche l'enregistrement de plusieurs spectres par seconde et permet un tracé très précis des pics chromatographiques ; cela améliore la sensibilité et la résolution de l'appareil ainsi que la précision sur les dosages. Si la gamme de rapports *m/z* balayée par un analyseur quadripolaire peut atteindre 8000 u, elle est généralement limitée autour de 3000 u en couplage LC/MS, les composés de poids moléculaire élevé donnant généralement des ions multichargés, et à 1000 u en couplage GC/MS où l'on analyse des composés volatils donc de poids moléculaires faibles à moyens.

Transmission

La transmission caractérise la capacité de l'analyseur à conserver les ions entre le moment de leur formation et celui de leur détection. Elle est difficile à évaluer car on ne connaît pas précisément la quantité d'ions formés en source.[1]

c. Les différents modes de balayage

La terminologie décrite dans ce paragraphe correspond à celle employée par les constructeurs du matériel utilisé au cours de la thèse (Thermo Electron et Agilent). Cette terminologie peut varier d'un constructeur à un autre, mais le principe des différents modes de balayage reste identique.

Modes de balayage en une seule étape

Les modes de balayage décrits ici, sont applicables sur les filtres quadripolaires (simple et triple quadripôle) ainsi que sur les pièges à ions.

Full scan MS ou Scan

Le mode dit *de balayage* ou *full scan MS* ou *Scan* est utilisé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dits *de source*, c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné. On parle de *balayage* car l'obtention d'un tel spectre nécessite le balayage des tensions *U* et *V* du potentiel utilisé.

En GC/MS, les spectres *de source* permettent la caractérisation des analytes car ils sont généralement riches en ions. La plupart des utilisateurs de GC/MS utilisent des bases de données qui répertorient des dizaines de milliers de spectres de masse et qui permettent l'identification instantanée des molécules analysées (sous réserve, évidemment, que ces dernières aient été enregistrées dans ces bases de données). Lorsque les molécules étudiées n'ont pas été préalablement répertoriées (nouveaux produits de synthèse, métabolites…), l'identification doit se faire par déduction à partir des ions observés, ce qui est souvent fastidieux. Il est généralement indispensable d'avoir recours à l'utilisation de méthodes de MS^n, décrites ci-après, qui permettent d'assister l'interprétation des spectres *de source*. Si les analytes doivent être quantifiés, l'intégration du pic chromatographique est réalisée sur le courant correspondant à un ion caractéristique de l'analyte. Même des produits co-élués peuvent être précisément quantifiés dès lors que leurs spectres de masse diffèrent d'au moins un ion.[1]

En LC/MS les spectres *de source* sont principalement utilisés pour déterminer la masse moléculaire de chaque composant d'un mélange de composés inconnus, lorsque l'on ne sait pas quelle est la valeur de *m/z* qu'il faut sélectionner pour effectuer de la MS^n. Le mode full scan MS est également très utilisé en *infusion* (à l'aide d'une seringue, on injecte directement un analyte dans le spectromètre) pour optimiser les réglages de l'appareil. Ce mode est également utilisé pour l'analyse de protéines pour lesquelles le manque d'ions fragments caractéristiques est compensé par la formation d'ions multichargés.[44,70]

SIM – Selected Ion Monitoring

Le terme SIM (*Selected Ion Monitoring*) est employé pour désigner l'opération qui consiste à ne détecter qu'un (ou quelques) ion(s) sélectionné(s). En SIM, le spectromètre de masse fonctionne comme un filtre ; il est programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés (1 à 4, en général). Le gain de sensibilité est spectaculaire car le mode SIM augmente le signal associé à la détection des analytes tout en diminuant le bruit de fond chromatographique.

Avec un quadripôle, la durée du balayage des ions est proportionnelle à la gamme de rapports *m/z* balayée ; opérer sur peu de valeurs de *m/z* augmente donc considérablement le temps imparti à la détection des ions correspondants, comparativement au mode *Scan*. Parallèlement, l'élimination des ions indésirables (ions issus de la phase stationnaire de la colonne chromatographique ou d'impuretés de l'échantillon) supprime le *bruit de fond* constitué par ces derniers ainsi que les pics chromatographiques associés aux molécules parasites. On dit que la détection est *sélective*.[1]

Dans un piège à ions, le mode SIM diminue les seuils de détection car l'élimination des ions *parasites* libère de l'espace pour stocker plus d'ions d'intérêt dans l'analyseur. De plus, l'analyseur consacre davantage de temps à la détection des ions d'intérêt, ce qui contribue à l'augmentation du signal.

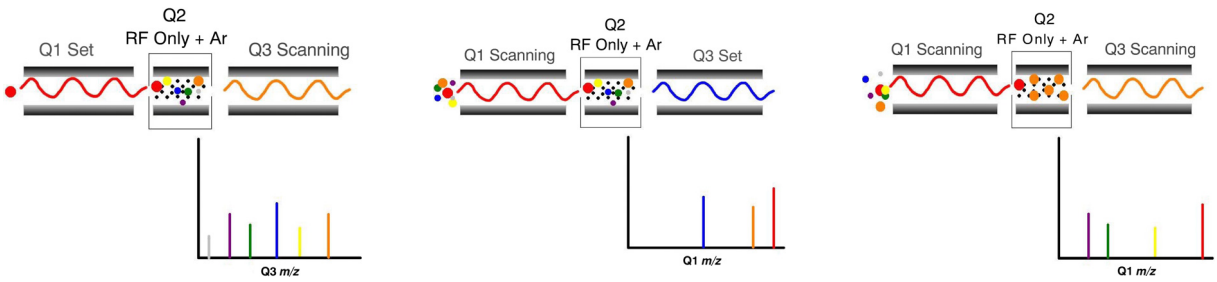
Le mode SIM est très performant dans le cadre de la détection de traces en milieux complexes et est ainsi particulièrement utilisé en analyses environnementales et toxicologiques. Le SIM présente également l'avantage d'avoir une vitesse de balayage beaucoup plus rapide que le *Scan*, ce qui très est pratique dans le cadre d'un *screening* de molécules ciblées.[44,70-71]

Spectrométrie de masse en tandem dans l'espace

Les modes de balayage qui sont décrits ici, sont ceux qui sont applicables sur un triple quadripôle. Ils sont résumés dans le *Tableau III-2* et illustrés par la *Figure III-11*.

Tableau III-2. *Modes de balayage d'un triple quadripôle.*

	Q1	*Q2*	*Q3*
Mode	*Analyseur*	*Cellule de collision*	*Analyseur*
Analyse sur Q1	Balayage	Transmission	Transmission
Analyse sur Q3	Transmission	Transmission	Balayage
Recherche d'ions fragments	Fixe	CID puis transmission	Balayage
Recherche d'ions précurseurs	Balayage	CID puis transmission	Fixe
Perte de neutres	Balayage	CID puis transmission	Balayage



(a) Recherche d'ions fragments (b) Recherche d'ions précurseurs (c) Perte de neutres

Figure III-11. *Modes de balayage d'un triple quadripôle.*[71]

Recherche d'ions fragments

Dans ce mode de balayage, comme le montrent le *Tableau III-2* et la *Figure III-11*, le premier quadripôle (Q1) isole un ion précurseur qui est fragmenté dans la cellule de collision (Q2) et les ions fragments sont analysés par le troisième quadripôle (Q3). Q3 peut être utilisé de deux façons différentes, qui engendrent deux types de balayage : *full scan* MS^2 et SRM (*Selected Reaction Monitoring*).

L'utilisation d'un triple quadripôle en *full scan* MS^2 permet d'obtenir un spectre de l'analyte dont un ion a été isolé en Q1, ce qui permet de réaliser des études structurales. Ce mode présente néanmoins l'inconvénient d'être peu sensible, car, comme évoqué précédemment, la durée de balayage d'un quadripôle est proportionnelle à la gamme de rapports *m/z* balayée.

Un balayage SRM est équivalent à un balayage SIM en MS^2. De ce fait, la SRM est beaucoup plus sélective. Un triple quadripôle est donc généralement utilisé en mode SRM, en particulier pour réaliser des analyses en *screening*, comme c'est le cas dans le cadre du contrôle de la médication.

Recherche d'ions précurseurs

Dans ce mode de balayage, comme le montrent le *Tableau III-2* et la *Figure III-11*, le premier quadripôle (Q1) transmet séquentiellement les ion précurseurs qui sont fragmentés dans la cellule de collision (Q2) et le troisième quadripôle (Q3) est réglé pour n'isoler qu'un seul ion fragment. Le spectre qui résulte de ce mode de balayage est composé des rapports *m/z* des ions précurseurs relevés sur Q1, avec l'intensité correspondant aux ions fragments, mesurée sur Q3.

Ce mode de balayage peut être utilisé soit en analyse structurale pour déterminer si des fragmentations sont consécutives ou compétitives, soit lors d'une étude de métabolisme pour identifier les ions précurseurs de molécules conjuguées.

Perte de neutres

Dans ce mode de balayage, les deux analyseurs Q1 et Q3 sont liés, si bien qu'ils sont balayés à la même vitesse avec un décalage de rapport *m/z* Q1 – Q3 constant. La cellule de collision (Q2) permet toujours de fragmenter les ions par CID.

Cette utilisation du triple quadripôle est principalement destinée aux études de métabolisme : il est fréquent que les molécules éliminées par l'organisme soient conjuguées ; ce mode de balayage permet de rechercher tous les ions précurseurs qui possèdent la fonction chimique correspondante.

Spectrométrie de masse en tandem dans le temps

Les modes de balayage décrits ici, sont ceux qui sont applicables aux pièges à ions.

Full scan MS^n

Ce mode de balayage se déroule en *n* temps. Les *n-1* premiers temps permettent de sélectionner successivement les ions précurseurs à fragmenter par CID ; les autres ions sont éliminés du piège. Dans le dernier temps de l'analyse, tous les ions fragments sont stockés dans l'analyseur en vue d'être détectés. Ce mode de balayage est beaucoup plus sélectif que le *full scan MS*, et plus *n* est élevé, plus l'analyse est sélective, mais le signal devient plus faible.

Le mode *full scan MS^2* est celui qui est majoritairement utilisé sur un piège à ions, car le spectre ainsi obtenu fourni généralement des informations suffisantes pour identifier un analyte.

SRM – CRM

Le mode SRM (*Selected Reaction Monitoring*), tout comme dans le cas du triple quadripôle est équivalent au mode SIM avec la sélectivité de la MS^2. Le mode CRM (*Consecutive Reaction Monitoring*) est équivalent au mode SRM en MS^n avec $n \geq 3$. Ce mode est donc encore plus sélectif que le précédent et permet d'obtenir un signal avec très peu de bruit.

Data Dependant Scan

Ce mode d'acquisition particulier est principalement utilisé pour effectuer la recherche de métabolites dont on ne connaît pas la structure. Il se déroule en deux étapes successives (trois dans certains modes de programmation). Dans un premier temps le spectromètre de masse fait l'acquisition d'un spectre en mode full scan MS. Dans un second temps il sélectionne automatiquement l'ion le plus intense du spectre de source et le fragmente par CID pour donner un spectre full scan MS^2.

De nombreux paramètres permettent d'ajuster la sélection des ions à rechercher pour obtenir le maximum d'informations avec ce mode d'acquisition. Sur le piège 2D la vitesse de balayage est suffisamment rapide pour permettre une troisième étape qui consiste à déclencher l'acquisition d'un spectre full scan MS^3 si l'on détermine lors de l'analyse du spectre full scan MS^2 qu'il y a une perte de neutre égale à une valeur fixée, la valeur de la perte de neutre correspondant généralement à la masse caractéristique d'une fonction métabolisée.

Les types de balayage

Le *Zoom scan* et l'*Ultra zoom scan* sont des types de balayage principalement utilisés dans le cadre de l'analyse de biomolécules ou pour séparer les pics d'un massif isotopique. Comme cela a été précisé, la résolution, la vitesse de balayage et la gamme de masse d'un analyseur quadripolaire sont liés. Ces types d'acquisition consistent à augmenter la résolution en diminuant la vitesse et la gamme de rapports *m/z* balayée (à 15 u sur le LTQ). Il existe également le *Turbo scan*, où cette fois la résolution est réduite au profit de la vitesse d'acquisition. Exemple : en type *Normal scan*, le LTQ balaye à 13 000 u/s, en type *Zoom scan* il balaye à 1 100 u/s, à seulement 28 u/s en type *Ultra zoom scan* où il peut atteindre 30 000 de résolution et 128 000 u/s en type *Turbo scan* (utilisé pour acquérir le spectre MS en *Data Dependant Scan*).

3.2. Principe de fonctionnement des analyseurs quadripolaires

a. Filtre quadripolaire

Un quadripôle est systématiquement associé à un système d'extraction et de focalisation des ions produits en source appelé *interface*. Il s'agit d'un dispositif électrostatique constitué de multipôles et de lentilles électrostatiques (analogue électrique des lentilles optiques) comme on peut le voir sur la *Figure III-12*.

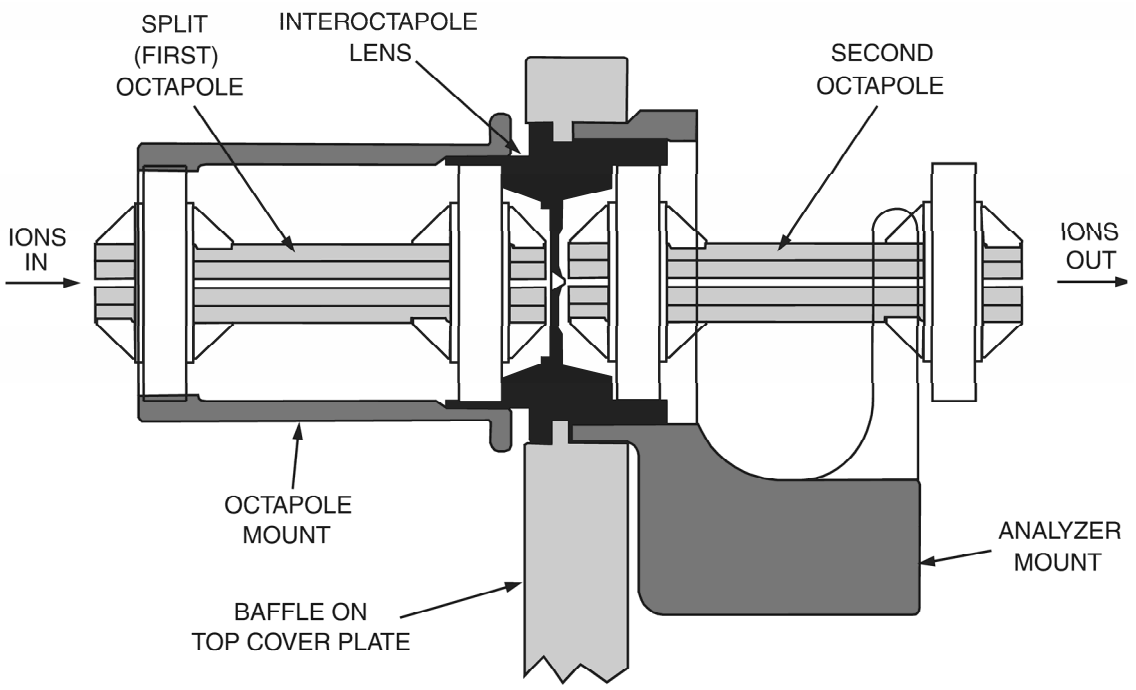


Figure III-12. *Interface d'un spectromètre de masse composée de deux octapôles et d'une lentille électrostatique de focalisation (LCQ Advantage Max).*[70]

Un quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique. Ces électrodes sont cylindriques et longues de dix à vingt centimètres selon les modèles. L'application d'un potentiel de type $U - V\cos\omega t$ crée un champ quadripolaire entre les électrodes. Deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel $U - V\cos\omega t$, les deux autres au même potentiel mais de signe opposé $-(U - V\cos\omega t)$. U et $V\cos\omega t$ sont, respectivement, les composantes de tension continue et de tension alternative du potentiel de radiofréquence (RF). V et ω sont, respectivement, l'amplitude et la pulsation de la tension alternative. La valeur de ω est fixée par le constructeur.

Les polarités des électrodes sont rapidement inversées, ce qui confère aux ions un mouvement en *tire-bouchon* dont l'amplitude radiale dépend des paramètres *U* et *V*. Pour qu'un ion de rapport *m/z* donné ait une trajectoire stable dans le quadripôle et qu'il puisse ainsi atteindre le détecteur, il faut que les paramètres *U* et *V* soient tels que l'amplitude radiale de la trajectoire de l'ion soit inférieure à la distance séparant les électrodes. Dans la pratique, le quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : on fait varier simultanément les valeurs de *U* et de *V* de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. A un instant *t* donné, ne sont détectés que les ions d'un *m/z* donné. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage.[72]

b. Piège quadripolaire 3D

Dans un piège à *source externe* les ions sont produits dans une source analogue à celle d'un quadripôle avant d'être introduits dans l'analyseur (*Figure III-13a*). Ce type de piège est celui qui est toujours utilisé en couplage LC/MS (lié à la nécessité d'évaporer le solvant), et par certains constructeurs de systèmes GC/MS. Dans le cas d'un couplage GC/MS les ions peuvent être directement produits au cœur du piège quadripolaire (la colonne chromatographique *arrive* dans le piège à ions), ce dernier joue alors tour à tour le rôle de source et d'analyseur ; on parle de piège à *ionisation interne* (*Figure III-13b*). Dans ce qui suit, seul le piège à ions à source externe utilisé en couplage LC/MS sera considéré.

Un piège à ions est constitué de trois électrodes métalliques : une électrode annulaire et deux électrodes couvercles dites *chapeaux*. Des séparateurs en quartz en forme d'anneau ou *spacer rings* jouent le rôle d'isolants électriques entre ces électrodes (*Figure III-13*). Les deux électrodes chapeaux sont percées en leur centre, l'une pour permettre l'introduction des ions provenant de la source, l'autre pour permettre l'éjection des ions vers le détecteur.

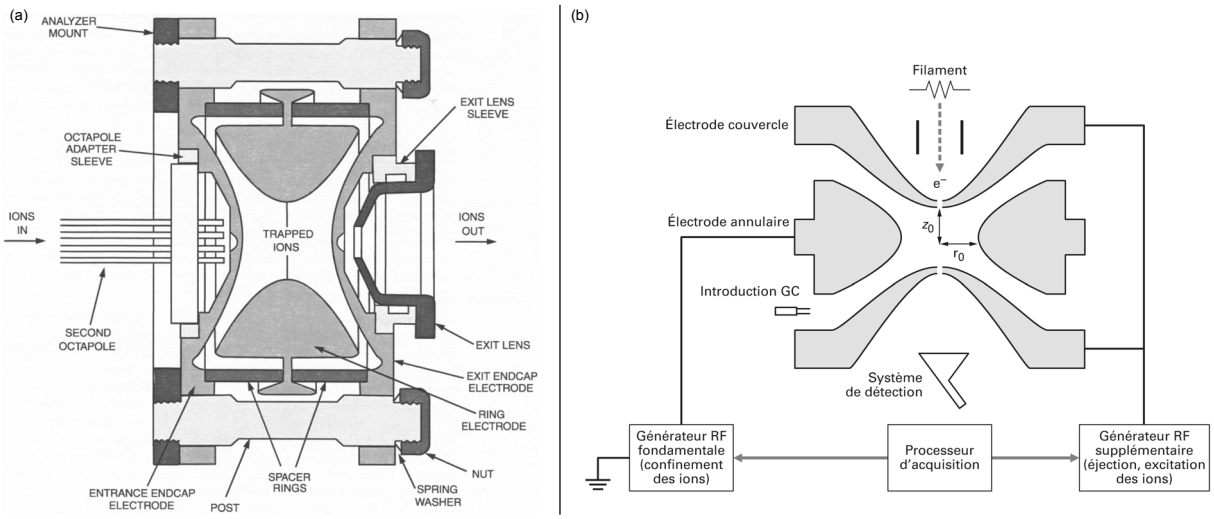


Figure III-13. *(a) Piège quadripolaire utilisé en LC/MS.*[70]
(b) Piège quadripolaire à source interne utilisé en GC/MS.[49]

Contrairement au quadripôle, le piège à ions possède la capacité de stocker les ions : l'application d'une radiofréquence de type $V \cos \omega t$ sur l'électrode annulaire produit un champ quadripolaire au sein duquel chaque ion acquiert un mouvement oscillant dont l'amplitude et la fréquence dépendent du rapport *m/z* de l'ion et de la valeur de *V*. Le champ quadripolaire n'est homogène qu'au centre du piège. Il faut éviter que les ions ne s'approchent des électrodes sinon leurs trajectoires deviennent instables et ils ne sont plus piégés. Pour cela, on introduit dans l'analyseur de l'hélium à une pression partielle de 10^{-3} mbar. Les ions subissent de multiples collisions avec les atomes d'hélium, ce qui a pour effet de diminuer les amplitudes de leurs trajectoires et de les confiner au centre de l'analyseur.

Lors de la phase d'éjection et donc de détection des ions, la valeur de *V* est progressivement augmentée alors qu'une radiofréquence de type $V_2 \cos \omega_2 t$ est appliquée entre les électrodes chapeaux. Le balayage de *V* amène tous les ions, tour à tour et par *m/z* croissant, en résonance avec $V_2 \cos \omega_2 t$. Il y a alors augmentation brutale de l'amplitude de la trajectoire de l'ion et éjection de ce dernier vers le détecteur.[73] L'écart entre les électrodes n'étant que de quelques millimètres, le volume disponible pour le piégeage des ions est faible. Les premiers pièges quadripolaires n'ont pas rencontré le succès commercial escompté en raison de phénomènes d'espace de charge importants : la répulsion électrostatique exercée par chaque ion vis-à-vis des autres ions provoque des distorsions spectrales en fonction de la quantité d'analyte introduite. Les pièges à ions sont aujourd'hui équipés de régulateurs automatiques de gain (ou AGC pour *Auto Gain Control*) qui ajustent le nombre d'ions présents dans l'analyseur, en jouant sur la durée d'ionisation ou sur la durée d'introduction des ions. Le spectre de masse est toujours enregistré à partir du même

nombre d'ions, quelle que soit la quantité d'analyte injectée en chromatographie ; le tracé du chromatographe prend en compte le temps d'ionisation ou d'introduction optimisé, de manière à conserver l'aspect quantitatif de la méthode. Grâce aux régulateurs électroniques de gain, les pièges quadripolaires fournissent aujourd'hui une reproductibilité spectrale satisfaisante, néanmoins inférieure à celle des quadripôles.

c. Piège quadripolaire 2D

Le piège quadripolaire 2D qui est décrit ici correspond à la géométrie de celui qui a été utilisé, à savoir le LTQ. Il est composé de quatre barreaux de section hyperbolique. Comme le montre la *Figure III-14*, chacun de ses barreaux est divisé en trois sections. Les ions sont introduits de façon axiale selon l'axe z. A ces extrémités le piège est encadré par des lentilles sur lesquelles une tension continue est appliquée pour empêcher les ions de sortir. Les deux barreaux selon l'axe x sont percés en leur centre par des fentes qui permettent l'éjection radiale des ions vers les deux détecteurs du spectromètre. Les ions peuvent également être éjectés de façon axiale.[10,44,74]

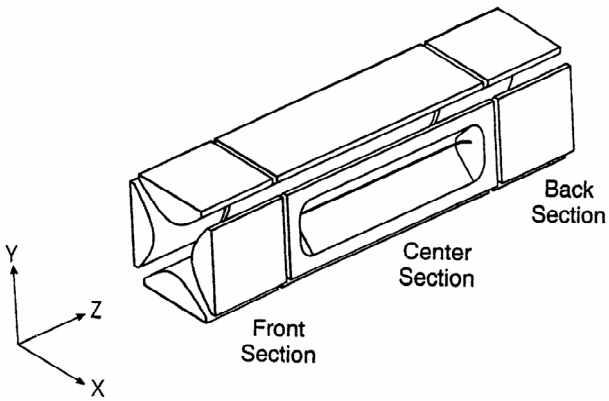


Figure III-14. *Piège quadripolaire 2D de type LTQ.*[74]

Tout comme le piège 3D, le piège 2D possède la capacité de piéger les ions. Le piégeage s'effectue de façon axiale en appliquant une radiofréquence sur les barreaux, de la même façon que sur un quadripôle, ce qui confère un mouvement axial aux ions (*Figure III-15*). Pour garder les ions dans le piège, des courants continus sont appliqués sur chacune des sections des quadripôles, ce qui engendre un mouvement axial. La combinaison de ces deux événements permet de piéger les ions dans un faisceau le long de l'axe z avec, comme dans le piège 3D, la présence d'hélium qui aide au confinement.[10,74]

L'éjection des ions sur le LTQ se fait en mode résonnant. Pour ce faire, une rampe de radiofréquence croissante est appliquée sur tous les barreaux du piège, ce qui permet une

éjection des basses masses vers les hautes masses. Afin d'éviter que les ions n'entrent en contact avec les barreaux selon l'axe y, un courant alternatif supplémentaire de fréquence constante est appliqué sur les barreaux selon x, ce qui confère un mouvement latéral aux ions. L'amplitude de ce courant augmente au cours de la phase d'éjection des ions.[10]

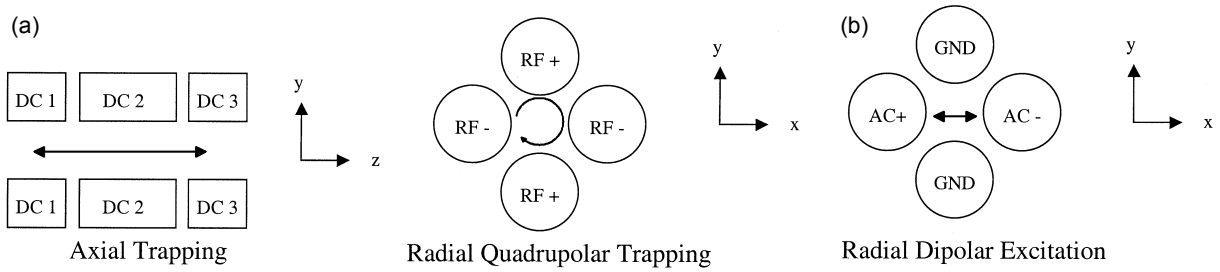


Figure III-15. *(a) Piégeage axial et radial des ions dans un piège quadripolaire 2D.*
(b) Application d'un courant alternatif sur les électrodes x pour éjecter les ions radialement.[74]

Le piège linéaire inclus évidemment les avancées développées dans le cadre du piège 3D, à savoir l'AGC, mais il présente également d'autres avantages. De par sa forme, le volume de piégeage est beaucoup plus élevé, ce qui permet d'accroître la sensibilité de par un nombre d'ions piégés plus important. Cela diminue également les effets de charge d'espace, d'autant plus que sur le LTQ, de par la présence des trois sections quadripolaires hyperboliques, les lignes de champ à l'intérieur du piège sont parfaitement linéaires et ne subissent pas d'effet de bord lié aux lentilles d'entrée et de sortie du piège, comme le montre la *Figure III-16*. Le fait de posséder un meilleur piégeage des ions que le piège 3D permet au LTQ outre d'avoir une meilleure sensibilité, d'accroître la stabilité des ions fragments en MS^n, d'où une meilleure reproductibilité. Le piège 2D permet également d'avoir une vitesse de balayage plus élevée, une vitesse d'acquisition et une résolution supérieures. La possibilité d'éjection axiale permet également de coupler le piège 2D avec un autre analyseur comme un Orbitrap ou un FT-ICR pour former un spectromètre de masse hybride.[74-75]

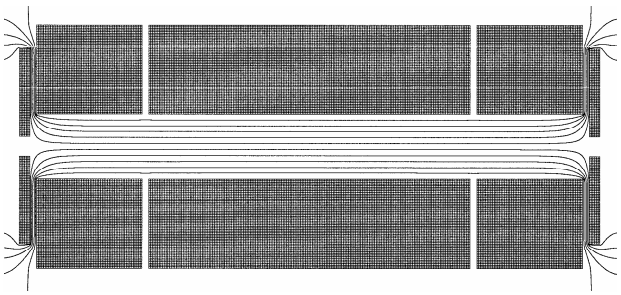


Figure III-16. *Lignes de champ dans un piège 2D à trois sections.*[74]

3.3. Approche théorique du fonctionnement des analyseurs quadripolaires

a. Équations de Mathieu

Les analyseurs de masse quadripolaires sont dits dynamiques, c'est à dire que les trajectoires des ions sont influencées par des forces qui dépendent du temps et sont donc difficiles à prédire. Dans un champ quadripolaire, les mouvements des ions sont décrits par les solutions des équations de Mathieu[76], étudiées en détail par Campbell.[77]

Quand un ion est placé dans un champ quadripolaire idéal, sans effet d'espace de charge dû à la présence d'autres particules chargées, le potentiel Φ en tout point (x,y,z) à l'intérieur du champ est exprimé par la relation ***(9)*** :

$$\Phi = \frac{\Phi_0}{r_0^2}\left(\lambda x^2 + \sigma y^2 + \gamma z^2\right) \qquad \textbf{(9)}$$

Φ_0 est le potentiel électrique appliqué

λ, σ et γ sont des constantes appliquées aux trois coordonnées x, y et z

r_0 est une constante du système quadripolaire

Le potentiel Φ_0 est la combinaison d'une tension continue U et d'une tension alternative $V \cos \omega t$:

$$\Phi_0 = U - V \cos \omega t \qquad \textbf{(10)}$$

ω est la fréquence angulaire de la radiofréquence (RF), exprimée en rad/s

L'équation ***(9)*** doit satisfaire à l'équation de Laplace ***(11)*** :

$$\nabla^2\Phi = \frac{\partial^2\Phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\Phi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\Phi}{\partial z^2} = 0 \qquad \textbf{(11)}$$

$$\nabla^2\Phi = \frac{\Phi_0}{r_0^2}\left(2\lambda + 2\sigma + 2\gamma\right) = 0 \qquad \textbf{(12)}$$

$$\lambda + \sigma + \gamma = 0 \qquad \textbf{(13)}$$

L'équation ***(13)*** est une condition que tous les systèmes quadripolaires doivent satisfaire : le champ est découplé dans les trois coordonnées de direction, et les forces peuvent être déterminées séparément. Les équations de mouvement d'un ion dans un champ quadripolaire sont ensuite obtenues *via* un traitement mathématique :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2\lambda ze}{mr_0^2}(U - V\cos\omega t)x = 0 \qquad \textbf{(14)}$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{2\sigma ze}{mr_0^2}(U - V\cos\omega t)y = 0 \qquad \textbf{(15)}$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} + \frac{2\gamma ze}{mr_0^2}(U - V\cos\omega t)z = 0 \qquad \textbf{(16)}$$

ze et *m* sont respectivement la charge et la masse de l'ion

En posant les changements de variable ***(17)***, ***(18)*** et ***(19)***, on obtient la forme simplifiée des équations de Mathieu ***(20)*** :

$$\varsigma = \frac{\omega t}{2} \qquad \textbf{(17)}$$

$$a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \qquad \textbf{(18)}$$

$$q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \qquad \textbf{(19)}$$

$$\frac{d^2u}{d\varsigma^2} + (a_u - 2q_u\cos 2\varsigma)u = 0 \qquad \textbf{(20)}$$

u représente les coordonnées *x*, *y* ou *z*

Les conditions de stabilité des trajectoires, déduites des équations de Mathieu sont imposées par les valeurs des paramètres *a* et *q*, appelés *paramètres de stabilité*. L'ensemble de ces solutions est souvent représenté sous la forme d'un *diagramme de stabilité*, où *a* est porté en fonction de *q*.

b. Filtre de masse quadripolaire

Un filtre de masse quadripolaire est constitué de quatre barres d'acier inox de section circulaire (idéalement hyperbolique), qui jouent le rôle d'électrodes (*Figure III-17a*). Entre ces électrodes, on applique un potentiel continu *U*, et un potentiel alternatif $V\cos\omega t$.

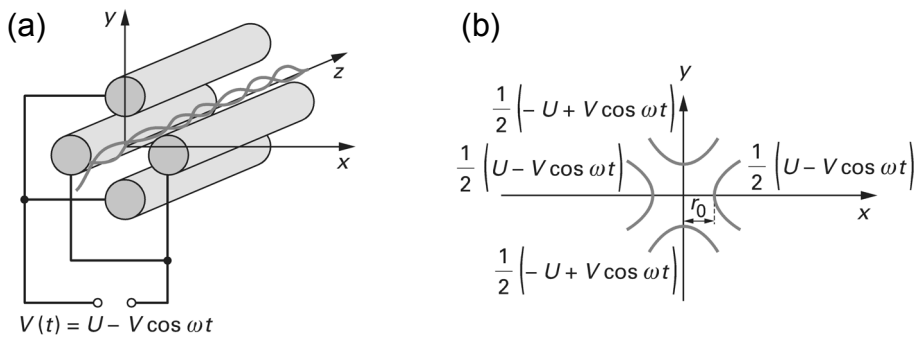


Figure III-17. *Filtre de masse quadripolaire. (a) Assemblage des barres cylindriques. (b) Profil idéal des électrodes et tensions appliquées.*[49]

De l'application des potentiels Φ_0 et $-\Phi_0$ aux paires d'électrodes distantes de $2r_0$ résulte un champ aux contours hyperboliques (*Figure III-17b*). Il n'y a pas de champ selon l'axe *z* ($\rightarrow \gamma = 0$), ce qui permet de simplifier les équations ***(13)*** à ***(16)*** :

$$\lambda = -\sigma = 1 \qquad \textbf{(21)}$$

$$a_x = -a_y = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \qquad \textbf{(22)}$$

$$q_x = -q_y = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \qquad \textbf{(23)}$$

En fonction des valeurs de *m*, *U* et *V*, les ions peuvent avoir soit une trajectoire oscillante entre les barres du filtre et parvenir au détecteur, soit être éjectés. Les définitions de *a* et *q* imposent pour un ω donné, une proportionnalité entre *m* et *U* ou *V*. Ainsi, le balayage simultané des tensions *U* et *V* en maintenant le rapport *U*/*V* constant permet la transmission d'ions de différents rapports *m/z*, sous réserve qu'ils soient compris dans le domaine de stabilité du filtre quadripolaire (*Figure III-18*). Si *U* = 0, le quadripôle se comporte comme un *guide d'ions*.

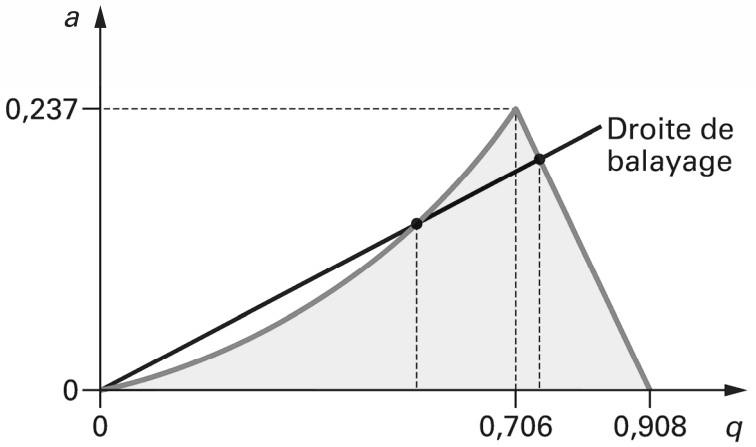


Figure III-18. *Diagramme de stabilité d'un quadripôle.*[49]
La zone grisée représente la zone de stabilité.

c. Piège quadripolaire 3D

Tout comme les filtres quadripolaires, les pièges à ions sont basés sur l'action d'un champ électrique radiofréquence appliqué aux ions provenant de la source. En raison des différences de géométrie, la notion de filtre est remplacée par celle de piège.

Dans le piège à ions, un champ quadripolaire est créé en appliquant un potentiel Φ_0 à l'électrode annulaire (dans le plan *xy*), et un champ $-\Phi_0$ aux électrodes couvercles. Dans ces conditions, $\lambda = \sigma = 1$ et $\gamma = -2$. En utilisant les coordonnées cylindriques $x = r\cos\theta$ et $y = r\sin\theta$, l'équation ***(9)*** devient :

$$\Phi = \frac{\Phi_0}{r_0^2}\left(r^2 - 2z^2\right) \qquad \textbf{\textit{(24)}}$$

$$r_0^2 = 2z_0^2 \qquad \textbf{\textit{(25)}}$$

Pour un ion de charge *ze*, les équations du mouvement dans le piège deviennent :

$$\frac{d^2r}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2}\left(U - V\cos\omega t\right)r = 0 \qquad \textbf{\textit{(26)}}$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} - \frac{4ze}{mr_0^2}\left(U - V\cos\omega t\right)z = 0 \qquad \textbf{\textit{(27)}}$$

En effectuant les changements de variable ***(28)*** et ***(29)***, on obtient la forme simplifiée des équations de Mathieu pour un piège quadripolaire.

$$a_z = -2a_r = \frac{-16zeU}{m\left(r_0 + z_0\right)^2\omega^2} \qquad \textbf{\textit{(28)}}$$

$$q_z = -2q_r = \frac{8zeV}{m\left(r_0 + z_0\right)^2\omega^2} \qquad \textbf{\textit{(29)}}$$

Sur la majorité des appareils commerciaux, dont ceux utilisés dans le cadre de cette étude U = 0 V (électrodes chapeaux reliées à la terre). Le piégeage est donc assuré par l'application d'une radiofréquence en $V\cos\omega t$ sur l'électrode annulaire et les ions se déplacent selon l'axe q_z. Sous l'effet du champ, les ions décrivent des trajectoires en forme de courbe de Lissajous, comme celle représentée *Figure III-19*.

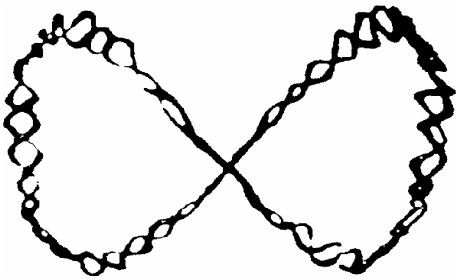


Figure III-19. *Mouvement de particules d'aluminium chargées dans un piège à ions quadripolaire.*[56]

Piégeage des ions

L'un des principaux avantages du piège quadripolaire par rapport au filtre quadripolaire, est la possibilité de piéger des ions pour effectuer de la spectrométrie de masse en tandem dans le temps, à moindre coût. Ainsi, un seul analyseur est suffisant pour effectuer de la MS^2 contre trois dans le cas d'un triple quadripôle. Cette opération peut être répétée pour effectuer de la MS^3, et par extension de la MS^n, comme le montre la *Figure III-20*.

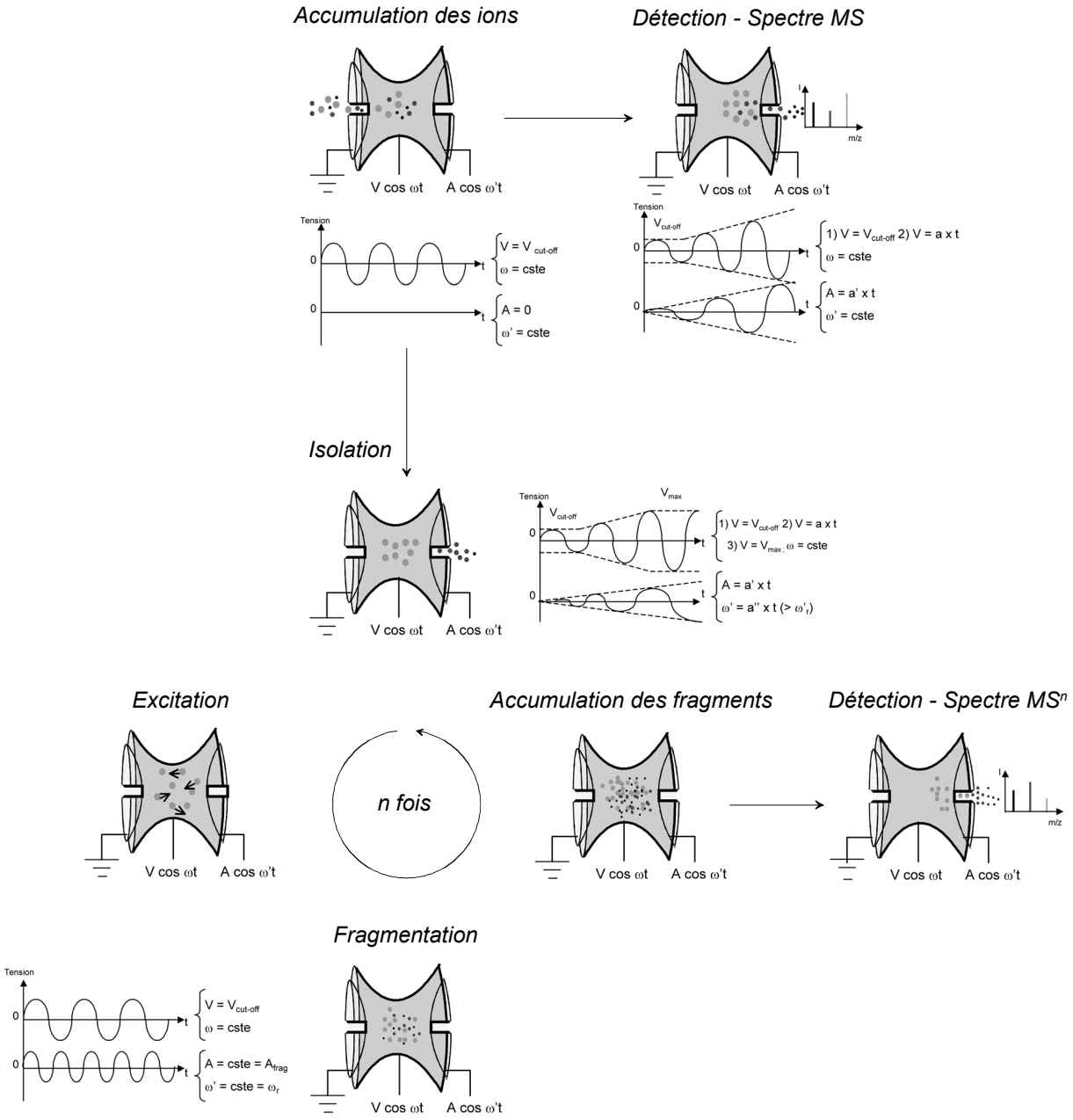


Figure III-20. *Principes de la MS et de la MS^n dans un piège à ions quadripolaire 3D.*[29]

Spectre MS

Accumulation des ions

Les pièges à ions qui ont été utilisés au cours de cette thèse sont couplés à de la chromatographie liquide, il s'agit donc d'ionisation externe (ESI, APCI). La première étape consiste à injecter les ions dans le piège par l'intermédiaire d'un guide d'ions, constitué de lentilles et de multipôles. Cependant, ces ions possèdent une certaine énergie cinétique et il faut appliquer une amplitude *V* appropriée et utiliser un gaz tampon, de l'hélium pour les piéger efficacement. Le rôle du bain d'hélium est d'améliorer le confinement des ions au centre du piège, et ainsi de mieux contrôler leur trajectoire.[78] En raison des collisions entre l'hélium et les ions injectés au sein du piège, ces derniers subissent une diminution de leurs trajectoires axiale et radiale en fonction du temps, c'est ce que l'on appelle l'étape de *cooling*.[79] On piège ainsi les ions au centre d'un puits de potentiel, dont la profondeur dépend de l'amplitude de la radiofréquence *V*. C'est également l'amplitude de *V* qui détermine la gamme de balayage en *m/z*. Le LMCO (*Low Mass Cut-Off)* d'un piège quadripolaire correspond à la plus petite valeur de *m/z* que l'on peut piéger à l'intérieur de l'analyseur. L'amplitude de travail est alors notée $V_{cut\text{-}off}$. Tous les ions dont le rapport *m/z* est inférieur au LMCO décrivent des trajectoires instables et sont éjectés de l'analyseur.

Détection – Spectre MS

Les ions sont éjectés du piège quadripolaire par résonance. Cela consiste à appliquer une tension alternative $A\cos\omega' t$ sur les électrodes couvercles. Les ions soumis à ce potentiel vont entrer en résonance et être éjectés tour à tour, chaque rapport *m/z* possédant une fréquence de mouvement fondamentale dite *séculaire*.

Spectre MS^n

Accumulation des ions

Cette étape est identique à celle décrite précédemment pour effectuer un spectre MS.

Isolation

Après avoir accumulé un certain nombre d'ions dans le piège, il s'agit d'isoler un ion de rapport *m/z* donné, ion précurseur pour effectuer la MS^2. L'étape d'isolement consiste à éjecter tous les ions de *m/z* différents de celui de l'ion précurseur. Pour ce faire, on effectue une irradiation à toutes les fréquences utiles sauf à celle correspondant à l'ion précurseur.

Excitation

La fréquence appliquée sur l'électrode chapeau est ajustée à la fréquence de résonance de l'ion précurseur que l'on veut fragmenter. C'est exactement la même fréquence que celle qui n'a pas été irradiée lors de l'étape d'isolation. La tension qui est appliquée est suffisante pour faire entrer l'ion en résonance, mais elle ne l'est pas pour l'éjecter du piège. Ainsi, l'ion précurseur augmente son énergie cinétique, sa vitesse augmente et il entre en collision avec des molécules d'hélium, ce qui a pour effet d'augmenter son énergie interne. L'énergie cinétique perdue est immédiatement remplacée de par l'excitation à la fréquence de résonance.

Fragmentation

La fragmentation intervient lorsque l'ion précurseur a accumulé une quantité d'énergie interne suffisante. Il se fragmente alors en ions fragments. L'avantage du piège à ions par rapport à la cellule de collision d'un triple quadripôle, est que la fréquence de résonance qui est appliquée est propre à l'ion précurseur, ce qui empêche normalement la formation de fragmentations successives.

Accumulation des fragments

L'étape d'accumulation des fragments est identique à celle d'accumulation des ions. Après cette étape, il est possible soit d'éjecter les ions et de les détecter, soit d'isoler à nouveau un ion précurseur pour faire de la MS^n ($n \geq 3$).

Détection – Spectre MS^n

Cette étape est identique à celle de détection dans le cadre d'un spectre MS.

d. Piège quadripolaire 2D

Les équations qui régissent le piège quadripolaire 2D sont semblables à celles qui régissent le filtre quadripolaire. En raison des fentes dans les barreaux selon l'axe x, la distance qui sépare les deux électrodes en x et en y est différente ***(30)***, ***(31)***. Au centre des barres, comme le montre la *Figure III-16* il n'y a pas de champ selon z ***(32)***.

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ze}{mx_0^{\,2}}(U - V\cos\omega t)x = 0 \qquad \textbf{(30)}$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{2ze}{my_0^{\,2}}(U - V\cos\omega t)y = 0 \qquad \textbf{(31)}$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} = 0 \qquad \textbf{(32)}$$

En effectuant les changements de variable ***(33)*** et ***(34)***, on obtient la forme simplifiée des équations de Mathieu pour un piège quadripolaire 2D.

$$a = \frac{8zeU}{m(x_0 + y_0)^2\omega^2} \qquad \textbf{(33)}$$

$$q = \frac{4zeV}{m(x_0 + y_0)^2\omega^2} \qquad \textbf{(34)}$$

Comme dans le cas des pièges 3D, le potentiel U = 0 V, ce qui implique que a = 0 et que les ions se déplacent uniquement selon q. Dans un piège 2D, la trajectoire des ions est décrite par un mouvement en spirale qui se déplace d'avant en arrière le long de l'axe z.

Les étapes de piégeage d'ion, et de fragmentation sont identiques à celles décrites précédemment dans le cadre du piège 3D, sauf que les tensions ne sont pas appliquées sur les électrodes chapeaux pour éjecter les ions, mais sur les barreaux selon l'axe x, comme expliqué dans le paragraphe relatif au principe de fonctionnement du piège 2D.

4. DÉTECTEURS

Les différents appareils utilisés au cours de cette thèse sont équipés de détecteurs composés d'une dynode de conversion et d'un multiplicateur d'électrons. Dans le cas particulier du LTQ il y a deux détecteurs, un de chaque côté du piège, ce qui permet d'augmenter la sensibilité en recueillant tous les ions qui sont éjectés de part et d'autre de l'analyseur.

4.1. Dynode de conversion

Une dynode de conversion, comme le montre la *Figure III-21*, est une surface métallique concave qui est située perpendiculairement au faisceau d'ions qui provient de l'analyseur.

Si les ions à détecter sont chargés positivement, un potentiel de –15 kV est appliqué à la dynode de conversion. Inversement, en mode négatif la dynode de conversion est soumise à un potentiel de +15 kV. Lorsqu'un ion frappe la surface de la dynode de conversion, une ou plusieurs particules secondaires sont émises. Ces particules secondaires peuvent être des ions (positifs ou négatifs), des électrons, ou encore des particules neutres. Quand un cation frappe la dynode de conversion chargée négativement, les particules secondaires d'intérêt sont des anions et des électrons. De la même façon, quand un anion frappe la dynode de conversion, les particules secondaires d'intérêt sont des cations. Les particules secondaires sont ensuite focalisées par la surface de la dynode de conversion et sont accélérées par un gradient de tension dans le multiplicateur d'électrons.

Le système de pompage est protégé du champ électrique produit par la dynode de conversion grâce à un disque et un tube de protection situés respectivement sous la dynode de conversion et autour de son électrode (*Figure III-21*).

4.2. Multiplicateur d'électrons

Le multiplicateur d'électrons est composé d'une cathode et d'une anode (*Figure III-21*). La cathode est en oxyde de plomb et présente la forme d'un entonnoir. A l'entrée de la cathode un potentiel de –0,8 à –2,5 kV est appliqué par l'intermédiaire d'un anneau de haute tension. A la sortie de la cathode, au niveau de l'anode, le potentiel est proche de la terre ce qui créé un gradient de potentiel. L'anode, située au-dessus de la cathode, a la forme d'une petite coupe. Son rôle est de collecter les électrons produits par la cathode.

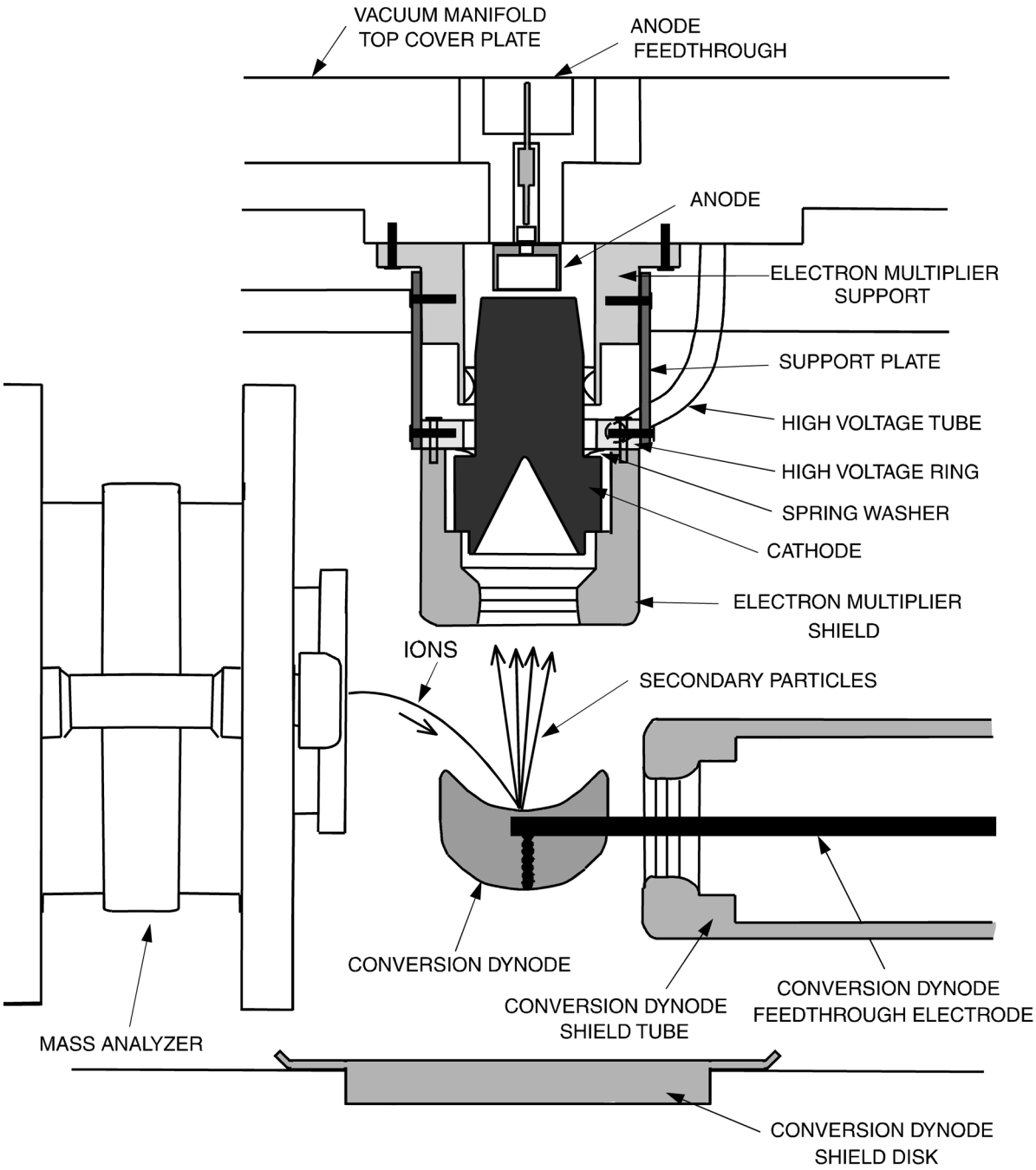


Figure III-21. *Schéma représentant une dynode de conversion avec un multiplicateur d'électrons à la sortie d'un piège à ions de type LCQ.*[70] *Dans le cas du triple quadripôle, les ions éjectés sont refocalisés vers la dynode de conversion à l'aide d'une lentille.*

Les particules secondaires issues de la dynode de conversion frappent la paroi intérieure de la cathode avec suffisamment d'énergie pour éjecter des électrons. Les électrons ainsi éjectés sont accélérés, attirés par le gradient de potentiel positif croissant. De par la forme d'entonnoir de la cathode, les électrons éjectés frappent à plusieurs reprises la paroi intérieure de la cathode, ce qui provoque l'émission d'autres électrons. Une cascade

d'électrons est ainsi rapidement créée. Il en résulte un courant mesurable à la sortie de la cathode où les électrons sont collectés par l'anode. Le courant collecté par l'anode est proportionnel au nombre de particules secondaires qui frappent la cathode.

Typiquement, la tension appliquée au multiplicateur d'électrons est ajustée pour fournir pour un gain d'environ 3.10^5 : 3.10^5 électrons sont émis pour chaque ion ou électron entrant dans la cathode. Le courant est converti en tension par un circuit électronique et enregistré par le système d'acquisition.

5. SPECTROMÈTRES DE MASSE UTILISÉS

5.1. Filtres quadripolaires

a. MSD 5973

Un simple quadripôle MSD 5973N couplé avec un chromatogramme GC 6890N (Agilent Technologies) a été utilisé lors de l'étude de métabolisme des éleuthérosides.

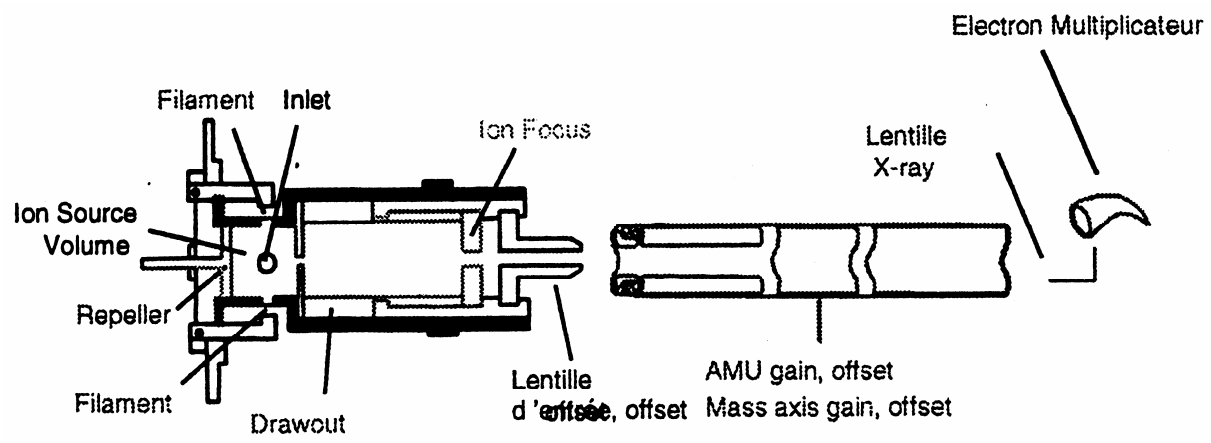


Figure III-22. *Agilent MSD 5973N inert detector.*

Sur la *Figure III-22*, représentant une vue d'ensemble d'un spectromètre de masse de type MSD 5973N, il est possible de distinguer la source d'ionisation de type EI, avec les filaments (la source est munie de deux filaments : si le premier vient à griller, il est possible d'utiliser le second pour poursuivre les analyses sans arrêter ni démonter la source), le repousseur et la chambre où se forment les ions. Ensuite, un jeu de lentilles permet d'extraire les ions de la chambre d'ionisation et de les accélérer et les focaliser vers l'entrée du quadripôle. Le détecteur, à la sortie du quadripôle est du type dynode de conversion couplée à un multiplicateur d'électron.

b. TSQ Quantum Ultra

Un triple quadripôle TSQ Quantum Ultra couplé avec une chaîne HPLC Surveyor (Thermo Electron) a été utilisé lors de la mise au point des techniques de confirmation de l'harpagoside dans les urines et les plasmas.

Sur la *Figure III-23*, représentant une vue d'ensemble du TSQ Quantum Ultra, il est possible de distinguer l'interface API composée d'un cône échantillonneur externe ainsi que du capillaire de transfert, d'un cône échantillonneur interne ou *skimmer* et d'une lentille

électrostatique. L'interface (ou *guide d'ions*) composée des quadripôles Q00 et Q0, séparés par une lentille. L'analyseur proprement dit est composé de deux quadripôles avec des barreaux à profil hyperbolique : les hyperquads Q1 et Q3, et un quadripôle Q2 à barreaux carrés et de forme arrondie qui sert de cellule de collision. A noter que tous les multipôles sont séparés par une ou plusieurs lentille(s). A la sortie de Q3 se trouve le système de détection : une dynode de conversion et un multiplicateur d'électrons.

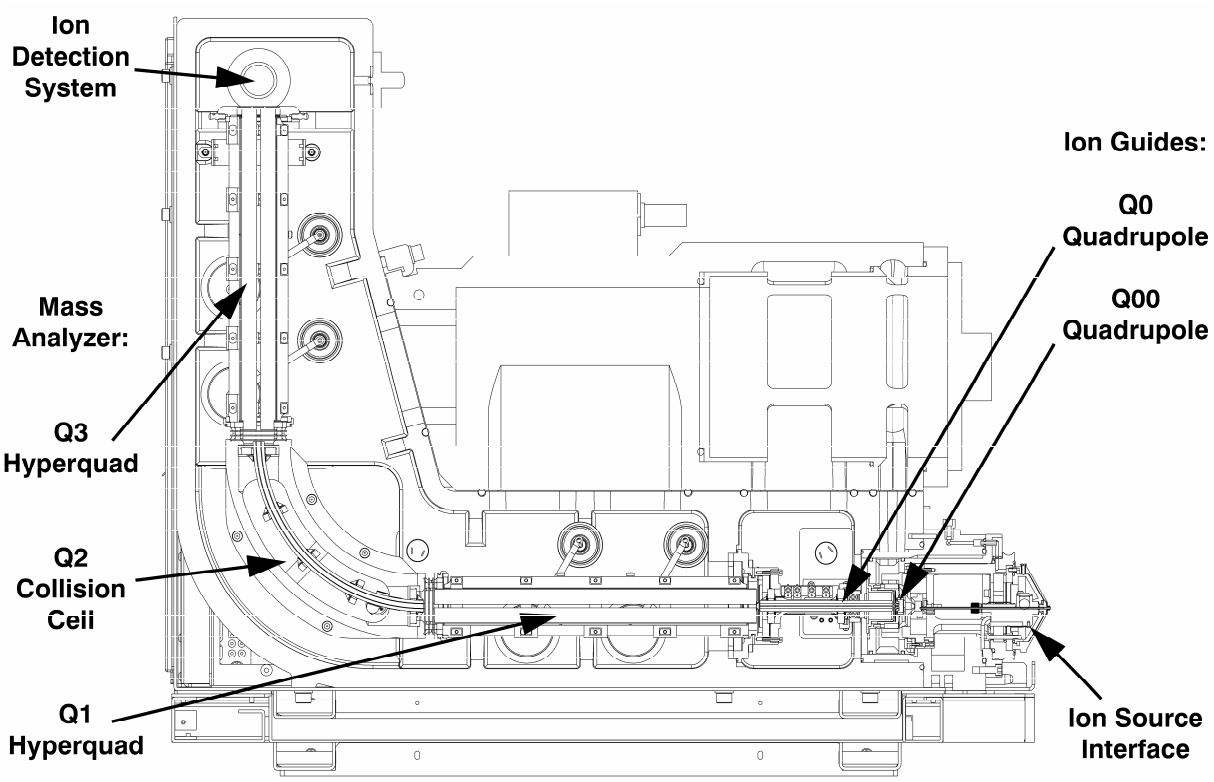


Figure III-23. *TSQ Quantum Ultra.*[71]

5.2. Pièges quadripolaires 3D

a. LCQ Deca

Un LCQ Deca couplé à une chaîne HPLC Surveyor (Thermo Electron) a été utilisé lors de la mise au point des techniques d'extraction des marqueurs de l'*Harpagophytum* des urines et des plasmas.

b. LCQ Deca XP Max

Un LCQ Deca XP Max couplé à une chaîne HPLC Surveyor (Thermo Electron) a été utilisé pour la mise au point des techniques de détection de l'*Harpagophytum* et des éleuthérosides dans les urines et les plasmas.

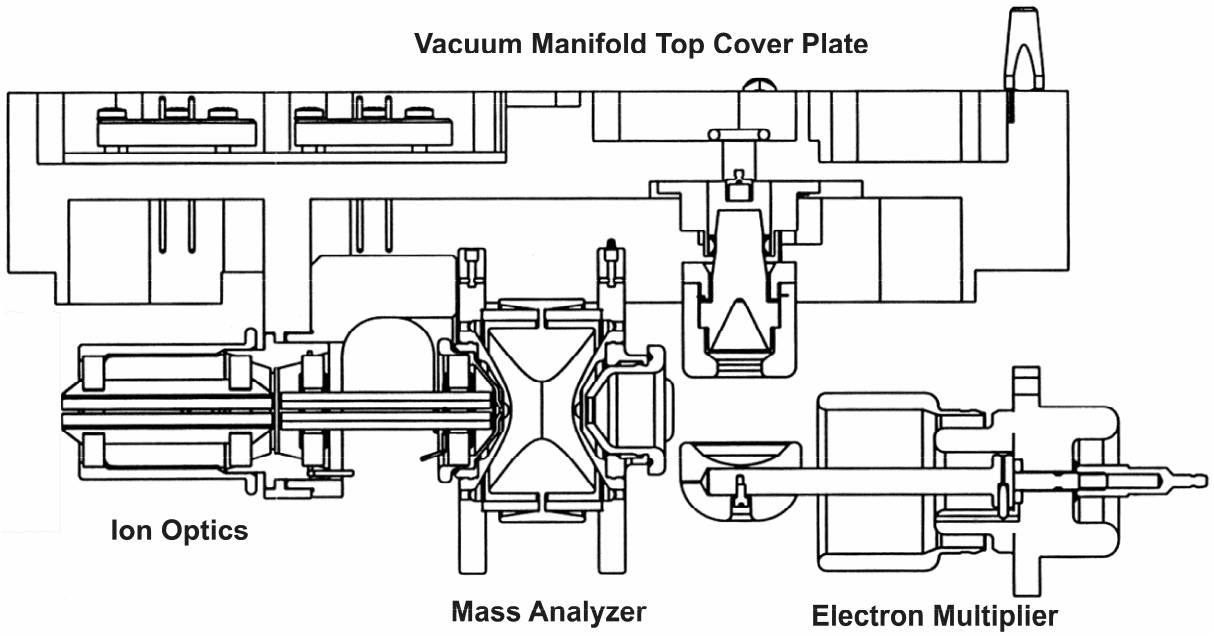


Figure III-24. *LCQ Deca XP Max.*[70]

Le schéma de la *Figure III-24* présente l'interface (composée d'un quadripôle à barreaux carrés et d'un octapôle), l'analyseur et le détecteur d'un spectromètre de type LCQ Deca ou LCQ Deca XP Max. La différence entre ces deux appareils se situe principalement au niveau de la source API : la source du LCQ Deca se situe dans l'axe de l'interface, alors que le LCQ Deca XP Max est équipé de la même source API externe que le TSQ Quantum Ultra ou le LTQ, inclinée d'environ 60°.

5.3. Piège quadripolaire 2D

a. LTQ

Un LTQ (Thermo Electron) couplé à une chaîne HPLC 1100 Series (Agilent Technologies) a été utilisé pour la mise au point des techniques de confirmation et la quantification des marqueurs de l'*Harpagophytum* et des éleuthérosides dans les urines, les plasmas et les compléments alimentaires.

Le schéma de la *Figure III-25* présente la partie du spectromètre qui se situe sous vide. Les éléments de la source API jusqu'au quadripôle Q00 sont communs avec le TSQ Quantum Ultra. Le guide d'ions, composé d'un quadripôle Q0 et d'un octapôle Q1, est particulièrement long en raison des possibilités de couplage de ce spectromètre avec un FT-ICR ou un Orbitrap, ce qui nécessite de placer l'analyseur le plus en arrière possible.

Une autre particularité de ce spectromètre est la présence de deux dynodes de conversion situées de part et d'autre de l'analyseur dans le but de récupérer un maximum de signal. L'analyseur, composé de trois quadripôles pour former un piège 2D est entouré de deux lentilles qui permettent soit de faire entrer les ions, soit de vider l'analyseur.

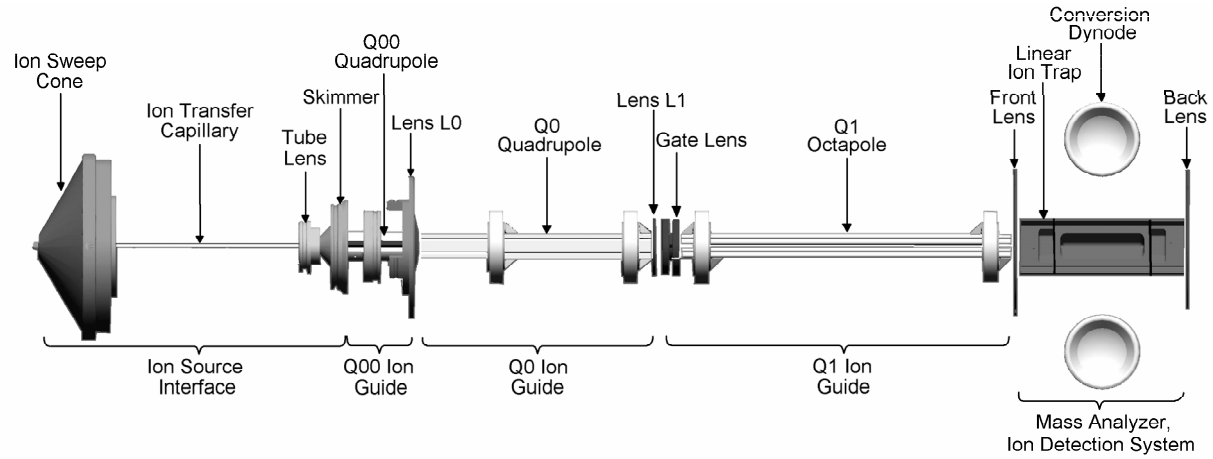


Figure III-25 *LTQ.*[44]

6. RÉFÉRENCES

1. **Bouchonnet S., Libong D.**
Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *L'Actualité Chimique*, **2004**, 275, pp. 7-14.

2. **Tranchant J.**
Manuel Pratique de la Chromatographie en Phase Gazeuse. Masson, **1995**.

3. **Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T.**
Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques. *Spectra Analyse*, **1999**, 207(28), pp. 11-25.

4. **De Hoffman E., Charrette J., Stroobant V.**
Spectrométrie de Masse. 1ère Ed. Masson, **1994**, pp. 1-10.

5. **Richardin P.**
Les Techniques d'Ionisation en Spectrométrie de Masse - Application à l'Étude des Œuvres d'Art. http://mistral.culture.fr/culture/conservation/fr/cours/richardi.htm#Historique.

6. **Hoppilliard Y.**
20 ans de rétrospective en spectrométrie de masse organique et bioorganique. *Spectra 2000*, **1991**, 159(19), pp. 16-24.

7. **Botter R.**
Développements récents en spectrométrie de masse. *Spectra Analyse*, **1996**, 191(25), pp. 13-26.

8. **Sanglier S.**
Cours de spectrométrie de masse. http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/3eme-annee/gap/MmeSanglier05-10-05/Intro_SS.pdf, **2005**.

9. **Thermo Electron.**
Finnigan™ Ion Max API Source – Hardware Manual. Rev. A, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, **2003**.

10. **Thermo Electron – European Training Institute.**
Finnigan™ LTQ™ – Operations Training Course Manual. Thermo Electron Corporation, **2005**, 109 p.

11. **Yamashita M., Fenn J.B.**
Electrospray ion source – Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, 88(20), pp. 4451-4459.

12. **Yamashita M., Fenn J.B.**
Negative ion production with the electrospray ion source. *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, 88(20), pp. 4671-4675.

13. **Emmet M.R., Caprioli R.M.**
Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1994**, 5(7), pp. 605-613.

14. **Wilm M., Mann M.**
Analytical properties of the nanoelectrospray ion source, *Analytical Chemistry*, **1996**, 68(1), pp. 1-8.

15. **Körner R., Wilm M., Morand K., Schubert M., Mann M.**
Nanoelectrospray combined with a quadrupole ion trap for the analysis of peptides and protein digests. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1996**, 7(2), pp. 150-156.

16. **Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.**
Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68(5), pp. 850-858.

17. **Hayati I., Bailey A.I., Tadros T.F.**
Investigations into the mechanisms of electrodynamic spraying of liquids – Effects of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1987**, 117(1), pp. 205-221.

18. **Hayati I., Bailey A., Tadros T.F.**
Investigations into the mechanism of electrohydrodynamic spraying of liquids: II – Mechanism of stable jet formation and electrical forces acting on a liquid cone. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1987**, 117(1), pp. 222-230.

19. **Pfeifer R.J., Hendricks C.D.**
Parametric studies of electrohydrodynamic spraying. *American Institute of Aeronautics and Astronautics*, **1968**, 6(3), pp. 496-502

20. **Kebarle P., Ho Y.**
On the mechanism of electrospray mass spectrometry. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry – Fundamentals, Instrument and Applications*. Cole RB, Ed. John Wiley and Sons, **1997**, pp. 3-63.

21. **Kebarle P.**
A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35(7), pp. 804-817.

22. **Kebarle P., Peschke M.**
On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 406(1), pp. 11-35.

23. **Taylor G.I.**
Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society A*, **1964**, 280(1382), pp. 383-397.

24. **Ikonomou M.G., Blades A.T., Kebarle P.**
Electrospray-ion spray: a comparaison of mechanisms and performances. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63(18), pp. 1989-1998.

25. **Ikonomou M.G., Blades A.T., Kebarle P.**
Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1990**, 62(9), pp. 957-967.

26. **Blades A.T., Ikonomou M.G., Kebarle P.**
Mechanism of electrospray mass spectrometry – Electrospray as an electolysis cell. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63(19), pp. 2109-2114.

27. **Cole R.B.**
Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35(7), pp. 763-772.

28. **Lord Rayleigh.**
On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine*, **1882**, 14, pp. 184-186.

29. **Wagner E.**
Nouvelles Approches de la Spectrométrie de Masse en Tandem pour la Caractérisation de Biomolécules – Application à la Protéomique. Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, **2004**, 232 p.

30. **Doyle A., Moffett D.R., Vonnegut B.**
Behavior of evaporating electrically charged droplets. *Journal of Colloid Science*, **1964**, 19(2), pp. 136-143.

31. **Taflin D.C., Ward T.L., Davis E.J.**
Electrified droplet fission and the Rayleigh limit. *Langmuir*, **1989**, 5(2), pp. 376-384.

32. **Wang G., Cole R.D.**
Mechanistic interpretation of the dependence of charge states distributions on analyte concentrations in electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1995**, 67(17), pp. 2892-2900.

33. **Kebarle P., Tang L.**
From ions in solution to ions in the gas phase – The mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1993**, 65(8), pp. 972-86.

34. **Gomez A., Tang K.**
Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids*, **1994**, 6(1), pp. 404-414.

35. **Dole M., Mack L.L., Hines L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B.**
Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, **1968**, 49(5), pp. 2240-2249.

36. **Leize E.**
Caractérisation d'Édifices Supramoléculaires par Spectrométrie de Masse avec Ionisation Électrospray. Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, **1994**.

37. **Thomson B.A., Iribarne J.V.**
Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*,**1976**, 71(11), pp. 4451-4463.

38. **Iribarne J.V., Dziedzic P.J., Thomson B.A.**
Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*. **1983**, 50(3), pp. 331-347.

39. **Gamero-Castano M., Fernandez de la Mora J.**
Mechanisms of electrospray ionization of singly and multiply charged salt clusters. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 406(1), pp. 67-91.

40. **Sakairi M., Yergey A.L., Siu K.W., Le Blanc J.C., Guevremont R., Berman S.S.**
Electrospray mass spectrometry: application of ion evaporation theory to amino acids. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63(14), pp. 1488-1490.

41. **Wang G., Cole R.B.**
Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide clusters in ESI. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 406(1), pp. 53-65.

42. **Fernandez de la Mora J., Van Berkel G.J., Enke C.G., Cole R.B., Martinez-Sanchez M., Fenn J.B.**
Special feature: discussion – Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35(8), pp. 939-952.

43. **Shibukawa A., Nagao M., Kuroda Y., Nakagawa T.**
Stereoselective determination of free warfarin concentration in protein binding equilibrium using direct sample injection and an on-line liquid chromatographic system. *Analytical Chemistry*, **1990**, 62(7), pp. 712-716.

44. **Thermo Electron.**
Finnigan™ LTQ™ - Hardware Manual. Rev. B, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, **2005**.

45. **Horning E.C., Carroll D.I., Dzidic I., Haegele K.D., Horning M.G., Stillwell R.N.**
Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *Journal of Chromatographic Science*, **1974**, 12, pp. 725-729.

46. **Horning E.C., Carroll D.I., Dzidic I., Haegele K.D., Horning M.G., Stillwell R.N.**
Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems. *Journal of Chromatography*, **1974**, 99, pp. 13-21.

47. **Good A., Durden D.A., Kebarle P.**
Ion–molecule reactions in pure nitrogen and nitrogen containing traces of water at total pressures 0.5–4 torr. Kinetics of clustering reactions forming $H^+(H_2O)_n$. *The Journal of Chemical Physics*, **1970**, 52(1), pp. 212-221.

48. **De Hoffman E., Charrette J., Stroobant V.**
Spectrométrie de masse – Cours et exercices corrigés. Dunod, **1999**.

49. **Bouchoux G., Sablier M.**
Spectrométrie de masse – Principe et appareillage. In *Techniques de l'Ingénieur*, **2005**, P2 645.

50. **Paul W., Steinwedel H.**
German Patent 944,900 (**1956**).

51. **Paul W., Steinwedel H.**
US Patent 939,952 (**1960**).

52. **Fischer E.**
Die dreidimensionale Stabilisierung von Ladungsträgern in einem Vierpolfeld. *Zeitschrift für Physik A – Hadrons and Nuclei*, **1967**, 156(1), pp. 1-26.

53. **Dehmelt H.G.**
Radiofrequency spectroscopy of stored ions. I – Storage. *Advances in Atomic and Molecular Physics*, **1967**, 3, pp. 53-72.

54. **Dehmelt H.G.**
Radiofrequency spectroscopy of stored ions. II – Spectroscopy. *Advances in Atomic and Molecular Physics*, **1969**, 5, 109-154.

55. **Dawson P.H., Whetten N.R.**
Ion storage in three-dimensional, rotationally symmetric, quadrupole fields. I – Theoretical treatment. *The Journal of Vacuum Science and Technology*, **1968**, 5, pp. 1-10.

56. **Dawson P.H., Whetten N.R.**
Ion storage in three-dimensional, rotationally symmetric, quadrupole fields. II – A sensitive mass spectrometer. *The Journal of Vacuum Science and Technology*, **1968**, 5, pp. 11-18.

57. **Stafford G.C., Kelley P.E., Syka J.E.P., Reynolds W.E., Todd J.F.J.**
Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1984**, 60(1), pp. 85-98.

58. **Louris J.N., Cooks R.G., Syka J.E.P., Kelley P.E., Stafford G.C., Todd J.F.J.**
Instrumentation, applications, and energy deposition in quadrupole ion-trap tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1987**, 59(13), pp. 1677-1685.

59. **Stafford G.C., Taylor D.M., Bradshaw S.C., Syka J.E.P.**
Enhanced sensitivity and dynamic range on an ion trap mass spectrometer with automatic gain control. In *Proceedings of the 35th Annual Conference of the American Society for Mass Spectrometry*, Denver, CO, **1987**, pp. 775-776.

60. **Louris J.N., Brodbelt-Lustig J.S., Cooks R.G., Glish G.L., Van Berkel G.J, McLuckey S.A.**
Ion isolation and sequential stages of mass spectrometry in a quadrupole ion-trap mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1990**, 96(2), pp. 117-137.

61. **Kaiser R.E., Cooks R.G., Stafford G.C., Syka J.E.P., Hemberger P.H.**
Operation of a quadrupole ion-trap mass spectrometer to achieve high mass/charge ratios. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1991**, 106, pp. 79-115.

62. **Kaiser R.E., Louris J.N., Amy J.W., Cooks R.G.**
Extending the mass range of the quadrupole ion trap using axial modulation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1989**, 3(7), pp. 225-229.

63. **Cooks R.G., Hoke S.H., Morand K.L., Lammert S.A.**
Mass spectrometers: instrumentation. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1992**, 118-119, pp. 1-36.

64. **Louris J.N., Amy J.W., Ridley T.Y., Cooks R.G.**
Injection of ions into a quadrupole ion trap mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1989**, 88(2-3), pp. 97-111.

65. **McLuckey S.A., Glish G.L., Goeringer D.E., Asano K.G.**
LASER desorption mass spectrometry and MS/MS with a three-dimensional quadrupole ion trap. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **1989**, 94(1-2), pp. 15-24.

66. **McLuckey S.A., Glish G.L., Asano K.G.**
Coupling of an atmospheric-sampling ion source with an ion-trap mass spectrometer. *Analytica Chimica Acta*, **1989**, 225, pp. 25-35.

67. **Van Berkel G.J., McLuckey S.A., Glish G.L.**
Electrospray ionization combined with ion-trap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **1990**, 62(13), pp. 1284-1295.

68. **Ouyang Z., Wu G., Song Y., Li H., Plass W.R., Cooks R.G.**
Rectilinear ion trap: Concepts, calculations, and analytical performance of a new mass analyzer. *Analytical Chemistry*, **2004**, 76(16), pp. 4595-4605.

69. **Bouchonnet S.**
Comparaison des performances des analyseurs quadripolaires en spectrométrie de masse : trappes ioniques versus quadripôles. *Spectra Analyse*, **2001**, 222(30), pp. 11-18.

70. **Thermo Electron.**
Finnigan™ LCQ™ Series – Hardware Manual. Rev. A, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, **2003**.

71. **Thermo Electron.**
Finnigan™ TSQ Quantum Ultra – Hardware Manual. Rev. A, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, **2003**.

72. **Dawson P.H.**
Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications. Dawson P.H., Ed. Elsevier Scientific Publishing Company, New-York, NY, **1976**.

73. **March R.E.**
An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **1997**, 32(4), pp. 351-369.

74. **Schwartz J.C., Senko M.W., Syka J.E.P.**
A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002, 13(6), pp. 659-669.

75. **Debrauwer L.**
Technologies de Piégeage d'Ions : Principes et Applications. Cours à l'École de Printemps de la Société Française de Spectrométrie de Masse, Carcans-Maubuisson, 25-28 avril **2006**.

76. Mathieu E.
Mémoire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique. *Journal de Mathématiques Pures et Appliquées*, **1868**, 13, pp. 137-203.

77. Campbell R.
Théorie Générale de l'Équation de Mathieu. Masson, Paris, **1955**.

78. March R.E., Todd J.F.
Practical aspects of ion trap mass spectrometry. March R.E., Todd J.F., Eds, CRC Press, **1995**, Vol. 3, 518 p.

79. Stafford G.
Ion trap mass spectrometry: a personal perspective. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002, 13(6), pp. 589-596.

IV. MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

1. GÉNÉRALITÉS

1.1. Présentation

La modélisation moléculaire est un outil informatique permettant d'appréhender la structure, les propriétés ou la réactivité des atomes et des molécules. Elle permet de déterminer des propriétés thermodynamiques comme des enthalpies de liaison, des énergies relatives de conformères, ou encore de simuler des spectres (infrarouge, Raman ou électronique). Il existe de nombreuses méthodes de chimie théorique dont le but est de déterminer des propriétés physiques ou chimiques de molécules isolées ; il est possible d'en distinguer deux grandes classes : les méthodes de chimie quantique qui permettent de déterminer avec précision les propriétés électroniques des molécules, et les méthodes de mécanique moléculaire qui sont basées sur des paramètres empiriques permettant notamment de faire des études conformationnelles, y compris de molécules de grande taille. Les principales caractéristiques de ces méthodes sont présentées dans le *Tableau IV-1*.[1-2]

Tableau IV-1. *Principales caractéristiques des méthodes de chimie quantique et de mécanique moléculaire.*[2]

	Chimie quantique	Mécanique moléculaire
Fondement	Mécanique quantique Equation de Schrödinger	Mécanique classique Champ de force Méthode empirique
Coût CPU	N'^4 pour HF	N
Précision relative	Bonne à très bonne	Moyenne
Grandeurs accessibles	Energie électronique Energie relative de conformères Enthalpie de formation Spectre vibrationnel Polarisabilité Réactivité	Energie stérique Energie relative de conformères Enthalpie de formation Fréquences de vibration
Système	Petit (< 200 atomes)	Grand

N Nombre d'atomes
N' Nombre de fonctions de base
HF Méthode Hartree-Fock
CPU Computer Processing Unit

1.2. Stratégie en fonction de la taille du système

Notre objectif est de déterminer la structure des adduits sodés des marqueurs de l'*Harpagophytum*. Les molécules susceptibles d'être modélisées ayant respectivement 49, 65 et 66 atomes pour l'harpagide, l'harpagoside et le 8-*para*-coumaroyl harpagide, c'est l'harpagide qui a été choisi pour des raisons de temps de calcul. L'objectif est donc de déterminer la structure d'adduits sodés et protonés sur un système de 49 atomes (harpagide) où 10 sites de coordination sont possibles. Des études conformationnelles ont été menées sur ces différentes structures et une recherche systématique des conformères de plus basse énergie pour chacun des isomères a été effectuée. Pour ce faire, la première étape est une recherche conformationnelle de type Monte-Carlo, basée sur des calculs semi-empiriques de type AM1 (*Austin Model 1*) à l'aide du logiciel *Hyperchem 7.5*.[3] Celle-ci a permis l'exploration de la surface d'énergie potentielle et l'identification des structures les plus stables. La méthode AM1 est bien adaptée car elle décrit correctement les liaisons hydrogène ainsi que les interactions avec le sodium.[4] Pour des molécules avec un nombre d'atomes plus important des méthodes utilisant un champ de force seraient plus adaptées. Les structures engendrées ont été réoptimisées par des calculs de type DFT (*Density Functional Theory*), qui permettent de mieux décrire l'interaction entre l'harpagide et le sodium avec le logiciel *Gaussian 2003*.[5]

1.3. Méthode de Monte-Carlo

On appelle méthode de Monte-Carlo toute méthode utilisant des procédés aléatoires et des techniques probabilistes. Le nom de ces méthodes fait référence aux jeux de hasard pratiqués à Monte-Carlo.[6]

2. MÉTHODES SEMI-EMPIRIQUES

2.1. Généralités

Les méthodes semi-empiriques sont des techniques de résolution de l'équation de Schrödinger de systèmes à plusieurs électrons. Contrairement aux méthodes *ab initio*, les méthodes semi-empiriques utilisent des données ajustées sur des résultats expérimentaux, de manière à réduire le nombre d'intégrales et ainsi alléger le temps de calcul, la durée des calculs étant corrélée au nombre d'intégrales bi-électroniques impliquées dans le processus de résolution. Ces intégrales évoluent en $N^4/8$, N étant le nombre de fonctions de base.[2]

Les différentes méthodes semi-empiriques diffèrent selon le type d'approximation utilisé. Il existe cependant des points communs entre toutes ces méthodes :

- Seuls les électrons de valence sont traités de manière explicite dans les calculs (cette approximation se base sur le fait que ce sont les électrons de valence qui interviennent dans les liaisons chimiques et définissent donc les propriétés du système)
- Un grand nombre d'intégrales bi-électroniques sont négligées (celles à trois et quatre centres dont la valeur est souvent voisine de zéro)
- Les intégrales restantes sont remplacées par des paramètres empiriques

Concernant ce dernier point, il est à signaler que cette paramétrisation se fait à deux niveaux : les intégrales bi-électroniques à un centre sont extraites de spectres atomiques expérimentaux alors que les autres sont paramétrées de manière à reproduire au mieux des données expérimentales obtenues sur un grand nombre de systèmes.

Les principales méthodes semi-empiriques sont les suivantes : CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*), INDO/MINDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) et NDDO/MNDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*) dont AM1 est une variante.[6]

2.2. AM1 – Austin Model 1

AM1 ou Austin Model 1 est une méthode de calcul de chimie quantique développée par Dewar en 1985.[7] Le modèle AM1 est basé sur une approche Hartree-Fock semi-empirique. Les approximations appliquées sont les suivantes :

- Une base minimale est utilisée pour décrire les électrons de valence
- La matrice de recouvrement S est traitée selon l'approximation ZDO (*Zero Differential Overlap*)

L'approximation ZDO annule tous les produits de fonctions de base associées aux mêmes coordonnées. Il est évident que le fait d'introduire des approximations va avoir pour effet de s'écarter de la réalité. Les approximations sont donc compensées en paramétrant les intégrales restantes. Le nombre d'intégrales négligées ainsi que le type de paramétrisation définissent les différentes méthodes semi-empiriques. La précision des résultats ainsi obtenus est tout à fait suffisante dans le cadre d'une première approche.[6]

Le modèle AM1 a été développé dans le but d'améliorer le modèle MNDO (*Modified Neglect of Differential Overlap*) qui conduisait à des énergies de répulsion trop élevées. Le terme répulsif a alors été modifié par l'introduction de fonctions gaussiennes.

3. MÉTHODES DE CHIMIE QUANTIQUE

3.1. Introduction

a. Historique

Les fondements de la Chimie Quantique sont apparus et se sont beaucoup développés dans les années 1920 grâce à des scientifiques comme Bohr, Schrödinger, Born, Oppenheimer, Hartree ou encore Slater. En 1930, Hartree et Fock développèrent la méthode du champ autocohérent qui permit d'effectuer les premiers calculs *ab initio* sur des systèmes diatomiques. Il fallu attendre les années 1950 pour que l'ordinateur fasse son apparition. A partir de là, de nombreuses méthodes de calcul se sont développées, en particulier la théorie de la fonctionnelle de densité en 1964 par Hohenberg et Kohn. En 1970, Pople créa *Gaussian* qui est aujourd'hui le logiciel de modélisation de très loin le plus utilisé. Les méthodes semi-empiriques et l'utilisation des bases de fonction gaussiennes se sont particulièrement développées dans les années 1970 et 1980. Avec la forte augmentation de la puissance de calcul, la modélisation s'est invitée dans nos ordinateurs à partir des années 1990. En 1993 apparaît la méthode B3LYP, méthode hybride qui permet d'effectuer des calculs DFT. Pople et Kohn sont récompensés par le du Prix Nobel de Chimie en 1998 pour leurs travaux sur la modélisation en Chimie Quantique (Gaussian et DFT).[1,8]

Actuellement, tout comme en spectrométrie de masse, les travaux de recherche s'orientent vers la modélisation de systèmes de taille plus en plus importante (peptides, protéines…) en utilisant des méthodes mixtes de mécanique moléculaire et de chimie quantique. La continuelle augmentation de la puissance de calcul et des algorithmes contribue également aux possibilités d'étudier des systèmes grandissants.

b. Équation de Schrödinger

Il existe une grande diversité de méthodes de chimie quantique. Le but de chacune est de résoudre l'*équation de Schrödinger* indépendante du temps ***(1)*** où **H** est l'*opérateur Hamiltonien* d'un système composé de n électrons (de masse m_i et de position r_i) et de N noyaux (de masse M_k, de position R_k et de charge Z_k) :

$$\mathbf{H}\Psi_j^{tot} = E_j^{tot}\Psi_j^{tot} \qquad (1)$$

Les états propres stationnaires du système sont caractérisés par les couples (E_j^{tot},Ψ_j^{tot}). La résolution analytique de cette équation est en général impossible et il faut procéder à différentes approximations. Quelle que soit la méthode, il faut procéder à

l'*approximation de Born-Oppenheimer* qui considère les noyaux fixes par rapport aux électrons car ils sont beaucoup plus lents. Le principe est de séparer les variables et de rechercher Ψ_j^{tot} comme étant le produit d'une fonction nucléaire $\Xi(R_k)$ et d'une fonction électronique $\Psi_j^{él}(R_k,r_i)$. La fonction électronique est obtenue en résolvant une équation dite électronique, où la position des noyaux est fixe.[2,8-9]

D'autre part, pour déterminer la fonction d'onde, il est nécessaire de trouver les OM ϕ_i (orbitales moléculaires) sur lesquelles sont bâties les $\Psi_j^{él}(R_k,r_i)$. Il faut alors procéder à l'*approximation CLOA* (Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques) où chaque OM est une combinaison linéaire de fonctions atomiques (χ_p). Pour des raisons pratiques, leurs parties radiales sont définies comme des combinaisons de gaussiennes. Il faut alors résoudre l'équation ***(2)*** :

$$\mathbf{H}^{él}\Psi_j^{él} = E_j^{él}\Psi_j^{él} \qquad \textbf{(2)}$$

où $$\mathbf{H}^{él} = \overbrace{\underbrace{\sum_i \left(-\frac{\Delta_i}{2} - \sum_\mu \frac{Z_\mu}{R_{i,\mu}} \right)}_{=\sum_i h_i}}^{\text{Terme mono-électronique}} + \overbrace{\sum_i \sum_{j<i} \frac{1}{r_{i,j}}}^{\text{Terme bi-électronique}}$$

Le calcul de la partie mono-électronique ne pose pas de grandes difficultés, contrairement à celui du terme bi-électronique qui nécessite de faire de nouvelles approximations. Dans la suite, seules des méthodes basées sur une description mono-déterminantale de la fonction d'onde électronique ont été utilisées.

3.2. Méthodes Hartree-Fock et post-Hartree-Fock

a. HF – Hartree-Fock

Principe

Dans le cadre de la méthode Hartree-Fock, la fonction d'onde du système est considérée comme le produit antisymétrisé et orthonormé des fonctions d'onde mono-électroniques ϕ_i, donc comme le déterminant de Slater de ces ϕ_i. Les ϕ_i sont les fonctions propres de l'hamiltonien approché de Fock ***(3)*** où les intégrales bi-éléctroniques J_{ij} et K_{ij} sont nommées respectivement intégrales coulombiennes et intégrales d'échange.

$$F(i) = h(i) + \sum_j^{occupées} \left((ii|jj) - (ij|ij) \right) = h(i) + \sum_j^{occupées} J_{ij} - K_{ij} \qquad \textbf{(3)}$$

avec $J_{ij} = (ii|jj) = \iint \phi_i^*(1)\phi_i(1)\frac{1}{r_{1,2}}\phi_i^*(2)\phi_i(2)d\tau_1 d\tau_2$ et $K_{ij} = (ij|ij) = \iint \phi_i^*(1)\phi_j(1)\frac{1}{r_{1,2}}\phi_i^*(2)\phi_j(2)d\tau_1 d\tau_2$

Dans l'approximation CLOA ***(4)*** la décomposition de F(i) sur les χ_p conduit aux équations de Roothaan ***(5)*** :

$$\phi_i = \sum_{p=1}^{N} c_{ip}\chi_p \qquad \textbf{(4)}$$

$$\sum_p c_{ip}\left(F_{pq} - \varepsilon_i S_{pq}\right) = 0 \qquad \textbf{(5)}$$

avec $S_{pq} = \left\langle \chi_p \middle| \chi_q \right\rangle$ et $F_{pq} = \left\langle \chi_p \middle| F \middle| \chi_q \right\rangle$

Les inconnues de ce système sont les c_{ip}. Il est nécessaire de les connaître pour résoudre les équations de Roothaan car elles interviennent dans le terme F_{pq}. La solution est de résoudre ce problème de manière itérative, à partir d'un jeu d'orbitales d'essai (ϕ_i^1,ε_i^1). La résolution des équations de Roothaan conduit à un nouveau jeu d'orbitales (ϕ_i^2,ε_i^2). Cet ensemble est à nouveau introduit dans les équations jusqu'à ce que le système ait atteint sa cohérence interne. Cette méthode est appelée méthode du champ autocohérent, ou SCF (*Self Consistent Field*).[2,8]

Conséquences

D'une part, la résolution des équations de Roothaan fait apparaître des termes bi-électroniques à quatre centres : $\left\langle pq \middle| rs \right\rangle$, dont le nombre croît proportionnellement à la puissance 4 du nombre d'orbitales atomiques. Cela pose donc des problèmes techniques de résolution de ces équations. D'autre part, l'expression mono-déterminantale de la fonction d'onde implique que l'on considère les électrons comme des particules indépendantes, c'est à dire que le mouvement d'un électron n'a qu'un effet moyen sur le mouvement des autres électrons. On néglige donc la corrélation électronique. Pour pallier cette approximation il existe plusieurs solutions dont la méthode de perturbation de Møller-Plesset à l'ordre 2 (MP2).

b. MP2 – Møller-Plesset d'ordre 2

La méthode Møller-Plesset d'ordre 2 est une méthode de perturbation dite post-Hartree-Fock. Dans cette méthode, la corrélation électronique est traitée en introduisant des configurations électroniques mono et di-excitées en plus de la configuration électronique fondamentale (Hartree-Fock). Pour minimiser la lourdeur des calculs, on traite le problème par perturbation au second ordre, l'hamitonien non perturbé étant l'hamiltonien HF.[2]

Cette méthode permet d'obtenir des résultats fiables et précis pour des molécules de petite taille. Cependant il est également possible d'obtenir de bons résultats à partir de

méthodes quantiques moins exigeantes en moyens informatiques : les méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ont atteint un niveau de fiabilité compétitif avec des méthodes *ab initio* incluant la corrélation électronique, tout en permettant de réduire considérablement la charge de calculs.

3.3. DFT – Théorie de la Fonctionnelle de Densité

a. Présentation

La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT pour *Density Functional Theory*) est une reformulation du problème quantique à N corps en un problème monocorps avec pour paramètre la densité électronique. Elle a été développée par Hohenberg, Kohn et Sham pour le calcul de la structure électronique de la matière dans le cadre de la théorie quantique non-relativiste.[10,11] L'idée centrale de la DFT est que la seule densité électronique de l'état fondamental du système détermine entièrement les valeurs moyennes des observables comme l'énergie, par exemple.[6,12]

Aujourd'hui, la DFT constitue l'une des méthodes les plus utilisées pour les calculs quantiques de structure électronique en chimie quantique et en physique de la matière condensée. La DFT a été étendue au domaine de la mécanique quantique dépendante du temps et au domaine relativiste. Elle est également utilisée pour la description thermodynamique des fluides classiques.

b. Principe

Hohenberg, Kohn et Sham ont démontré que toutes les propriétés d'un système dans un état fondamental non dégénéré sont complètement déterminées par sa densité électronique $\rho(\vec{r})$. L'énergie totale du système apparaît alors comme une fonctionnelle de cette densité électronique. De plus ils ont étendu le principe variationnel à la densité ***(6)***, ce qui permet de trouver la densité électronique, puisque la fonction $\rho(\vec{r})$ exacte correspond au minimum d'énergie. Il faut cependant faire des approximations car la fonctionnelle exacte de l'énergie est inconnue.[2,12]

$$\frac{\partial E\left(\rho(\vec{r})\right)}{\partial \rho(\vec{r})} = 0 \qquad \textbf{(6)}$$

L'énergie peut être décomposée en quatre termes : le terme d'énergie cinétique des électrons, un terme d'énergie potentielle d'attraction noyau-électron, un terme de répulsion coulombienne entre électrons et un terme d'énergie de corrélation et d'échange. Kohn et

Sham ont résolu la fonctionnelle d'énergie cinétique en introduisant des fonctions mono-électroniques. Le problème se ramène alors à la résolution d'une équation mono-électronique *(7)*, très voisine de celle de Hartree-Fock :

$$E = \sum_{i=1}^{N} \left\langle \phi_i \middle| -\frac{1}{2}\Delta \middle| \phi_i \right\rangle + \int \rho(\vec{r}) V_{Ne}(\vec{r}) d\vec{r} + \frac{1}{2}\iint \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{1,2}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{xc}[\rho] \qquad (7)$$

Le terme de répulsion électron-électron développé sur la base des orbitales de Kohn et Sham fait apparaître l'opérateur *J* précédemment décrit dans le principe de la méthode HF :

$$J = \iint \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{1,2}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 = \sum_i \sum_j (ii|jj) = \sum_i \sum_j J_{ij} = \sum_i \sum_j \iint \phi_i^*(1)\phi_i(1) \frac{1}{r_{1,2}} \phi_j^*(2)\phi_j(2) d\tau_1 d\tau_2 \qquad (8)$$

c. Les différentes générations de fonctionnelles

Il existe trois générations de fonctionnelles qui présentent une sophistication croissante du terme d'échange et de corrélation. La première correspond aux fonctionnelles d'approximation de la densité locale de type LDA (*Local-Density Approximation*) où la partie d'échange est basée sur le calcul du gaz uniforme d'électrons. La forme du potentiel d'échange-corrélation $E_{xc}[\rho]$ est alors un opérateur multiplicatif. Il est donc plus simple que l'opérateur d'échange *K* qui est intégral. La seconde génération est les fonctionnelles d'approximation du gradient généralisé ou GGA (*Generalized Gradient Approximation*), qui dépendent de la densité et de son gradient comme les fonctionnelles BP86 ou BLYP (*Becke gradient-exchange correction and Lee-Yang-Paar correlation functional*), par exemple. La dernière génération, constituée par les fonctionnelles hybrides, prend en compte explicitement le terme d'échange Hartree-Fock, calculé au moyen des orbitales de Kohn et Sham. La fonctionnelle la plus utilisée, et celle qui a été employée dans le cadre de ces travaux, est B3LYP. Les fonctionnelles hybrides donnent d'excellents résultats sur les structures électroniques et les propriétés associées.[2,12-14]

Ces méthodes sont de plus en plus utilisées car elles ne nécessitent pas de calculs *post*-Hartree-Fock, les effets de corrélation étant, au moins partiellement, pris en compte. Ces méthodes sont donc bien adaptées pour des calculs comportant soit beaucoup d'atomes, soit des atomes lourds.

3.4. Les bases d'orbitales atomiques

a. Présentation

Les orbitales moléculaires sont décrites sur la base des orbitales atomiques de Slater. Cependant, les orbitales de Slater en *exp(-r)* sont difficiles à calculer et on utilise des fonctions gaussiennes en $exp(-r^2)$. L'avantage de ces fonctions réside dans le fait que le produit de deux gaussiennes est une gaussienne, ce qui facilite le calcul des intégrales. L'inconvénient, c'est qu'il faut davantage de fonctions pour représenter correctement la densité électronique (en particulier dans les régions situées près du cœur). Plusieurs gaussiennes primitives (GP) peuvent être regroupées par combinaison linéaire pour former des gaussiennes contractées (GC). Lorsque la base utilise des fonctions gaussiennes à une contraction on parle de base *Single Zeta* (SZ), à deux contractions *Double Zeta* (DZ) et *Triple Zeta* (TZ) à trois contractions.[8]

La précision des calculs *ab initio* dépend de la qualité de la description des orbitales atomiques, et par conséquent du nombre de gaussiennes impliquées dans la base. Mais plus ce nombre sera important, plus les calculs seront longs et coûteux.

b. Les bases

Bases minimales STO-NG

Dans les bases minimales de type STO-NG (*Slayer Type Orbitals*) les orbitales atomiques sont décrites avec une fonction par orbitale atomique occupée. Chaque gaussienne est une combinaison linéaire de N primitives ; N varie généralement de 3 à 6.

Bases étendues

Ces bases standard sont également appelées bases de Pople. Elles sont dites *Split-Valence* (SV), c'est à dire que chaque orbitale de valence est représentée par plusieurs fonctions de la base minimale (DZ ou TZ) tandis que les orbitales de cœurs ne sont représentées que par une seule fonction (SZ). Ces bases sont du type N-XYG ou N-XYZG où N est le nombre de primitives pour les orbitales internes ; X, Y et Z le nombre de primitives pour les orbitales de valence.

Fonctions de polarisation

Une optimisation de la base consiste à inclure des fonctions de polarisation (des fonctions *d* sur les atomes lourds et des fonctions *p* sur l'hydrogène), ce qui améliore la qualité de la fonction d'onde en permettant la déformation du nuage électronique d'un atome dû à la présence de ses voisins. Cette augmentation du niveau de description des orbitales est importante pour décrire la liaison chimique.

En pratique pour inclure une fonction *d* il faut ajouter une * (étoile) après le nom de la base utilisée (6-31G*) et pour inclure en plus une fonction *p* sur les atomes d'hydrogène, il faut ajouter une seconde étoile (6-31G**).

Fonctions diffuses

Des fonctions très diffuses de type *s* et *p* peuvent aussi être introduites. Un + (plus) est ajouté à l'écriture de la base pour ajouter des fonctions *s* et *p* diffuses sur les atomes lourds (6-31+G). Un second + est ajouté pour inclure également une fonction diffuse sur les atomes légers (6-31++G). Il est également possible de préciser entre parenthèses les orbitales diffuses à utiliser (6-31+G(2d,2p)). L'utilisation de ce type de fonctions est nécessaire pour l'étude des anions (la densité de charge étant très étendue) et pour la description des interactions longue portée (liaisons H, interactions de Van der Waals…).

Bases utilisées au cours de la thèse

La méthode de variation de la fonctionnelle de densité B3LYP et les bases de Pople 6-31G* ont été utilisées lors de la modélisation de l'harpagide pour déterminer les géométries les plus stables de chacun des isomères, et pour réaliser les calculs de fréquence. Des calculs *simple point* ont ensuite été effectués sur les conformations les plus stables en utilisant la base 6-311+G(2d,2p) pour déterminer l'énergie de la molécule, ce qui se note B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G*.

4. RÉFÉRENCES

1. **Ohanessian G.**
Applications de la Chimie Quantique en Chimie. Cours, École Polytechnique, **2005**.

2. **Kapota C.**
Interactions du Cation Sodium avec des Molécules d'Intérêt Biologique : Acides Aminés et Oligopeptides. Thèse de l'Ecole Polytechnique, Palaiseau, **2005**.

3. **Hypercube.**
HyperChem™ Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.

4. **Brothers E., Merz Jr. K.M.**
Sodium parameters for AM1 and PM3 optimized using a modified genetic algorithm. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2002**, 106(10), pp. 2779-2785.

5. **Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Montgomery Jr. J.A., Vreven T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G.A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Gonzalez C., Pople J.A.**
Gaussian 03, Revision B.05. Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, **2003**.

6. **Wikipédia.**
Chimie Quantique. http://fr.wikipedia.org/wiki/Chimie_quantique.

7. **Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P.**
AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, **1985**, 107(13), pp. 3902-3909.

8. **Pollet R.**
Méthodes de la Chimie Quantique. Cours de Master de Chimie – 2ème année, Université Paris-Sud 11 et ENS Cachan, **2006**.

9. **Rivail J.L.**
Éléments de Chimie Quantique à l'Usage des Chimistes, 2nd Edn., InterEditions / CNRS Editions, Paris, **1994**.

10. **Hohenberg P., Kohn W.**
Inhomogeneous electron gas. *Physical Review B*, **1964**, 136(3B), pp. B864-B871.

11. **Kohn W., Sham L.J.**
Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review A*, **1965**, 140(4A), pp. 1133-1138.

12. **Pollet R.**
Théorie de la Fonctionnelle de Densité. Cours de Master de Chimie – 2ème année, Université Paris-Sud 11 et ENS Cachan, **2006**.

13. **Ziegler T.**
Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics *Chemical Review*, **1991**, 91(5), pp. 651-667.

14. **Parr R.G., Yang W.**
Density Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press, Oxford, United-Kingdom, **1989**.

Chapitre 3 - HARPAGOPHYTUM (SUR PUBLICATIONS)

I. PRÉSENTATION

Ce chapitre, relatif à l'étude de l'*Harpagophytum*, est présenté sur publications à l'exception de l'approche métabolique qui constitue la partie V.

1. INTRODUCTION

Comme cela a été montré dans la partie II du premier chapitre, l'*Harpagophytum* est une plante dont les propriétés analgésiques et anti-inflammatoires ont été démontrées par de nombreuses études. Cette action pharmacologique est très utile pour les chevaux qui, en tant que sportifs de haut niveau, ont les articulations très sollicitées. Il existe de très nombreux compléments alimentaires équins qui contiennent de l'*Harpagophytum* (Artridil, Harpagophyt, LaKOTA, Argophyt, Mega Flex…). Cependant, dans un souci d'équité et de bien être, les Codes des Courses interdisent à un cheval de participer à une épreuve sous l'action de substances prohibées. L'*Harpagophytum* ayant des propriétés anti-inflammatoires, il est considéré comme une substance prohibée.

L'objet de ce chapitre est donc de mettre au point des techniques de préparation d'échantillon et d'analyse par spectrométrie de masse des marqueurs de l'*Harpagophytum*, représentés sur la *Figure I-1*, dans les urines et les plasmas équins.

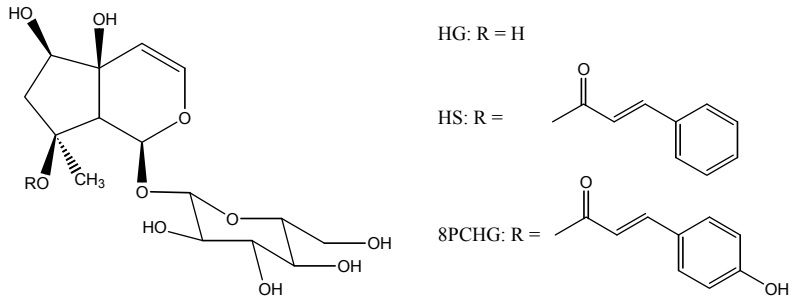


Figure I-1. *Marqueurs de l'Harpagophytum :*
harpagide (HG), harpagoside (HS) et 8-para-coumaroyl harpagide (8PCHG).

2. PRÉSENTATION DU CHAPITRE

2.1. Préparation d'échantillon

Cette partie du chapitre développe la préparation d'échantillon sous forme d'un article intitulé *Optimization of solid-phase extraction for liquid chromatography/mass spectrometry analysis of harpagoside, 8-para-coumaroyl harpagide and harpagide in equine plasma and urine*, soumis à *Journal of Chromatographic Science* (sous presse).

A ce niveau, les marqueurs de l'*Harpagophytum* sont détectés de façon qualitative, et l'applicabilité de la méthode développée est démontrée sur des échantillons issus d'expérimentations. La mise en œuvre des techniques d'extraction des marqueurs de l'*Harpagophytum* s'est révélée très délicate en raison de la polarité des molécules, en particulier de l'harpagide qui n'est constitué que d'un glucose et du noyau iridoïde. De même, le choix d'un étalon interne a été très difficile : les standards des marqueurs de l'*Harpagophytum* sont exclusivement issus de la plante. Il n'existe donc pas de standards marqués par des isotopes stables. Des molécules proches de l'harpagoside, telles que le kutkoside, le picroside II ou l'agnuside (*Figure I-2*) n'ont pas apporté de réponse satisfaisante : leur comportement ne correspond pas à celui d'un étalon interne qui est censé compenser les effets liés à la matrice de la même façon que la molécule étudiée.

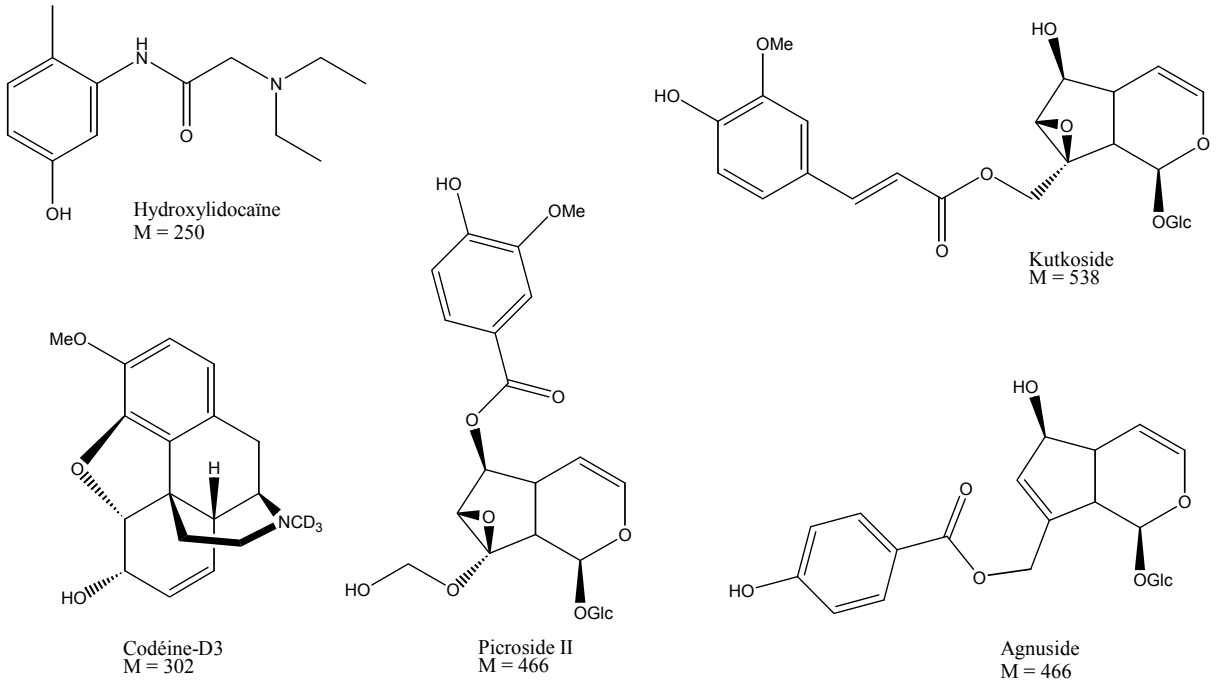


Figure I-2. *Structure chimique des molécules qui ont été testées pour servir d'étalon interne.*

Bien que son comportement soit différent de l'harpagoside, l'hydroxylidocaïne a été utilisée comme étalon interne. Cette molécule présente l'avantage d'avoir un faible coefficient de variation quelle que soit l'urine extraite et sa réponse en LC/MS est très élevée. Elle permet donc de savoir s'il n'y a pas eu de problème lors de l'extraction sur phase solide. La codéine-D3 est utilisée comme étalon interne pour l'extraction ASE de l'harpagoside dans le cadre des compléments alimentaires.

2.2. Analyse par LC/MS

Cette partie est dédiée à l'étude par spectrométrie de masse des marqueurs de l'*Harpagophytum*. L'article est intitulé *Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of Harpagophytum in equine urine and plasma*, et a été publié dans le journal *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.

Suite à l'obtention de spectres de masse jusqu'à l'ordre 5, des schémas de fragmentation en mode ESI positif et négatif des différents marqueurs de l'*Harpagophytum* sont proposés. L'influence de l'ajout de sels de sodium et de lithium à la place de l'acide formique dans l'éluant de la chromatographie liquide a été étudiée. Les molécules recherchées, en particulier HS et 8PCHG ne produisant que peu de fragments dans un piège quadripolaire 3D, et dans le but de respecter les critères de caractérisation de l'AORC (*Cf. Annexe I*), une comparaison de différents analyseurs (triple quadripôle, pièges quadripolaires 2D et 3D) a été réalisée.

Les courbes d'élimination de l'harpagoside dans l'urine sont également présentées. Pour ce faire, une méthode de quantification par ajouts dosés a été développée et appliquée aux échantillons issus des différentes expérimentations animales.

2.3. Approche théorique de la cationisation

Cette partie, issue de résultats de modélisation moléculaire (semi-empirique et *ab initio*) a été publiée dans *The Journal of Physical Chemistry A*, sous le titre *Proton and sodium cation affinities of harpagide: a computational study*.

Il s'agit d'une approche théorique de la cationisation de l'harpagide par le sodium destinée à mieux comprendre la formation préférentielle des ions $[M+Na]^+$ par rapport aux ions $[M+H]^+$, observée pour les différents marqueurs de l'*Harpagophytum* en mode ESI positif. La représentation des molécules ainsi obtenues permet également de mieux comprendre la force de la complexation du sodium par la molécule de glucose. En effet, les calculs ont permis de montrer qu'au contact d'un ion sodium, le glucose bascule de la conformation *chaise*, énergétiquement plus stable, à la conformation *bateau*. Cela permet

également de mieux comprendre la localisation de la charge sur le sodium. Par conséquent lors d'un spectre MS^n des marqueurs de l'*Harpagophytum*, les ions fragments obtenus sont toujours du type $[M+Na]^+$, complexés à un sodium.

2.4. Approche métabolique

Les quantités d'harpagoside retrouvées post-administration dans les urines étant très faibles, une grande partie a dû être métabolisée par le cheval. L'approche métabolique développée sur l'*Harpagophytum* est principalement basée sur les données de la littérature et sur les différentes possibilités d'utiliser les spectromètres de masse du laboratoire. Elle consiste à analyser les échantillons de plasma et d'urine issus des expérimentations animales en utilisant tous les modes de balayage proposés sur les différents analyseurs. Cependant les quantités de métabolites mises en jeu par rapport à la complexité de la matrice n'ont pas permis d'identifier de métabolites de l'*Harpagophytum*.

Cette approche *in vivo* a été complétée, en collaboration avec le Hong-Kong Jockey Club (laboratoire équivalent au LCH à Hong-Kong), par une approche *in vitro* en utilisant des microsomes de foie équin.

II. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON

Optimization of Solid-Phase Extraction for the Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Harpagoside, 8-*para*-Coumaroyl Harpagide and Harpagide in Equine Plasma and Urine

Cyril Colas[‡,†], Patrice Garcia[‡], Marie-Agnès Popot[‡], Yves Bonnaire[‡] and Stéphane Bouchonnet[†].

[‡] LCH – Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières le Buisson, France.

[†] DCMR – Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Département de Chimie, École Polytechnique, CNRS, route de Saclay, 91128 Palaiseau cedex, France.

Journal of Chromatographic Science, **2007**, in press.
Received: 8 August 2006
Revised: 5 January 2007
Accepted: 16 January 2007

1. ABSTRACT

Solid-phase extraction cartridges among those usually used for screening in horse doping analyses are tested to optimize the extraction of harpagoside (HS), harpagide (HG) and 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG) from plasma and urine. Extracts are analyzed by liquid chromatography coupled with multi-step tandem mass spectrometry. The extraction process retained for plasma applies BondElut PPL cartridges and provides extraction recoveries between 91 and 93 % with RSD values between 8 and 13 % at 0.5 ng/mL. Two different procedures are needed to extract analytes from urine. HS and 8PCHG are extracted using AbsElut Nexus cartridges, with recoveries of 85 and 77 %, respectively (RSD between 7 and 19 %). The extraction of HG involves the use of two cartridges: BondElut PPL and BondElut C18 HF, with recovery of 75 % and RSD between 14 and 19 %. The applicability of the extraction methods is determined on authentic equine plasma and urine samples after *Harpagophytum* or harpagoside administration.

Keywords: solid-phase extraction, *Harpagophytum*, iridoid glycoside, liquid chromatography, mass spectrometry

2. INTRODUCTION

Harpagophytum procumbens or *zeyheri*, also called Windhoek's root or Devil's claw, is a medicinal plant from South Africa, Namibia and Botswana, introduced into Europe for nearly a century. Its secondary dried, cut, tuberous roots containing harpagophyton have been included in the *French Pharmacopoeia* for about fifteen years.

Herbal preparations containing *Harpagophytum* with other plants are used for prevention of inflammatory symptoms in competition horses and in the treatment of animals with lameness. According to Andersen *et al.*, *Harpagophytum procumbens* acts by migration of interleukins and leucocytes to the painful and inflamed joint area and shows anti-inflammatory, analgesic and antiphlogistic properties.[1] As a result of a number of recent studies in rats and men, *Harpagophytum* is proposed as a complementary treatment for chronic rheumatisms, tendinitis, osteoarthritis and arthritis.[1-5] *Harpagophytum* acts at the muscular level; therefore sportsmen use it to avoid or ease pain due to heavy effort.

Chemically, *Harpagophytum* contains a number of compounds, especially iridoid glycosides like harpagoside, harpagide and 8-*para*-coumaroyl harpagide, which are displayed on *Figure II-1*.[6] Apart from recent studies such as the one by Seger *et al.*, and Baranska *et al.*, there is little information in the literature on the analysis and extraction of these compounds from plants and biological fluids.[7,8] The usual scheme of drug screening in plasma or urine involves several automated solid-phase extraction (SPE) methods and/or liquid-liquid extraction (LLE) that cover a wide range of drugs and metabolites.[9,10] The analysis of the extracts generally requires gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometry (MS). Because LC/MS is known to be very sensitive to ion suppression, it is important to eliminate the maximum of interfering compounds during the extraction process.

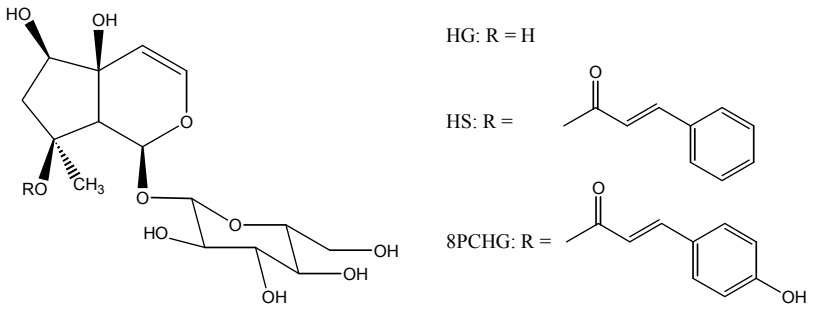


Figure II-1. *Chemical structures of harpagide (HG), harpagoside (HS) and 8-para-coumaroyl harpagide (8PCHG).*

SPE has been used for more than a decade and has evolved as a powerful technique for the extraction of a wide range of drugs from plasma and urine.[11,12] It generally offers many advantages over LLE, such as higher selectivity, better reproducibility, and the possibility to use smaller sample volumes. Horse urine is a complex matrix that blocks frequently polymeric materials considered to be more resistant than silica.[13] However C_{18} bonded silica is still frequently used, especially for the extraction of anabolic steroids, corticosteroids and other drugs. According to Wynne, a strong cation exchange or a mixed-mode (strong cation exchange + non polar C_8) cartridge can be usable for the screening of basic compounds of different polarities.[14] To reduce the cost of analysis, a single SPE has also been proposed to prepare both an *acid-neutral* extract and a basic extract suitable for horse urine drug screening.[15]

The aim of this study was to optimize the extraction of harpagoside, harpagide and 8-*para*-coumaroyl harpagide from plasma and urine. An analytical method involving the coupling of liquid chromatography with multi-step tandem mass spectrometry was developed; it has been used to compare the recoveries and selectivity of different extraction procedures.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Chemicals

HPLC-grade water was obtained by purifying water in a Milli-Q filtration system (Millipore, Bedford, MA, USA), HPLC-grade methanol, *n*-hexane, acetonitrile, ethyl acetate and ammonia solution 30 % were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy), diethyl ether and chloroform from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), isopropyl alcohol, acetic acid 100 %, hydrochloric acid 37 %, phosphoric acid 84 %, formic acid and salts for buffers from VWR (Paris, France) and methylene chloride from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands).

Harpagoside (HS) was supplied by Extrasynthèse (Genay, France), harpagide (HG) and 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG) were purchased from Phytolab (Hamburg, Germany). Hydroxylidocaine (OHL), used as the internal standard for LC/MS quantitation, was synthesized at our laboratory.[16,17] Stock solutions of standards were prepared by dissolving the selected analytes in methanol; they were stored at 4 °C before use.

Harpadol from Arkopharma (Carros, France), and Harpagophyt from CTB Equitop (Le Perray, France), commercial preparations containing *Harpagophytum*, were used for administration to horses.

3.2. Solid-phase extraction

SPE were performed with a Rapid Trace SPE workstation (Zymark, Hopkinton, MA, USA) equipped with 3-mL cartridges. C_{18} bonded silica BondElut C18 HF (500 mg) from Varian (Palo Alto, CA, USA) and C_8 bonded silica Isolute C_8 (200 mg) from IST (Glamorgan, UK) were tested as reverse phases. Polymeric sorbents, mostly polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) copolymers such as Isolute ENV+ (50 and 100 mg) from IST, Oasis HLB (60 mg) from Waters (Milford, CA, USA), BondElut PPL (100 and 200 mg) and AbsElut Nexus (60 mg) from Varian were also used. Extractions were also performed using other sorbents such as covalently bond BondElut PBA (500 mg) from Varian or cation exchange mixed-mode cartridges CSDAU 503 (500 mg) from UCT (Bristol, UK), BondElut Certify (500 mg) from Varian and Oasis MCX (60 mg) from Waters.

3.3. LC/MS^n conditions

Extraction recoveries were determined by LC/MS^n on a LCQ Deca ion trap mass spectrometer coupled with a Surveyor MS pump and a Surveyor autosampler (Thermo Electron, San Jose, CA, USA). The analytical column used was a Zorbax Eclipse XDB-C18 Solvent Saver Plus (3.5 µm, 150 x 3.0 mm), (Agilent Technologies, Massy, France). Flow

rate was of 300 µL/min with a gradient of methanol and 0.1 % aqueous formic acid solution (pH 2.6): 10 % methanol 0-2 min, 60 % at 4 min, 80 % at 5 min, 100 % from 10 to 15 min and 10 % from 16 to 20 min. 10 µL of sample were injected.

The mass spectrometer was operated in the electrospray ionization (ESI) positive mode; 4.5 kV were applied to the ESI needle. The flows of sheath and auxiliary gas were set at 80 and 10 arbitrary units, respectively. The heated capillary temperature was maintained at 200 °C. Analytes were detected in the MS^n mode, with a q_z factor of 0.25 for all precursor ions. *Table II-1* gives the main parameters associated with the collision-induced dissociation (CID) step for each compound of interest. It is to be noted that detection of HG was performed in MS^2 while HS and 8PCHG had to be detected in MS^2 and MS^3 since MS^2 provided insufficient structural information (only one daughter ion) for both analytes.

Table II-1. *MS^n parameters for detection of HG, HS and 8PCHG with the LCQ Deca mass spectrometer.*

	Analyte	HG	HS	8PCHG
MS^2	Parent ion (m/z)	387.0	517.1	533.1
	Isolation width (m/z)	1.0	1.0	1.8
	Collision energy (%)[a]	26.0	23.5	23.5
	m/z scanning range	180.0 - 400.0	200.0 - 530.0	200.0 - 550.0
	Main fragment ions (m/z) and relative abundances (%)	369.0 (40) - 207.0 (100) 203.0 (60)	517.0 (40) - 369.0 (100)	533.0 (70) - 369.0 (100)
MS^3	Parent ions (m/z)		369.0	369.0
	Isolation width (m/z)		1.0	1.0
	Collision energy (%)[a]		21.0	22.0
	m/z scanning range		200.0 - 380.0	200.0 - 380.0
	Main fragment ions (m/z) and relative abundances (%)		369.0 (100) - 351.0 (80)	369.0 (30) - 351.0 (100)

[a] arbitrary units.

The LCQ Deca mass spectrometer provided detection limits low enough to quantify the relatively large amounts of analytes resulting from the extraction of spiked samples. This instrument was suitable for the first step of this study devoted to comparison of recoveries of different cartridges. However, our initial results showed that the analytical performances required for detecting the analytes at their observed concentrations in horse biological fluids would require a better sensitivity.[18] A column with 1.8 µm particles has been tested to enhance sensitivity but has not been retained because it provided chromatographic peaks too narrow to be well plotted given the scan rate of the mass spectrometer. A LC/MS^n LTQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo Electron) coupled with an Agilent 1100 Series

binary pump, standard autosampler, vacuum degasser and a thermostated column compartment (Agilent, Palo Alto, CA, USA) was thus used to quantify the analyte during the validation step of the selected extraction method. The LC method was similar to the one described above but the flow rate was set to 400 µL/min instead of 300 µL/min. The column was equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 12.5 x 4.6 mm) analytical guard column and a 0.5 µm high pressure frit.

The mass spectrometer was operated in the ESI positive mode, 4.5 kV were applied to the ESI needle. The flows of sheath and auxiliary gas were set at 40 and 5 arbitrary units, respectively. The capillary temperature was maintained at 350 °C. The q_z factor was set to 0.25 for all MS^n experiments. *Table II-2* gives the main parameters associated with the CID step for each compound of interest. OHL, used as internal standard was detected in selected reaction monitoring (SRM) mode using one transition. Detection of HG was performed in full scan MS^2, whereas detection of HS and 8PCHG was performed in full scan MS^3. Quantitation was carried out in the consecutive reaction monitoring (CRM) mode on two consecutives transitions. CRM is a very selective mode, similar to SRM in MS^3.

Table II-2. *MS parameters for detection of OHL, HG, HS and 8PCHG with the LTQ mass spectrometer.*

	Analyte	OHL	HG	HS	8PCHG
	Mode	SRM	MS^2	CRM	CRM
MS^2	Parent ion (m/z)	251.1	387.1	517.1	533.1
	Isolation width (m/z)	1.0	1.4	1.7	1.7
	Collision energy (%)[a]	30.0	25.0	25.0	25.0
MS^3	Parent ion (m/z)			369.1	369.1
	Isolation width (m/z)			1.3	1.3
	Collision energy (%)[a]			25.0	25.0
	m/z scanning range	85.5 - 86.5	180.0 - 400.0	350.6 - 351.6	350.6 - 351.6
	Main fragment ions (m/z) and relative abundances (%)	86.0	269.0 (40) - 207.0 (100) 203.0 (60)	351.1	351.1

[a] arbitrary units.

3.4. Extraction procedure

a. Plasma

3 mL of plasma (from 4 to 10 sample pool) were diluted with 2.5 mL of water and 200 ng of standards in methanol (20 µL) were added. The mixture was centrifuged for 30 min at 3000 g. The supernatant was transferred to a clean tube and 2 mL of water were added. SPE was then automatically performed following the procedures detailed in *Table II-3*.

Table II-3. *Procedures to perform SPE on plasma samples.*

	Cartridge	Conditioning		Washing / Drying		Elution		Réf.
(a)	Oasis HLB	MeOH	2 mL	H_2O	3 mL	MeOH/EtOAc 50/50	3 mL	
		H_2O	2 mL	MeOH/H_2O 30/70	3 mL			
				drying	*3 min*			
				n-hexane	3 mL			
				drying	*3 min*			
(b)	Isolute ENV+	MeOH	3 mL	H_2O	3 mL	MeOH/CH_3CN 50/50	3 mL	[19]
		H_2O	3 mL	*drying*	*5 min*			
(c)	AbsElut Nexus	MeOH	2 mL	H_2O	3 mL	CH_2Cl_2/*i*PrOH 80/20	3 mL	[20,21]
		H_2O	2 mL	MeOH/H_2O 30/70	3 mL			
				drying	*5 min*			
(d)	Focus	*Cf.* (b) Isolute ENV+						
(e)	BondElut PPL	MeOH	6 mL	H_2O	3 mL	MeOH/CH_3CN 50/50	3 mL	[21-23]
		H_2O	12 mL	*drying*	*8 min*			

Table II-4. *Procedures to perform SPE on urine samples.*

	Cartridge	pH	Conditioning		Washing / Drying		Elution		Réf.
(f)	BondElut C18 HF	9.2	MeOH	5 mL	H_2O	5 mL	CH_2Cl_2/*i*PrOH 80/20	3 mL	[21]
			H_2O	5 mL	*drying*	*3 min*			
					n-hexane	3 mL			
					drying	*3 min*			
(g)	Isolute C8	7.1	MeOH	5 mL	H_2O	3 mL	$CHCl_3$	3 mL	
			H_2O	5 mL	*drying*	*3 min*			
					n-hexane	3 mL			
					drying	*3 min*			
(h)	CSDAU 503	6.1	MeOH	2 mL	CH_3CO_2H 1M	1 mL	EtOAc/NH_4OH 98/2	2 mL	[25-27]
			PO_4 buffer - pH 6.1	2 mL	*drying*	*5 min*			
					MeOH	3 mL			
					drying	*3 min*			
(i)	BondElut Certify		*Cf.* CSDAU 503						
(j)	Oasis MCX	6.1	MeOH	2 mL	HCl 0.1M	2 mL	CH_3CN/*i*PrOH/NH_4OH 40/60/4	2 mL	
			H_2O	2 mL	*drying*	*5 min*			
					MeOH	2 mL			
					drying	*3 min*			
(k)	BondElut PBA[a]	8.6	H_3PO_4 2M in MeOH	6 mL	$SO_3(NH_4)_2$ buffer - pH 8.4	3 mL	MeOH/H_2O/CH_3CO_2H 90/5/5	8 x 3 mL	
			H_2O	6 mL					
			$SO_3(NH_4)_2$ buffer - pH 8.4	6 mL					
(l)	Isolute ENV+	7.1	MeOH	2 mL	MeOH/H_2O 5/95	3 mL	MeOH/H_2O 80/20	2 x 2.5 mL	[19]
			H_2O	2 mL	*drying*	*3 min*			
(m)	Oasis HLB	8.0	MeOH	2 mL	H_2O	3 mL	CH_2Cl_2/*i*PrOH 80/20	3 mL	
			H_2O	2 mL	MeOH/H_2O 30/70	3 mL			
					drying	*3 min*			
					n-hexane	3 mL			
					drying	*3 min*			
(n)	BondElut PPL	7.4	MeOH	6 mL	H_2O	3 mL	MeOH/CH_3CN 50/50	3 mL	[21-23]
			H_2O	12 mL	*drying*	*8 min*			
(o)	AbsElut Nexus	7.5	*Cf.* (m) Oasis HLB						[20,21]
(p)	BondElut C18 HF	7.5	MeOH	5 mL	H_2O	1 mL			
			H_2O	5 mL					
	+		*The pool of the loading and washing fractions was then extracted on the second cartridge*						
	BondElut PPL		*Cf.* (n) BondElut PPL						
(q)	BondElut PPL	7.5	*Cf.* (n) BondElut PPL						
	+		*After evaporation, the residue was dissolved in 100 µL of MeOH to which 3 mL of H_2O had been added*						
	BondElut C18 HF		MeOH	6 mL	*drying*	*5 min*	MeOH/H_2O 50/50	3 mL	
			H_2O	6 mL	*n*-hexane	4 mL			
					drying	*3 min*			
					MeOH/H_2O 30/70	3 mL			

[a] Loading step at 0.3 mL/min (0.8 mL/min in all other cases).

b. Urine

The tests on urine extraction were performed with a mixture of 6 to 12 individual urine collections in order to obtain a representative matrix. As a matter of fact, the great variability of the matrix composition, especially in the case of urine, can significantly influence recovery ratios. The composition of equine urine depends of the considered horse. Indeed, it is strongly correlated to several factors such as feed, time of collection, season, exercise and pH which may vary between 4.5 and 10.[24]

5 mL urine samples were spiked with 200 µL of a standard solution at 10 ng/µL (*i.e.* 2 µg), and 2 mL of appropriate buffer were added (the pH was adjusted according to the cartridge tested). The sample was centrifuged at 3000 g for 30 min before SPE according to the procedures detailed in *Table II-4*.

c. Solid-phase extraction

SPE was performed with a Rapid Trace workstation. Drying was done with a nitrogen flow. Conditioning was performed at 6 mL/min, loading at 0.8 mL/min, rinsing at 3 mL/min and collecting at 0.8 mL/min. Solvents used for these steps are detailed in *Tables III* and *IV*. After extraction, samples were evaporated to dryness at 48 °C with a TurboVap LV Evaporator (Zymark). The residual extract was reconstituted in 200 µL of a 50:50:0.1 $MeOH/H_2O/HCO_2H$ mixture and analyzed by LC/MS^n.

3.5. Extraction recoveries

a. Apparent extraction recoveries

In what follows, the term *apparent extraction recovery* is used for an extraction recovery estimated by comparing the chromatographic signal obtained for the plasma or urine extract to the one obtained for the standard solution in the same solvent. This apparent extraction recovery takes into account the *real extraction recovery*, which does not include the matrix effect affecting LC/MS analysis; it provides information on the selectivity of the entire method.

b. Real extraction recoveries

Accurate determination of real extraction recoveries would have required performing quantitation with internal standards corresponding to labeled analytes but such standards are not available. Real extraction recoveries of HG, HS and 8PCHG were determined using OHL as internal standard. This measurement has been performed on twelve different biological samples according to the following procedure. Three 1 mL aliquots of non-spiked samples,

one 1 mL aliquot spiked with *x* ng of standards and one 1 mL aliquot spiked with 10*x* ng were extracted on the selected SPE cartridges (*x* is equal to 0.5 for plasma and 2 for urine). After extraction, *x* ng of standards were added to one of the non-spiked samples; 10*x* ng to another one. For HG in urine, 2 additional samples fortified after the first extraction were used in order to determine the real extraction recoveries for each SPE cartridge. 2.5 ng of internal standard were added to each one of the extracts. The extracts were then evaporated to dryness and reconstituted in 25 µL of methanol and 175 µL of acidified water (0.1 % of formic acid) before analysis by LC/MS^n on the LTQ mass spectrometer. The absence of analyte chromatographic peaks was checked in the blank sample.

4. RESULTS AND DISCUSSION

For each cartridge, different elution solvents among those currently used for SPE have been tested. In order to optimize extraction procedures (*i.e.* to get an acceptable recovery) all the solvent fractions were collected for the determination of appropriate volumes. Only the best results are presented in what follows.

4.1. Plasma

a. Comparison of SPE cartridges

The different cartridges tested for plasma extraction are given in *Table II-5*.

Table II-5. *Apparent extraction recoveries in plasma using different SPE cartridges.*

		Apparent extraction recoveries[a] (%)		
Cartridge	Extraction method[b]	HG	HS	8PCHG
Oasis HLB	(a)	nd	83	60
Isolute ENV+ - 50 mg	(b_1)	54	64	72
Isolute ENV+ - 100 mg	(b_2)	55	67	68
AbsElut Nexus	(c)	nd	56	39
Focus	(d)	nd	81	69
BondElut PPL - 100 mg	(e_1)	86	85	69
BondElut PPL - 200 mg	(e_2)	100	102	96

[a] Apparent extraction recoveries were calculated on at least 3 plasma samples
[b] Extraction methods are detailed in *Table II-3*
nd: non detected

Non-polar copolymer sorbents

(a) Oasis HLB (Hydrophilic - Lipophilic Balanced copolymer)

Because Oasis HLB cartridges are routinely used in our laboratory, they were first tested for plasma extraction. The apparent extraction recoveries obtained for HS (83 %) and 8PCHG (60 %) are acceptable but this DVB/NP (divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) copolymer sorbent does not sufficiently retain HG which is partially eliminated when the sample is loaded on the cartridge, and completely eliminated after the washing step with water.

(b1,b2) Isolute ENV+

The sorbent (*i.e.* hydroxylated PS-DVB copolymer) allows extracting the three molecules in plasma with apparent extraction recoveries of 54, 64 and 72 % for HG, HS and 8PCHG, respectively. It is to notice that the ENV+ sorbent, developed for environmental purposes, is able to retain very polar analytes in large quantities of water, explaining why it is capable of retaining HG.

(c) AbsElut Nexus

AbsElut Nexus cartridges contain a modified PS-DVB copolymer.[21] HG is not retained on the sorbent and is eluted as soon as the sample is loaded on the column. As shown in the part devoted to urine extraction, these cartridges are more efficient with urine than with plasma whereas horse urine is known to be more difficult to extract than horse plasma. The recoveries for plasma extraction are only 56 % and 39 % for HS and 8PCHG, respectively.

(d) Focus

Focus cartridges are made of a modified PS-DVB copolymer. The results obtained for HS and 8PCHG are acceptable with extraction recoveries of 81 % and 69 %, respectively. However HG was not retained on this sorbent. In previous work, Focus cartridges have been used with the same extraction procedure for polar and non polar compounds from biological matrices, especially from plasma samples. It has been stated that this sorbent, on to which adsorption requires hydrophobic or p-p interactions, was not suitable for sugar extraction. Preliminary tests showed that the extraction recoveries obtained from an aqueous solution were 100 % for HS and 92 % for 8PCHG. Washing with a 10:90 acetonitrile/water mixture caused significant analyte loss, likely by suppressing some dipolar interactions. The washing step was thus performed with a methanol/water mixture.

(e1,e2) BondElut PPL

BondElut PPL cartridges are made of a modified PS-DVB copolymer.[21] Conditioning with water is a crucial step of the process. The drying step was also determinant to obtain good extraction recoveries. Extraction tests were carried out on 100 mg and 200 mg cartridges. With the latter, the extraction recoveries are 15 % greater for HG and HS, 25 % greater for 8PCHG. Like Isolute ENV+, BondElut PPL cartridges were developed to extract very polar compounds from aqueous solutions. Indeed, they made HG extraction from plasma possible (100 % of extraction recovery) whereas this compound was not retained by most of the other sorbents among those tested, and they provided great extraction recoveries for HS and 8PCHG: 102 and 96 %, respectively.

b. Further optimization on the plasma extraction procedure with PPL BondElut cartridges

The results mentioned above indicate that both Isolute ENV+ and BondElut PPL cartridges allow simultaneous extraction of the three analytes. The BondElut PPL (200 mg) was selected for further optimization because it provided the best apparent extraction recoveries.

Influence of the volume of plasma

Different volumes of plasma (at 2 ng/mL in each analyte) from 1 to 5 mL were submitted to the extraction procedure. *Figure II-2* shows that, for HG and HS, the extracted quantities are proportionally correlated to the plasma volume loaded on the cartridge in the considered range. For 8PCHG, saturation of the sorbent is observed for volumes greater than 2.5 mL. A 1 mL sample volume has been retained for routine analysis but these tests showed that the sample volume could be increased to 2.5 mL in case of lack of sensitivity of the LC/MS system.

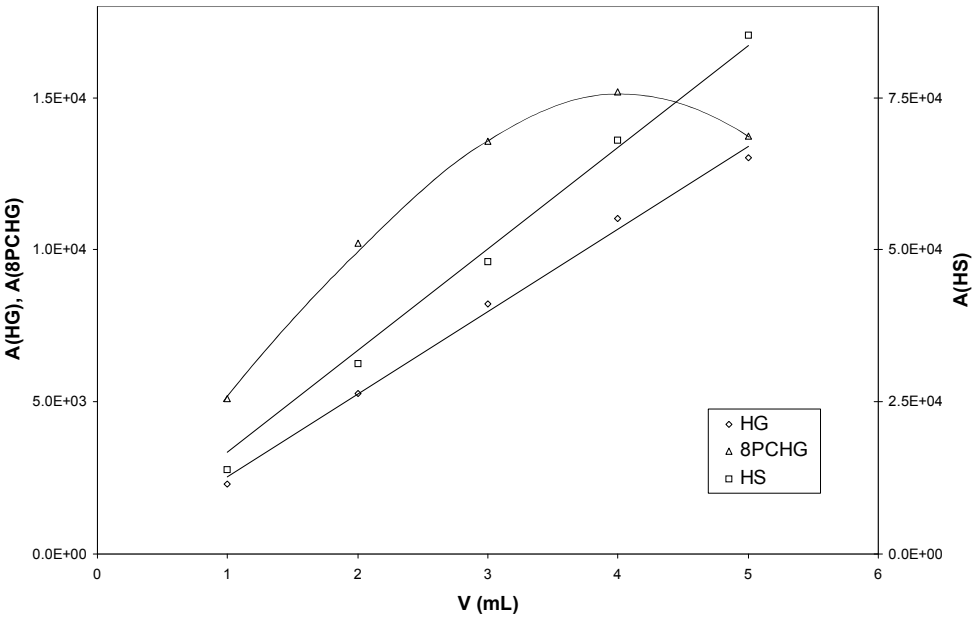


Figure II-2. *Influence of plasma volume on chromatographic peak area (measured with the LTQ mass spectrometer). All samples were spiked at 2 ng/mL in each analyte.*

pH adjustment

In most extraction procedures, plasma samples are acidified with phosphoric acid (100 µL H_3PO_4 84 % diluted 1/5 for 3 mL of plasma) to denature binding proteins.[28] In our

study, tests were carried out on post-administration samples; they showed that apparent extraction recoveries are not significantly modified (less than 10 %) according to the sample pH, which was either pH 3 after addition of phosphoric acid or pH 7.5 in normal plasma. Consequently, the acidification step has been removed from the extraction procedure of HG, HS and 8PCHG.

c. Selectivity and limits

As shown on *Figure II-3*, no interferent peak is observed around the expected retention time of HS. Results are fully comparable for HG and 8PCHG.

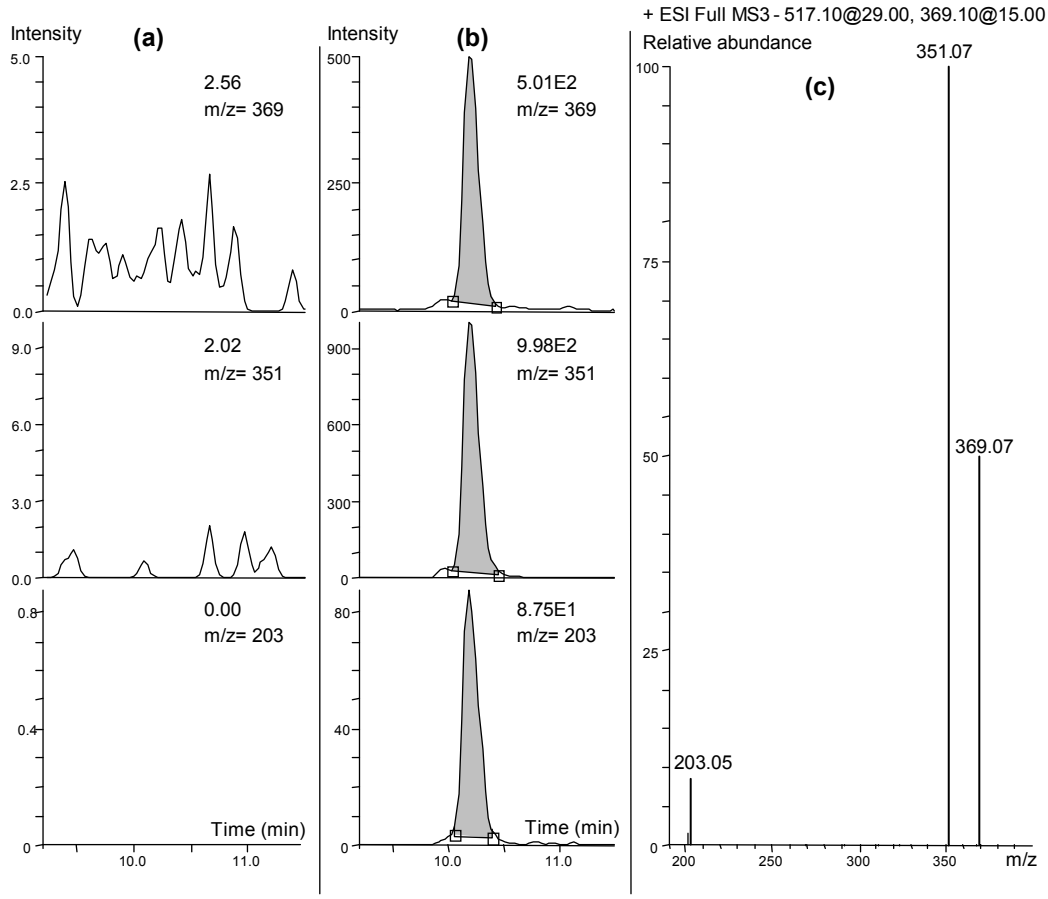


Figure II-3 *Selectivity of harpagoside in plasma. Extracted ion mass chromatograms at m/z 369, m/z 351 and m/z 203, corresponding to the harpagoside fragmentations in the MS^3 mode on the LTQ mass spectrometer, obtained from (a) 1 mL of blank plasma, and (b) 1 mL of plasma spiked at 2 ng/mL. (c) Mass spectrum of harpagoside.*

The linearity range was define up to 200 ng/mL. The limit of detection (LoD) and the limit of quantification (LoQ) measured on the LTQ were less than 0.2 ng/mL in plasma.

d. Real extraction recoveries of the selected method

Table II-6 gives the real extraction recoveries and RSD (relative standard deviation) for the three analytes in the spiked plasmas. The results are satisfying since recoveries are between 91 and 93 % at 0.5 ng/mL and between 88 and 94 % at 5.0 ng/mL, with RSD values between 8 and 13 % at 0.5 ng/mL and 7 to 8 % at 5.0 ng/mL.

Table II-6. *Real extraction recoveries of analytes from plasma using BondElut PPL cartridges (mean values for extracts from 12 different samples).*

	HG		HS		8PCHG	
Spiked concentrations (ng/mL)	0.5	5	0.5	5	0.5	5
Recoveries (%)	92	92	93	88	91	94
RSD (%)	8	8	8	7	13	7

4.2. Urine

a. Comparison of SPE cartridges

The different cartridges tested for urine extraction are given in *Table II-7* with the apparent extraction recoveries determined for each analyte. Results are commented below for each kind of cartridge.

Reverse phase sorbents

(f) BondElut C18 HF

BondElut C18 HF cartridges are made of an endcaped trifonctionalized C_{18} bonded silica sorbent;[21] silica presents a granulometry of 120 µm allowing extraction from viscous samples (HF meaning *High Flow*), which is particularly suited for horse urine. The first tests were performed with this kind of sorbent, because it is routinely used in our laboratory. The recovery ratios for HS and 8PCHG were 47 and 21 %, respectively. Other eluting solvents such as chloroform (5 mL), diethyl ether (5 mL) and a 50:50 methanol/ethyl acetate mixture (3 mL) were tested but they provided extraction recoveries between only 20 and 25 % for HS. This result may be due to the particular cleanness of the extracts provided by the 80:20 methylene chloride/isopropyl alcohol mixture compared to that of the extracts provided with other eluting solvents. As for plasma, the ionic suppression phenomenon in LC/MS makes the cleanness of the sample particularly critical. HG was not detected with these cartridges;

either it was straight away eluted during sample loading, or it underwent strong ionic suppression in the mass spectrometer source.

Table II-7. *Apparent extraction recoveries in urine using different SPE cartridges.*

			Apparent extraction recoveries[a] (%)		
Sorbent type	Cartridge	Extraction method[b]	HG	HS	8PCHG
Reverse Phase	BondElut C18 HF	(f)	nd	47	21
	Isolute C8	(g)	nd	52	25
Mixed-Mode	CSDAU 503	(h)	nd	nd	-
	BondElut Certify	(i)	nd	5	-
	Oasis MCX	(j)	nd	15	-
Covalent bonded	BondElut PBA	(k)	ε	ε	ε
Non-polar copolymer	Isolute ENV+	(l)	nd	40	32
	Oasis HLB	(m)	nd	63	47
	BondElut PPL	(n)	nd	22	21
	AbsElut Nexus	(o)	nd	68	45
Association of cartridges	C18 HF + PPL	(p)	ε	-	-
	PPL + C18 HF	(q)	24	-	-

[a] Apparent extraction recoveries were calculated on at least 3 urine samples

[b] Extraction methods are detailed in *Table II-4*

nd: non detected

ε: traces

(g) Isolute C8

Isolute C8 cartridges are made of non-endcaped C_8 bonded silica sorbent. Silanol groups may interact with our hydroxyl containing analytes. Used under conditions analogous to those for BondElut C18 HF, these cartridges provided insufficient recovery ratios for HS and 8PCHG (52 and 25 %, respectively); HG was not detected.

Mixed-mode cartridges: reverse phase + cation exchange

Extractions were tested on mixed-mode cartridges because if the analytes can be cationised, it may allow proceeding to a more selective extraction owing to secondary interactions of the support with the cation.

(h) CSDAU 503 – (i) BondElut Certify

CSDAU 503 and BondElut Certify are made of mixed phases: C_8 bonded silica + benzenesulfonic acid which makes them suitable for the extraction of ionisable compounds. The recovery ratio for HS was 5 % and HG was not retained. There is no result for 8PCHG since this analyte was not available when these tests were performed.

(j) Oasis MCX

Oasis MCX cartridges are also cation exchange cartridges (MCX meaning *Mixed-mode Cation eXchange*) containing DVB/NP with benzenesulfonic acid functions but they differ from (h) and (i) cartridges since they are made of a polymeric sorbent. The recovery ratio for HS was 15 %. As with the previous cartridges, HG was not retained, and there was no result for 8PCHG (for the reasons given above).

The very poor recovery ratios obtained with mixed-mode cartridges confirm that the considered analytes are not ionisable. Only the hydrophobic interactions, which are not favorable to extraction of HS, HG and 8PCHG, are involved in the retention process.

Covalent bonded sorbent

Because it is strongly polar and lightly hydrophobic, HG is very difficult to fix on to the cartridge sorbent. BondElut PBA cartridges made of phenylboronic acid bonded to silica were tested. The BondElut PBA main feature is to selectively fix the compounds whose structure includes a cis 1,2-diol or, in some cases, a 1,3-diol.[25] The reaction between HS and diphenylboronic acid has been tested in a vial; it provided a conversion order of 65 %.

(k) BondElut PBA

Unlike with the other sorbents tested, the problem with the BondElut PBA cartridges concerned analytes releasing.[27] As a matter of fact, different acidic (aqueous and organic) solutions with phosphoric, hydrochloric, acetic and formic acids were tested. None provided fully satisfying results because elution required too large amounts of solvent: 25 mL of the elution solvent are not sufficient to totally elute the analytes. Despite of the manufacturer recommendations, trifluoroacetic acid (TFA) has not been tested in the elution mixture because it is well known to product complexes in LC/MS analysis which can be prejudicial to other analyses conducted on the mass spectrometer.[29]

Non-polar copolymer sorbents

As it has been previously shown for the comparison of cation exchange cartridges, polymeric sorbents seem to be more suitable to extract our analytes than silica ones. That is

why some polymeric cartridges, essentially made of PS-DVB have been tested and compared. It is to be noted than the tests on urine extraction began before those devoted to plasma extraction, which explains why only the cartridges providing promising results with urine were tested with plasma.

(l) Isolute ENV+

Unlike what has been observed with plasma, HG has not been detected in the urine extract. This is likely to be due to an important matrix effect (ion suppression) in LC/MS. The recovery ratios for HS and 8PCHG are 40 and 32 %, respectively; they are comparable to those obtained using reverse phase cartridges.

(m) Oasis HLB

Like with plasma, HG is not sufficiently retained on this kind of sorbent. Some traces are detected when pH is adjusted to 9.1 but results are insufficiently reproducible. Correct recoveries were provided for HS and 8PCHG: 63 and 47 %, respectively.

(n) BondElut PPL

HG is not detected and the recovery ratios for HS (22 %) and 8PCHG (21 %) are disappointing compared to those obtained for plasma. Like with Isolute ENV+ cartridges, the comparison with plasma extraction suggests that ionic suppression may be responsible of the non detection of HG. As a matter of fact, the extracts are insufficiently clean and some tests described in the next part are in good agreement with this hypothesis. Rinsing with organic solvents such as methanol or acetonitrile has been tested but not retained because HG (detected in rinsing fractions) is rapidly eliminated under these conditions. It is to be noted that urine extraction on these cartridges seemed to drag away some part of the sorbent as the mass spectrometer source became orange.

(o) AbsElut Nexus

As with the other cartridges, HG is not retained by the sorbent and thus not detected. Recovery ratios for HS (68 %) and 8PCHG (45 %) are comparable to those obtained with Oasis HLB (63 and 47 %, respectively).

Combination of different cartridges

None of the techniques previously presented was efficient to extract HG from urine. Two reasons may explain this: (i) HG was not retained on the sorbent (ii) HG was not detected because of ion suppression in LC/MS due to abundant matrix interferents. Therefore, in order to extract HG from urine, we decided to test the successive use of two cartridges with different sorbent characteristics.

(p) BondElut C18 HF + BondElut PPL

The results of the previous tests show that C18 bonded silica cartridges retain many impurities but do not retain HG from urine while BondElut PPL cartridges are able to retain HG but do not provide sufficient selectivity. Therefore, urine was *filtered* though a BondElut C18 HF; the collected fraction was in turn submitted to extraction on a BondElut PPL cartridge. The results are not satisfactory: HG was detected only at trace levels, whereas the extraction recovery obtained from a sample fortified with HG before the BondElut PPL extraction was 90 % (*i.e.* of the same order as that observed for plasma). This indicates that the BondElut C18 HF cartridge is able to retain the interferences responsible for ionic suppression and that HG is not eluted from the BondElut C18 HF. HS and 8PCHG recoveries have not been calculated because the method was not suitable for their extraction: HS and 8PCHG remained on the BondElut C18 HF cartridge during the loading step; only some traces of both compounds were thus detected.

(q) BondElut PPL + BondElut C18 HF

Based on the previous observations and on the results obtained for plasma, extraction was carried out on the cartridges used before but in a different order. As a matter of fact, the PPL BondElut was capable of retaining the compounds of interest and allowed to extract them from plasma samples. With urine, ion suppression was assumed to be mainly responsible for the disappointing results. The elution fraction from the BondElut PPL, containing less matrix interferents than urine, could be well extracted on a BondElut C18 HF cartridge. The procedure optimized for plasma extraction on BondElut PPL was suitable for urine provided that the urine samples were adjusted to pH 7.5. This process provided an extraction recovery of 24 % for HG. A small amount of HG was eliminated during the rinsing step. The HS and 8PCHG extraction recoveries have not been calculated because they seemed to be very low and their determination was not the purpose of this particular assay.

b. Final optimization of the extraction procedure with AbsElut Nexus cartridges

AbsElut Nexus and Oasis HLB cartridges allow good apparent extraction recoveries for HS (65 %) and 8PCHG (45 %) from urine. Although both cartridges provided similar recovery ratios, the AbsElut Nexus was chosen because it led to cleaner extracts. The specific surface area of AbsElut Nexus (650 m^2/g), inferior to that of the Oasis HLB (830 m^2/g), can explain why less matrix interferents are retained on the sorbent during the washing steps and finally desorbed during the elution step.

In order to improve the extraction efficiency, the influence of the sample volume and of the pH adjustment was studied.

Volume adjustment

Different sample volumes (at a concentration of 10 ng/mL in analytes) in the range from 250 µL to 5 mL have been extracted following the procedure previously described, with a constant loading volume of 10 mL. *Figure II-4* plots the chromatographic peak areas of HS and 8PCHG, reported to that of the internal standard, OHL, as a function of the urine volume. In both cases, the decrease of the chromatographic response may be attributed to the ion suppression effect during electrospray ionization. This illustrates the strong importance of the cleanness of extracts for the compounds of interest. As a good compromise for both analytes, a convenient sample volume of 1 mL was retained for further analysis.

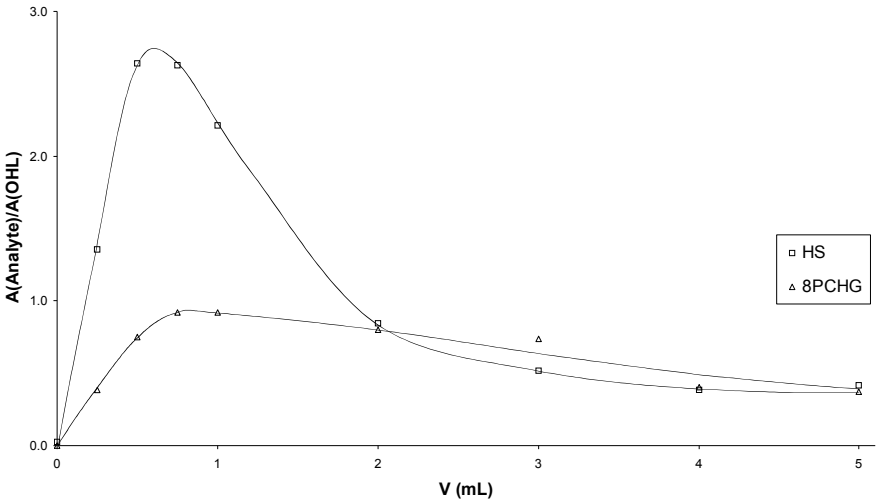


Figure II-4 *Influence of urine volume on chromatographic peak area (measured with the LTQ mass spectrometer). All samples were spiked at 10 ng/mL in each analyte.*

pH adjustment

The adjustment of pH is determinant in the cleaning of the extracts (*Figure II-5*). Extractions were achieved on 1 mL of blank urine. The samples were adjusted to different pH in the range from 4.5 to 9.5. They were spiked with 10 ng of HS and 8PCHG after extraction, so that the amounts of analytes are the same in all samples; the variations observed are thus only due to ion suppression. At pH below 6.5, the matrix effect is very strong for both HS and 8PCHG.

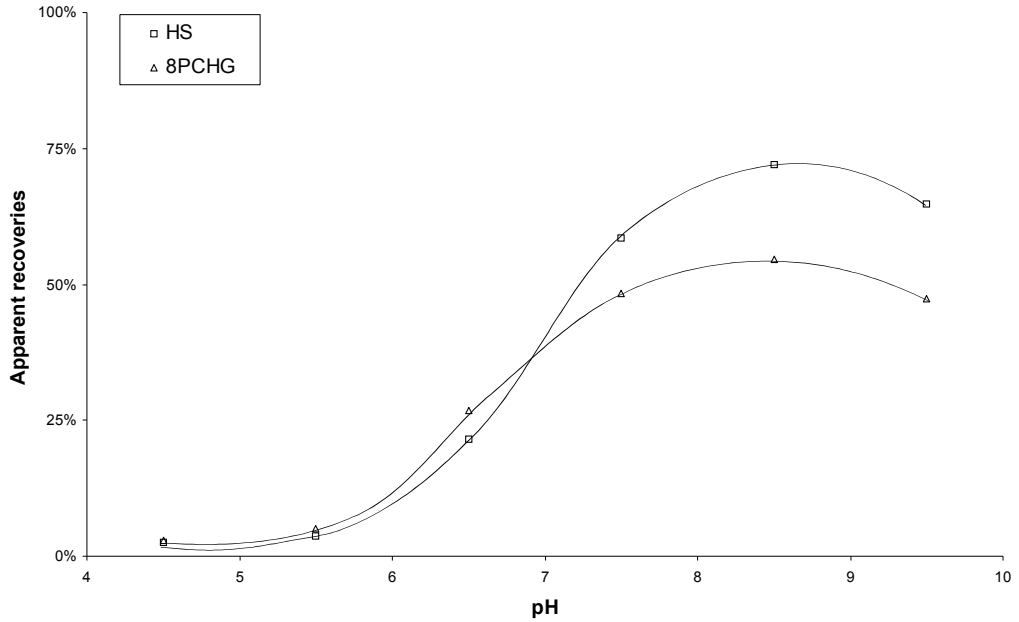


Figure II-5. *Influence of urine pH on apparent recoveries – Ion suppression effect with the electrospray source. All samples were spiked after extraction with 10 ng of harpagoside and 8-para-coumaroyl harpagide.*

The same experience was conducted with spiked urine at 10 ng/mL and the results obtained are comparable to those above. The real extraction recoveries have been estimated; they are constant on the pH range from 4.5 to 9.5 (70 and 65 % for HS and 8PCHG, respectively). A pH between 7.5 and 9 allows obtaining reproducible results without strong ion suppression. In the developed method, the pH was set to 7.7 ± 0.1, because it is an easy value to reach in urine with a phosphate buffer.

c. Selectivity and limits

Figure II-6 compares the chromatographic profiles (MS^3 detection) obtained from a blank urine extract and from an extract of urine spiked with HS at 10 ng/mL before extraction. As shown on *Figure II-6*, no interferent peak is observed in the expected retention time window of HS. Results are comparable for HG and 8PCHG (not shown).

The linearity range was define up to 200 ng/mL. The mean LoD and LoQ of this method were estimated at about 0.2 and 0.5 ng/mL in urine, respectively, but these values are matrix dependant.

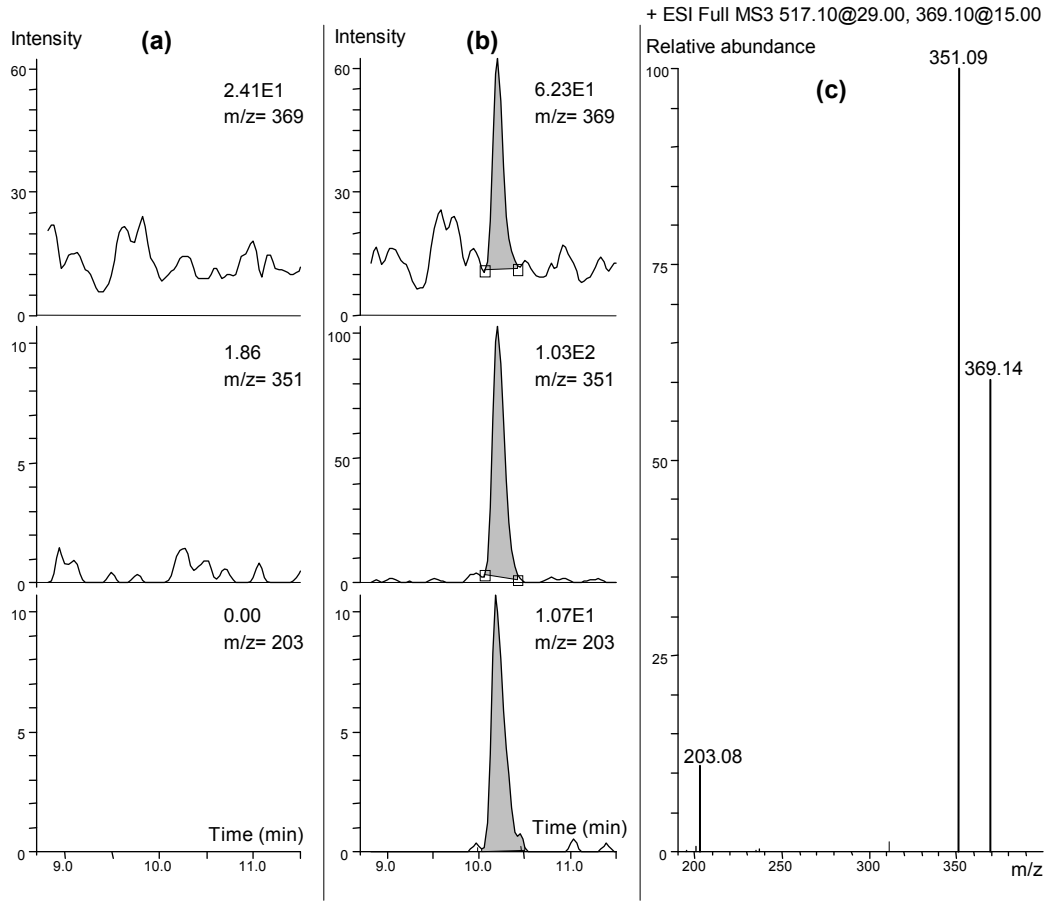


Figure II-6. *Selectivity of the detection of harpagoside in urine. Extracted ion mass chromatograms at m/z 369, m/z 351 and m/z 203, corresponding to the harpagoside fragmentations in the MS^3 mode on the LTQ mass spectrometer, obtained from (a) 1 mL of blank urine, and (b) 1 mL of urine spiked at 10 ng/mL. (c) Mass spectrum of harpagoside.*

d. Real extraction recoveries of the selected methods

After having selected and optimized the extraction methods (o) and (q), the real extraction recoveries were determined for HG, HS and 8PCHG.

Table II-8 shows the real extraction recoveries for HG for the complete method. Extraction recoveries are acceptable: 75 % at 2 and 20 ng/mL with RSD values between 14 and 19 %. RSD values are slightly high but acceptable considering the complexity of the matrix. Real extraction recoveries were determined for each cartridge giving 90 % for the BondElut PPL (in accordance with recoveries observed for plasma) and 83 % for the BondElut C18 HF. A loss of 7 % is imputable to the rinsing step with BondElut C18 HF. It is to be noted that mixing both fractions before analysis induced an ion suppression effect so strong that HG became difficult to detect.

Table II-8. *Real extraction recoveries of analytes from urine (mean values for extracts from 12 different samples).*

	HG		HS		8PCHG	
Extraction cartridge	PPL + C18		Nexus		Nexus	
Spiked concentrations (ng/mL)	2	20	2	20	2	20
Recoveries (%)	75	74	86	84	78	75
RSD (%)	19	14	7	12	8	19

The real extraction recoveries of HS and 8PCHG are reported in *Table II-8*. There is no significant difference between samples at 2 ng/mL and samples at 20 ng/mL. Extraction recoveries are satisfying: 85 and 77 % for HS and 8PCHG, respectively, with RSD values between 7 and 19 %.

4.3. Application of the methods to post-administration samples

The methods previously selected for plasma and urine were applied on each *medium* collected from horses dosed with harpagoside or related commercial products further to five different experiments. The three compounds were identified in post-administration samples (*Table II-9*). HS was detected in all the 2 hour post-administration plasma samples and in the 10 hour post-administration urine samples. HG and 8PCHG were detected in some urine samples and HG was detected in two plasma samples. Identification criteria were those described in *Table II-2*, *Figures II-3* and *II-6*. Additionally, HS was quantified using the method of standard additions and further details are given elsewere.[18]

Table II-9. *Detection of HG, HS and 8PCHG in equine plasma and urine after administration of harpagoside or related commercial products.*

	Plasma[a]			Urine[b]		
	HG	HS	8PCHG	HG	HS	8PCHG
EXP 1	-	+	-	-	+	+
EXP 2	+	+	+	-	+	+
EXP 3	+	+	+	-	+	+
EXP 4	-	+	-	-	+	-
EXP 5	-	+	-	-	+	-

[a] 2 Hours after administration

[b] 10 Hours after administration

EXP 1: 2 doses of Harpagophyt

EXP 2: 16 capsules of Harpadol

EXP 3: 32 capsules of Harpadol

EXP 4: 120 mg of harpagoside

EXP 5: 600 mg of harpagoside

5. CONCLUSION

The combination of SPE with LC/ESI-MS^n provided an efficient and sensitive method for the detection of harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide and harpagide in equine plasma and urine. This is the first report on an extraction method for the detection of these compounds in biological fluids by LC/MS. Among all the cartridges tested, the BondElut PPL was selected for the detection of harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide and harpagide in plasma, the AbsElut Nexus cartridge for the detection of harpagoside and 8-*para*-coumaroyl harpagide in urine and the combination of BondElut PPL and BondElut C18 HF was proposed for the detection of harpagide in urine. These methods require 1 mL of plasma or urine. Each extraction can be fully automated, it takes about 45 minutes, which makes possible the analysis of a sample set within one day. This is applicable on a large scale. Further experiments have shown that quantitation of HS is possible using the method of standard additions.

Thanks to recent development of solid-phase sorbents, several extraction methods tested here could be applicable for the detection of other polar related compounds in biological fluids.

Acknowledgements

This work was funded by ANRT and by *Les Haras Nationaux*, the French Ministry of Agriculture, Food Trade, Fishing and Rural Business. The authors are indebted to Dr. Garin and the staff for assistance with the animal experiments.

6. LITERATURE CITED

1. **Andersen M.L., Santos E.H.R., Seabra M.L.V., Da Silva A.A.B., Tulfik S.**
Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvent-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology,* **2004**, 91(2-3), pp. 325-330.

2. **Chrubasik S.**
Osteoarthritis: pharmacology and clinical indications of selected botanicals. *The Pain Clinic*, **2004**, 16(1), pp. 1-16.

3. **Chantre P., Cappelaere A., Leblan D., Guedon D., Vandermander J., Fournie B.**
Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, **2000**, 7(3), pp. 177-183.

4. **Gagnier J.J., Chrubasik S., Manheimer E.**
Harpagophytum procumbens for ostheoarthitis and low back pain: a systematic review. BMC Complementary and Alternative Medicine, **2004**, 4:13.

5. **Mahomed I.M., Ojewole J.A.**
Analgesic, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) secondary roots aqueous extract. *Phytotherapy Research*, **2004**, 18(12), pp. 982-989.

6. **Kikuchi T., Matsuda S., Kubo Y., Namba T.**
New iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* DC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1983**, 31(7), pp. 2296-2301.

7. **Seger C., Godejohann M., Tseng L.H.**
LC-DAD-MS/SPE-NMR hyphenation – A tool for the analysis of pharmaceutically used plant extracts: identification of isobaric iridoid glycoside regioisomers from *Harpagophytum procumbens*. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77(3), pp. 878-885.

8. **Baranska M., Schulz H., Siuda R., Strehle M.A., Rosch P., Popp J., Joubert E., Manley M.**
Quality control of *Harpagophytum procumbens* and its related phytopharmaceutical products by means of NIR-FT-Raman spectroscopy. *Biopolymers*, **2005**, 77(1), pp. 1-8.

9. **Maurer H.H.**
Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *Journal of Chromatography B*, **1998**, 713(1), pp. 3-25.

10. **Paterson S., Cordero R., McCulloch S., Houldsworth P.**
Analysis of urine for drugs of abuse using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, **2000**, 37(5), pp. 690-700.

11. **Wynne P.M., Batty D.C., Vine J.H., Simpson N.J.K.**
A multi-eluate approach to solid-phase extraction of biological fluids for detection of drug residues. In *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Rogers R.B., Houghton E., Wade J.F., Eds. R&W Publications, Newmarket, UK, **2001**, pp. 232-240.

12. **Wynne P.M., Batty D.C., Vine J.H., Simpson N.J.K.**
An improved method for the automated extraction of anabolic steroids from equine urine. In *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Rogers R.B., Houghton E., Wade J.F., Eds. R&W Publications, Newmarket, UK, **2001**, pp. 245-251.

13. **Wynne P.M., Batty D.C., Vine J.H., Simpson N.J.K.**
Reduced blocking rates through application of a new NC-SPE sorbent to the extraction of equine urine. In *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Rogers R.B., Houghton E., Wade J.F., Eds. R&W Publications, Newmarket, UK, **2001**, pp. 445-452.

14. **Wynne P.M.**
The application of SPE to veterinary drug abuse in solid-phase extraction. In *Solid-Phase Extraction – Principles, Techniques and Applications*. Simpson NJK, Ed. Marcel Dekker, New-York, NY, **2000**, pp. 273-306.

15. **Batty D.C., Wynne P.M., Vine J.H.**
Comprehensive drug screening using a single solid-phase extraction cartridge. In *Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Auer D.E., Houghton E., Eds. R&W Publications, Newmarket, UK, **1996**, pp. 197-202.

16. **Thomas J., Meffin P.**
Aromatic hydroxylation of lidocaine and mepivacaine in rats and humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1972**, 15(10), pp. 1046-1049.

17. **Harkins J.D., Mundy G.D., Woods W.E., Lehner A., Karpiesiuk W., Rees W.A., Dirikolu L., Bass S., Carter W.G., Boyles J., Tobin T.**
Lidocaine in the horse: its pharmacological effects and their relationship to analytical findings. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **1998**, 21, pp. 462-476.

18. **Colas C., Garcia P., Popot M.A., Bonnaire Y., Bouchonnet S.**
Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of *Harpagophytum* in equine urine and plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20(22), pp. 3257-3266.

19. **Lindström A., Albertsson A.C., Hakkarainen M.**
Development of a solid-phase extraction method for simultaneous extraction of adipic acid, succinic acid and 1,4-butanediol formed during hydrolysis of poly(butylene adipate) and poly(butylene succinate). *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1022(1-2), pp. 171-177.

20. **Kay R., Hines S., Woodward K., Hudson S., Teale P.**
The use of Nexus polymeric phase extraction cartridges as a pre-extraction *medium* for screening and confirmatory methodologies. In *Proceedings of the 14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Hill D.W., Hill W.T., Eds. R&W Publications, Orlando, Florida, USA, **2003**, pp. 243-247.

21. **Hennion M.C.**
Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1999**, 856(1-2), pp. 3-54.

22. **Bartels P., Ebeling E., Krämer B., Kruse H., Osius N., Vowinkel K., Wassermann O., Witten J., Zorn C.**
Determination of chlorophenols in urine of children and suggestion of reference values. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, 365(5), pp. 458-464.

23. **Hennion M.C., Cau-Dit-Coumes C., Pichon V.**
Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 823(1-2), pp. 147-161.

24. **Tobin T.**
Drugs and the Performance Horse. Charles C Thomas Publ. Springfield, IL, **1981**.

25. **Gravel M., Thompson K.A., Zak M., Bérubé C., Hall D.G.**
Universal solid-phase approach for the immobilization, derivatization, and resin-to-resin transfer reactions of boronic acids. *Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 67(1), pp. 3-15.

26. **Hartleb J., Damm Y., Arndt R., Christophers E., Stockfleth E.**
Determination of 5-S-cysteinyldopa in plasma and urine using a fully automated solid-phase extraction-high-performance liquid chromatographic method for an improvment of specificity and sensitivity of this prognostic marker of malignant melanoma. *Journal of Chromatography B*, **1999**, 727(1), pp. 31-42.

27. **Batty D.C., Simpson N.J.K., Vine J.H., Wynne P.M.**
A multi-eluate approach to SPE of biological fluids for drugs of abuse analysis – Part 3. In *Proceedings of the 14th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Hill D.W., Hill W.T., Eds. R&W Publications, Orlando, Florida, USA, **2003**, pp. 206-214.

28. **Law B., Weir S.**
Fundamental studies in reversed-phase liquid-solid extraction of basic drugs; III: sample matrix effects. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1992**, 10(7), pp. 487-493.

29. **Denekamp C., Egbaria E.**
Remarkable amine-TFA self assembly. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2004**, 15(3), pp. 356-362.

III. ANALYSE PAR LC/MS

Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometric Characterization of *Harpagophytum* in Equine Urine and Plasma

Cyril Colas[‡,†], Patrice Garcia[‡], Marie-Agnès Popot[‡], Yves Bonnaire[‡] and Stéphane Bouchonnet[†].

[‡] LCH – Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières le Buisson, France.

[†] DCMR – Laboratoire de Chimie des Mécanismes Réactionnels, École Polytechnique, route de Saclay, 91128 Palaiseau cedex, France.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2006**, 20(22), pp. 3257-3266.
Received: 12 July 2006
Revised: 31 August 2006
Accepted: 4 September 2006

1. ABSTRACT

A method has been developed for the analysis and characterization in equine urine and plasma of iridoid glycosides: harpagide, harpagoside and 8-*para*-coumaroyl harpagide, which are the main active principles of *Harpagophytum*, a plant with anti-inflammatory properties. The method involves liquid chromatography coupled with positive electrospray ionization mass spectrometry. The addition of sodium or lithium chloride instead of formic acid in the eluting solvent has been studied in order to enhance the signal and to modify the ion's internal energy. Fragmentation pathways and associated patterns are proposed for each analyte. A comparison of three types of mass spectrometer: a 3D ion trap, a triple quadrupole and a linear ion trap, has been conducted. The 3D ion trap was selected for drug screening analysis whereas the linear ion trap was retained for identification and quantitation analysis.

2. INTRODUCTION

Harpagophytum, a plant most commonly called Devil's claw, covers two species: *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri*. They are indigenous plants of the Kalahari Desert of Africa.[1] Secondary tuberized roots are the therapeutic parts of the plant; they contain between 0.5 and 3 % of iridoid glycosides assumed to be the active compounds.[2] Harpagoside (HS) (or 8-cinnamoyl harpagide) is the main iridoid. *Harpagophytum zeyheri* contains another major iridoid: 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG). The HS/8PCHG ratio is different for the two species and can be used to distinguish them chemically or to define if commercial products result from a raw materials mixture.[3,4] Harpagide (HG) is another iridoid especially present in *H. procumbens*. Some other compounds are also present in *Harpagophytum*, like procumbide and its 6'-*para*-coumaroyl ester from the iridoid family, some flavonoids, phenolic acids, quinones, phytosterols and sugars. They are not studied here because they are present in too small amounts or they are not specific for *Harpagophytum*.[2,5] Chemical structures of HS, HG and 8PCHG are displayed in *Figure III-1*.[6,7]

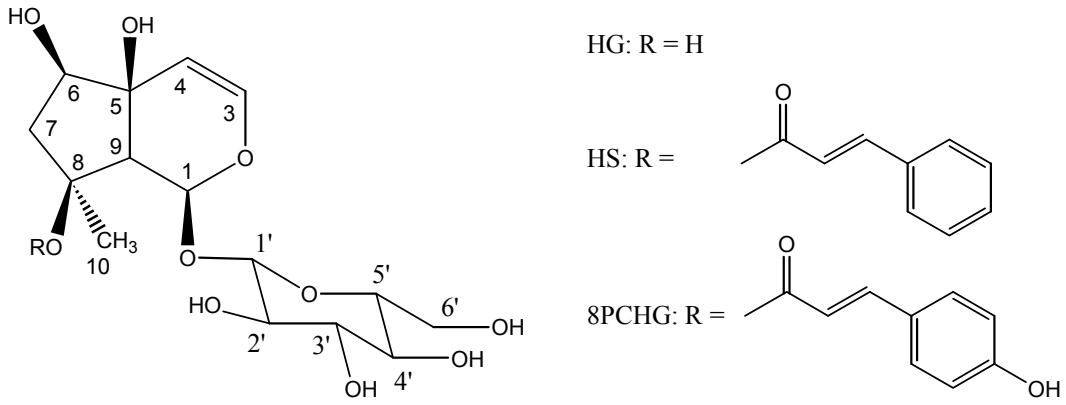


Figure III-1. *Chemical structures of harpagide (HG), harpagoside (HS), 8-para-coumaroyl harpagide (8PCHG) and numbering of iridoid kernel atoms.*

The European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) monographs summarize the pharmacological and clinical evidence behind the therapeutic indications for the individual plant materials. ESCOP recommends the use of Devil's claw for symptomatic treatment of painful osteoarthritis, relief of low back pain, loss of appetite and dyspepsia.[5] The effectiveness of *Harpagophytum* in the treatment of exacerbation of low back pain has been extensively studied.[8–12] As a result of a number of recent studies, *Harpagophytum* is proposed as a complementary treatment for chronic rheumatism, tendonitis, osteoarthritis and arthritis.[12–16] Herbal preparations containing *Harpagophytum* with other plants are used

for prevention of inflammatory symptoms in competition horses and in the treatment of animals with lameness.

This paper reports an analytical method to detect HG, HS and 8PCHG in equine urine and plasma. After solid-phase extraction (SPE), liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) was employed to detect, identify and quantify the analytes. The addition of sodium and lithium salts has been tested in order to enhance the signal and to study the dissociation of cation adducts by MS^n, with the aim of establishing if these adducts provide more diagnostic ions than the $[M+H]^+$ ions. A comparison of three types of mass spectrometer: a 3D ion trap, a triple quadrupole and a linear ion trap, has been conducted to determine the most appropriated instrumentation.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Chemicals

HPLC-grade water was obtained by purifying water in a Milli-Q filtration system (Millipore, Bedford, MA, USA), HPLC-grade methanol, *n*-hexane, and acetonitrile were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy), isopropyl alcohol, formic acid, sodium chloride, sodium dihydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate from VWR (Paris, France), methylene chloride from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), and lithium iodide and lithium chloride from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

AbsElut Nexus (60 mg), BondElut PPL (200 mg) and BondElut C18 HF (500 mg) 3-mL cartridges for SPE were purchased from Varian (Palo Alto, CA, USA).

Harpagoside (HS) was supplied by Extrasynthèse (Genay, France), and harpagide (HG) and 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG) were purchased from Phytolab (Hamburg, Germany). Hydroxylidocaine (OHL), used as the internal standard for LC/MS quantitation, was synthesized in our laboratory.[17,18] Stock solutions of standards were prepared by dissolving the analytes in methanol and storing them at 4 °C until use.

Harpadol from Arkopharma (Carros, France), Harpagophyt from CTB Equitop (Le Perray, France) and Twydil Artridil from Pavesco AG (Basel, Switzerland), commercial preparations containing *Harpagophytum*, were used for administration to horses.

3.2. Sample preparation

a. Extraction from plasma

A 1 mL volume of plasma was diluted with 4.5 mL of water and 2.5 ng of internal standard (OHL) were added. The mixture was centrifuged for 30 min at 3000 g. SPE was then performed on a BondElut PPL cartridge rinsed with water and eluted with a 50:50 acetonitrile/methanol mixture with a Rapid Trace SPE workstation (Zymark, Hopkinton, MA, USA). Previous work has shown that this method allows the simultaneous extraction of HG, HS and 8PCHG.[19]

b. Extraction from urine

A volume of 1 mL of urine was diluted with 2.5 mL of 0.25 M phosphate buffer (pH 7.7) and 6.5 mL of water and 2.5 ng of internal standard were added. The pH was adjusted to 7.7 and the sample was then centrifuged for 30 min at 3000 g. HS and 8PCHG were

extracted with a Rapid Trace SPE workstation, using AbsElut Nexus cartridges successively rinsed with water, 70:30 water/methanol and *n*-hexane. Analytes were eluted with a 80:20 methylene chloride/isopropyl alcohol mixture.[19] HG was extracted in two steps: urine prepared as described above was extracted following the process described for plasma extraction on a BondElut PPL cartridge. The solution eluted from this cartridge was evaporated and then dissolved in 100 µL of methanol to which 3 mL of water had been added. This solution was extracted on a BondElut C18 HF cartridge, rinsed with *n*-hexane and a 70:30 water/methanol mixture, and eluted with a 50:50 water/methanol mixture.[19] After extraction, samples were evaporated to dryness at 48 °C with a TurboVap LV Evaporator (Zymark). The dry residue was reconstituted in 25 µL of methanol and 175 µL of water before analysis by LC/MS^n.

3.3. Instrumentation

a. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Analyses were performed using either a Surveyor MS pump equipped with a Surveyor autosampler (ThermoElectron, San Jose, CA, USA) or a 1100 Series binary pump, equipped with a standard autosampler, a vacuum degasser and a thermostated column compartment (Agilent, Palo Alto, CA, USA). The column used was a Zorbax Eclipse XDB-C18 Solvent Saver Plus (3.5 µm, 150 x 3.0 mm), equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 12.5 x 4.6 mm) analytical guard column (Agilent Technologies, Massy, France) and a 0.5 µm high-pressure frit. The flow rates were 300 µL/min on the Surveyor systems and 400 µL/min on the Agilent one with the following gradient of methanol (a 0.1 % aqueous formic acid solution (pH 2.6) was added to methanol): 10 % methanol 0–2 min, 60 % at 4 min, 80 % at 5 min, 100 % from 10 to 15 min and 10 % from 16 to 20 min. A volume of 10 µL of sample was injected.

b. Mass spectrometry

Three mass spectrometers from ThermoElectron equipped with atmospheric pressure electrospray ionization (ESI) interfaces were used for this study: a 3D ion trap 'LCQ Deca XP Max', a triple quadrupole 'TSQ Quantum Ultra' and a linear ion trap 'LTQ'. The instrument parameters were optimized for each analyte on each mass spectrometer. A voltage of 4.5 kV was applied to the ESI needle in all cases.

The LCQ Deca XP Max, coupled with a Surveyor system, was operated in ESI positive ion mode. The flows of sheath and auxiliary gases (nitrogen) were set at 20 arbitrary units for HG and OHL and at 30 and 7 arbitrary units, respectively, for HS and 8PCHG. The

capillary temperature was maintained at 300 °C. The q_z factor was set to 0.25 for all MS^n experiments. The collision-induced dissociation (CID) of $[M+Na]^+$ ions was carried out in the MS^2 and MS^3 modes with scanning of the product ions: *m/z* 387.1 → [200–390] for HG; *m/z* 517.2 → [350–520] and *m/z* 517.2 → 369.1 → [200–380] for HS; *m/z* 533.2 → [350–535] and m/z 533.2 → 369.1 → [200–380] for 8PCHG.

The TSQ Quantum Ultra, coupled with a Surveyor system, was operated in ESI positive ion mode. The flows of sheath and auxiliary gases were set at 55 and 25 arbitrary units, respectively. The capillary temperature was maintained at 350 °C. The source CID energy was optimized at 12 V. The Q2 collision gas pressure (argon) was regulated at 1.0 mTorr. The scan width was set at 0.2 Th and scan time at 50 ms. The Q1 and Q3 peak widths were set at 0.2 and 0.7 Th, respectively. The transitions monitored for $[M+Na]^+$ ion dissociations were observed in the selected reaction monitoring (SRM) mode, with four transitions for each analyte and one for the internal standard: *m/z* 387.1 → 269.2, *m/z* 387.1 → 207.1; *m/z* 387.1 → 203.0 and *m/z* 387.1 → 189.0 for HG; *m/z* 517.2 → 369.1, *m/z* 517.2 → 351.1, *m/z* 517.2 → 203.0, and *m/z* 517.2 → 189.0 for HS; *m/z* 533.2 → 369.1, *m/z* 533.2 → 351.1, *m/z* 533.2 → 203.1, and *m/z* 533.2 → 189.1 for 8PCHG; and *m/z* 251.1 → 86.0 for OHL.

The LTQ, coupled with an Agilent 1100 Series system, was operated in ESI positive ion mode. The flows of sheath and auxiliary gases were set at 40 and 5 arbitrary units, respectively. The capillary temperature was maintained at 350 °C. The q_z factor was set to 0.25 for all MS^n experiments. The CID of $[M+Na]^+$ ions was monitored in the MS^2 or MS^3 modes with scanning of the product ions for analyte identification: *m/z* 387.1 → [200–390] for HG; *m/z* 517.1 → 369.1 → [200–380] for HS; and *m/z* 533.1 → 369.1 → [200–380] for 8PCHG. The consecutive reaction monitoring (CRM) mode was used for analyte quantitation using the following transitions: *m/z* 517.1 → 369.1 → 351.1 for HS and *m/z* 533.1 → 369.1 → 351.1 for 8PCHG. OHL was always detected in the SRM mode on the *m/z* 251.1 → 86.0 transition.

3.4. Criteria in mass spectrometry

Our laboratory is subject to AORC (Association of Official Racing Chemists) guidelines which prescribe minimum criteria for identification of analytes.[20,21] These minimum criteria require at least three characteristic ions with relative abundances ≥ 10 % in the full scan spectrum with no interfering ions ≥ 20 % in relative abundance. For identification in SRM mode, four specific transitions with signal-to-noise (S/N) ratio ≥ 3 are required for each

compound. If these conditions cannot be fulfilled, the AORC rules allow the use of two complementary techniques such as full scan MS^2 and full scan MS^3, for example. Each technique must involve at least two characteristic ions.

3.5. Limits of detection and quantitation

The limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were estimated by calculating the relative errors on the regression lines of six calibration graphs with relative standard deviation (RSD) $\leq$ 15 %. The criteria for LoQ and LoD determination were the following: a relative deviation of calibration standards of less than 25 % for the LoD and of less than 10 % for the LoQ.

3.6. Equine samples

Harpagoside or related commercial products were administrated to four thoroughbred horses. A single dose of harpagoside (120 mg) or Harpadol (32 capsules, *i.e.* about 220 mg of HS) was orally given to two horses, and Harpagophyt (2 doses/day, *i.e.* about 165 mg/day of HS) or Twydil Artridil (4 doses/day, *i.e.* about 100 mg/day of HS) was given orally in treatment to two horses for 10 days. For each horse, eight samples of plasma from 15 min to 24 h and ten samples of urine from 2 h to 5 days were collected.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. ESI-MS detection of HG, HS and 8PCHG

a. Full scan MS

Figure III-2 shows the full scan mass spectra obtained by infusion of solutions of HG, HS and 8PCHG at 10 ng/µL in the ESI positive ion mode. They are characterized by the presence of sodium ion adducts (*m/z* 387 for HG, *m/z* 517 for HS and *m/z* 533 for 8PCHG) and, to a lesser extent, of potassium ion adducts (*m/z* 403 for HG, *m/z* 533 for HS and *m/z* 549 for 8PCHG). The $[M+H]^+$ ion is almost absent in all cases. Cation-bound dimers such as $[2M+Na]^+$ are observed when infusion is performed but not when analytes are introduced *via* HPLC. It has been previously shown that the harpagide structure can fold up to simultaneously provide three to four binding sites to complex a sodium or potassium ion.[22,23] This stabilization of the adduct ion leads to a reduction in the extent of mass spectrometric fragmentations. The same phenomenon has been reported for others glycosides such as the flavonoid glycosides.[24]

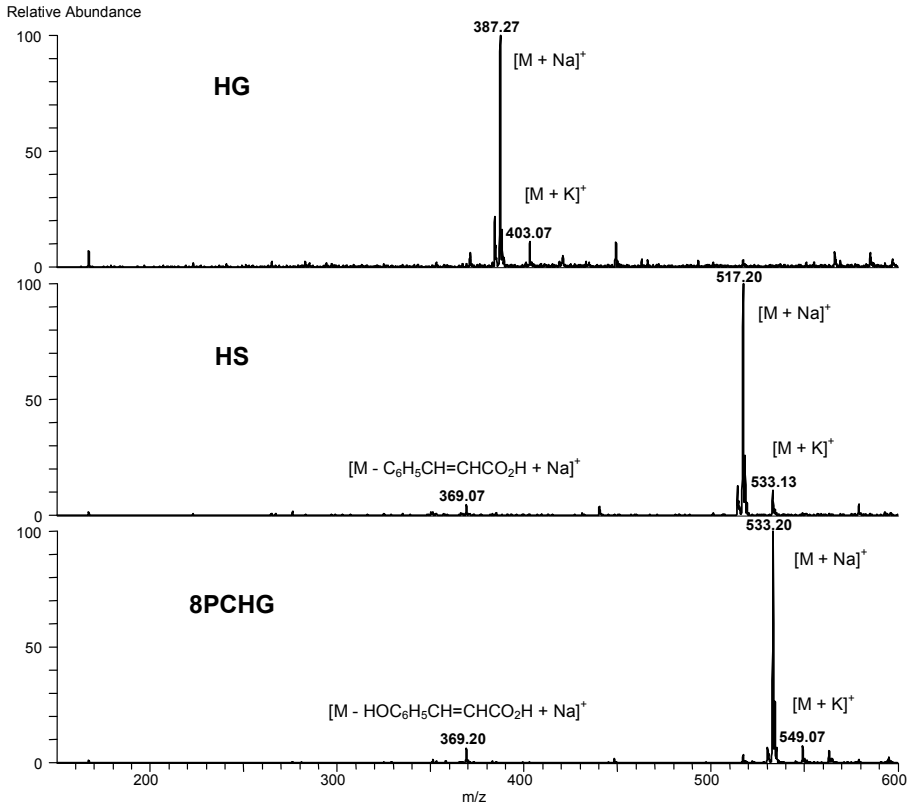


Figure III-2. *Full scan MS spectra of harpagide (HG), harpagoside (HS) and 8-para-coumaroyl harpagide (8PCHG) obtained by infusion of solutions at 10 ng/mL in ESI positive ion mode (LCQ Deca XP Max).*

b. Fragmentations of harpagide

Fragmentations of HG were determined by MS^n with an ion trap mass spectrometer used in the ESI positive ion mode. *Figure III-3* shows the full scan MS^2 spectrum as well as the proposed fragmentation pathways for the *m/z* 387 $[M+Na]^+$ ion of HG. Sodium adduct ions corresponding to loss of water, glucose or both from $[M+Na]^+$ are observed at *m/z* 369, 225 and 207, respectively. The ion at *m/z* 351 results from the loss of two molecules of water. The ions at *m/z* 225, 203 and 185 result from cleavage between the iridoid kernel and the glucose group. As suggested in *Figure III-3*, the ion at *m/z* 269 may correspond to a gluco-furane structure resulting from cleavage and rearrangement of the iridoid kernel. MS^3 experiments selecting *m/z* 387 then *m/z* 369 provide the same product ions as yielded by MS^2 on *m/z* 387, with the exception of *m/z* 225 that is only observed in the latter case. This result is in good agreement with the proposed fragmentation pathways. Further MS^3 experiments show that the ions at *m/z* 185 and 189 are both products of *m/z* 351, resulting from cleavage between the glucose and the iridoid kernel. The same cleavage leads to the formation of *m/z* 185 from *m/z* 269. As a result of dehydration from the 5-OH group, the ion at *m/z* 225 gives *m/z* 207, and subsequent dehydration of the 8-OH group leads to *m/z* 189.

The first dehydration could proceed mainly by trans-elimination of water involving the tertiary 5-OH group and the 6-H. The structure proposed for the resulting ion at *m/z* 369 is stabilized by keto-enol tautomerism, as shown in *Figure III-3*. The second dehydration is assumed to be a trans-elimination between the tertiary 8-OH group and a 10-H; this pathway is preferred to the trans-elimination of the 8-OH with a 7-H in the proposed scheme of fragmentation for HS. MS^4 experiments on the *m/z* 351 ions from HG and HS provide different product ion spectra, allowing the conclusion that the structures of the *m/z* 351 ions differ, depending on whether they originate from HG or from HS. It should be understood that the structures displayed in *Figure III-3* are not definitive; they are in good agreement with the transitions observed and are confirmed by comparing the dissociations of HS and HG. Nevertheless, other isomeric structures, in particular for ions such as *m/z* 369 and 351, can obviously exist since up to seven hydroxyl groups could be involved in dehydration.

In the ESI negative ion mode, the fragmentation pathways are different from those obtained in the positive ion mode because the glucose, not stabilized by a sodium cation, is generally eliminated first. The full scan spectrum displays an ion at *m/z* 363 corresponding to the $[M–H]^-$ ion and an adduct of HG with formate at *m/z* 409. MS^2 experiments conducted on the *m/z* 363 ion led to the following product ions: *m/z* 345 in very low abundance, *m/z* 201, 183, 179 and 165 corresponding to the ions at *m/z* 369, 225, 207, 203 and 189

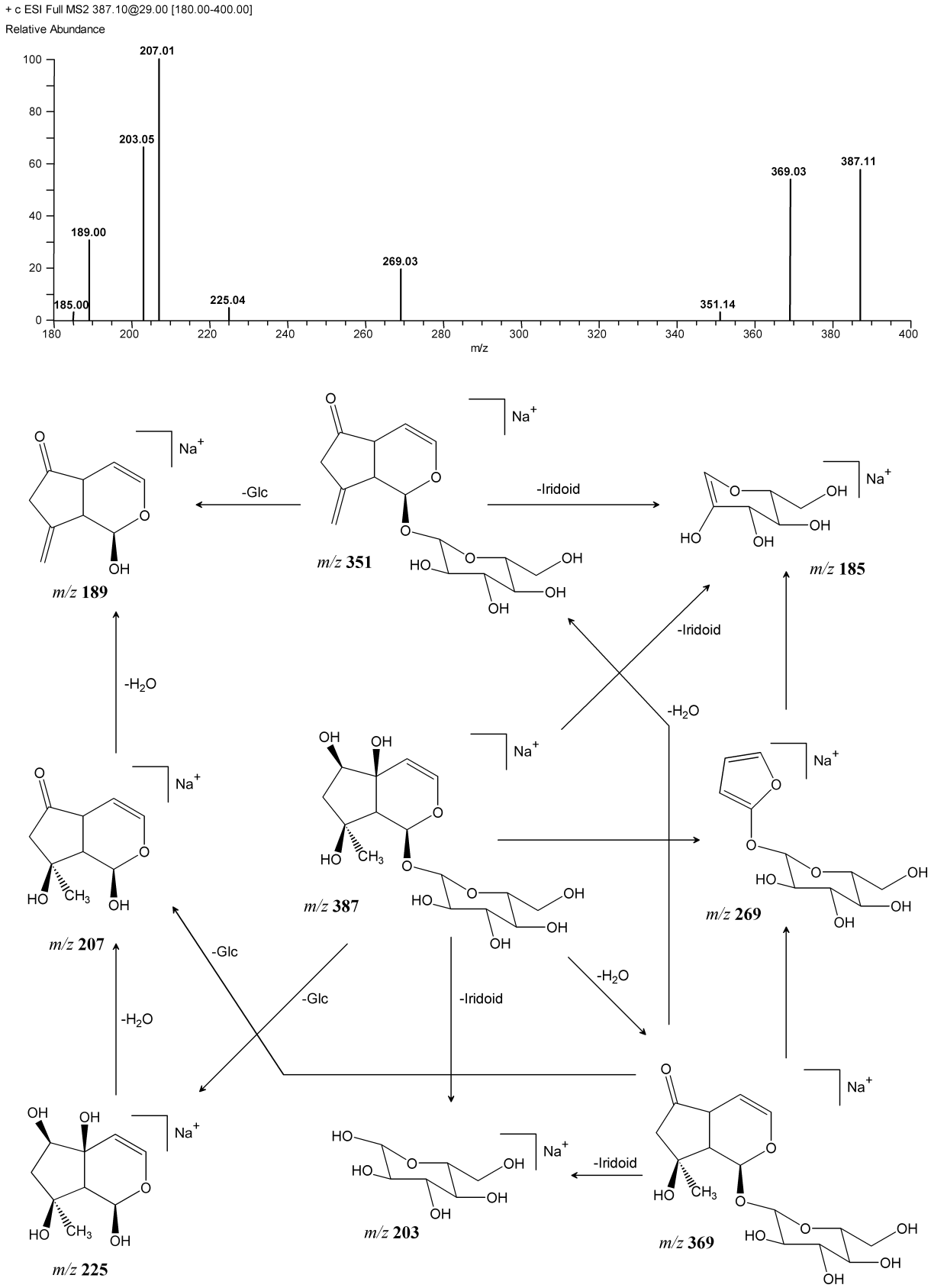


Figure III-3. *Full scan MS² spectrum of sodiated HG in ESI positive ion mode and suggested fragmentation patterns (LCQ Deca XP Max).*

previously described in the ESI positive ion mode, respectively. Two other ions at *m/z* 157 and 139 were observed after CO_2 elimination from $C_{(1)}$–$O_{(2)}$ of the lactone ring from the ions at *m/z* 201 and 183, respectively. No additional ions were observed from MS^3 experiments on *m/z* 201 and 183, but the consecutive fragmentations described in *Figure III-3* were confirmed.

c. Fragmentations of harpagoside

Figure III-4 shows full scan MS^n spectra recorded in the ESI positive ion mode as well as suggested mechanisms of fragmentation for HS. The MS^2 spectrum resulting from dissociation of the *m/z* 517 $[M+Na]^+$ ion shows cleavage of the $C_{(8)}$ of the ester bond leading to a product ion at *m/z* 369. MS^3 performed on the *m/z* 369 ion leads, by trans-elimination of the 5-OH group and of the 6-H, to the loss of a water molecule to *m/z* 351, stabilized by keto-enol tautomerism, as previously shown. MS^4 was conducted on the *m/z* 351 ion and provided competitive fragmentations leading to *m/z* 323 by loss of CO, and to *m/z* 189 corresponding to the iridoid kernel complexed to a Na^+ ion. The ions at *m/z* 203 and 185 include the glucose moiety after cleavage of the $C_{(1)}$–O bond and the $C_{(1')}$–O bond, respectively. The ion at *m/z* 143 is a consecutive product of the *m/z* 203 Na^+-glucose adduct; it is also observed in MS^5 experiments.

The elimination of cinnamoyl acid is assumed to result from a McLafferty rearrangement involving the carbonyl group and one of the hydrogen atoms of $C_{(7)}$, $C_{(9)}$ or $C_{(10)}$. One of the hydrogen atoms on $C_{(7)}$ is the most accessible one in HS according to a recent theoretical study.[22] That is why elimination of a 7-H has been assumed as being the major fragmentation route, and displayed in *Figure III-4*, but other eliminations are also possible. As for HG, the following dehydration could proceed mainly from the tertiary 5-OH group and the 6-H. The charge always remains on the sodium atom complexed to glucose, in agreement with the theoretical results.[22]

Comparable fragmentation pathways are observed in the ESI negative ion mode. The full scan mass spectrum displays a very weak *m/z* 539 ion involving complexation of HS with formate, the $[M–H]^–$ ion at *m/z* 493, and an ion at *m/z* 345 corresponding to elimination of the cinnamic acid ($C_6H_5CH=CHCO_2H$) from the ester function. The *m/z* 147 ion is assumed to correspond to deprotonated cinnamic acid since MS^2 on *m/z* 147 leads to *m/z* 103 by loss of CO_2. Full scan MS^2 performed on the $[M–H]^–$ ion at *m/z* 493 mainly provides the *m/z* 345 ion. Ions at *m/z* 179, 165 and 147 are also observed. MS^3 performed on the *m/z* 345 ion gave mainly *m/z* 327, 179 and 165 ions, corresponding to the *m/z* 351, 203 and 189 ions of the

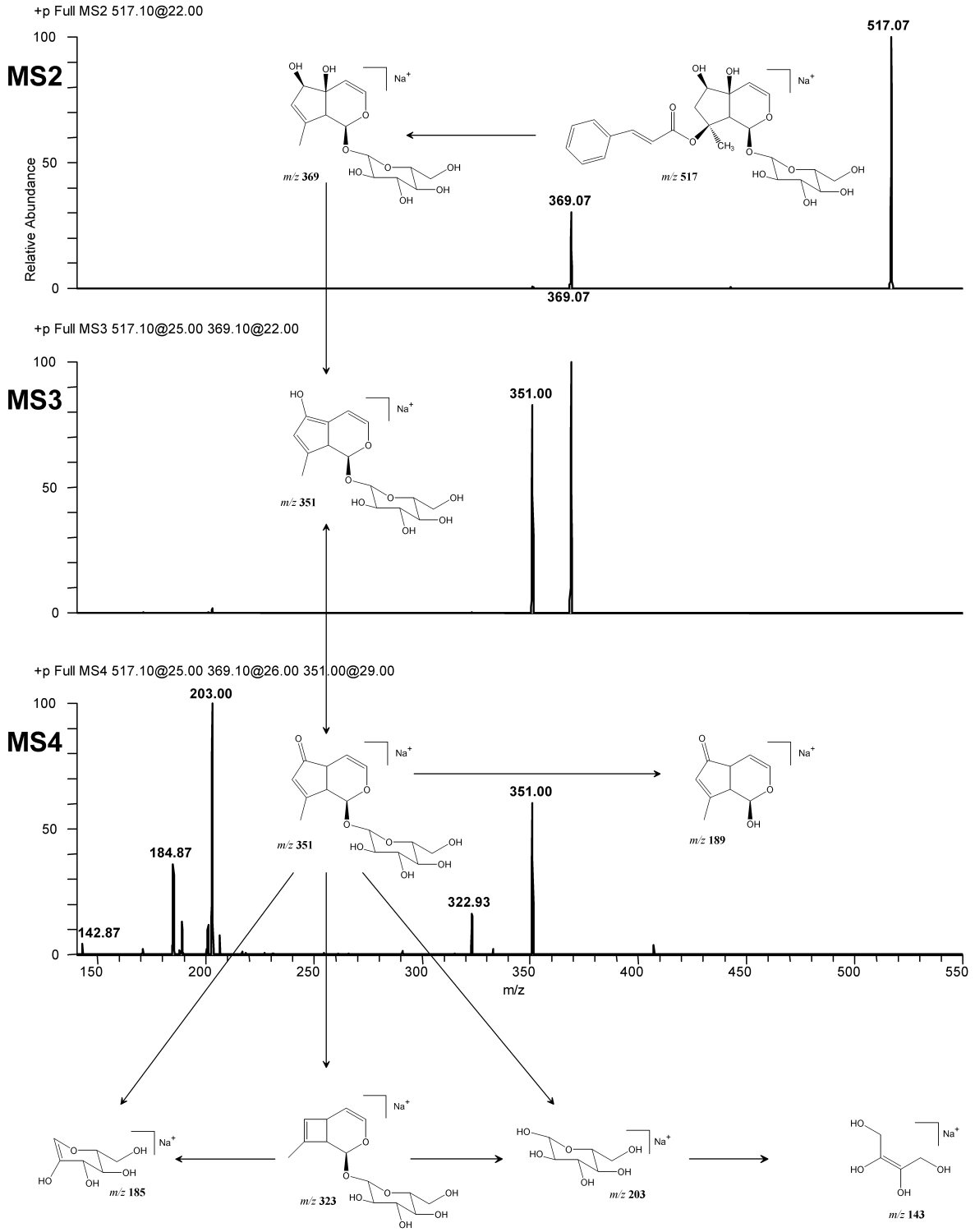


Figure III-4. *Full scan MS^n spectra of sodiated HS in ESI positive ion mode and suggested fragmentation patterns (LCQ Deca XP Max).*

fragmentation scheme suggested for the positive ion mode. MS^4 on *m/z* 179 produces an *m/z* 161 ion equivalent to *m/z* 185 in the positive ion mode.

d. Fragmentations of 8PCHG

8PCHG undergoes the same fragmentation pathways as HS. In the ESI positive ion mode, the only difference between the MS^2 spectra of 8PCHG and HS is the $[M+Na]^+$ precursor ion at *m/z* 533 for 8PCHG instead of *m/z* 517 for HS while, in the negative ion mode, $[M–H]^–$ is at *m/z* 509 for 8PCHG instead of *m/z* 493 for HS.

The fragmentations observed in the ESI negative mode or in MS^n ($n \geq 4$) ESI positive ion mode were used to understand or to confirm the fragmentation pathways but they cannot be used to characterize the analytes in biological samples due to a too low response. The full scan spectra include *ca.* 500-fold fewer ions in negative ion mode than in positive ion mode and each stage of MS^n decreases the signal by *ca.* one order of magnitude.

4.2. Effects of cation attachment with alkali salts

The aim of our study is to detect traces of HS, HG and 8PCHG in complex matrices such as equine urine and plasma. The main problem is the poor response of analytes in positive and negative ion ESI. Initially, the LC/MS method was developed using methanol, to which a 0.1 % aqueous formic acid solution had been added, as the mobile phase. Because of the very low abundance of $[M+H]^+$ ions, sodium adducts were chosen as the precursor ions for MS^n and sodium chloride was deliberately added to the eluent in order to enhance Na^+ complexation.[25] Compared with the spectra obtained with aqueous formic acid solution, no change was observed with a NaCl concentration lower than 0.05 mM while a concentration greater than 0.25 mM led to a decrease in signal intensity. The greatest Na^+ complexation yield was obtained for a sodium salt concentration of 0.15 mM in the aqueous eluent. With a standard solution of HS, a twofold increase in the S/N ratio was provided by addition of the sodium salt: the signal was increased twofold while the noise remained constant. This phenomenon has been verified on spiked urine and plasma matrices. This increase in abundance of $[M+Na]^+$ ions is only observed if NaCl addition is associated with the use of a source CID voltage. The source CID value corresponds to a DC offset voltage between the skimmer and the first octapole. Increasing it provides more kinetic energy to ions. The source CID value had to be adjusted for each molecule on each mass spectrometer. All other source and analyser parameters remained unchanged. Adding NaCl has been proved to be useful to improve sensitivity but the long-term effects on source contamination have not been investigated.

The dissociation pathways of $[M+K]^+$ ions were also studied by MS^n experiments, without addition of potassium since, as for $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ions are observed under 'standard' ESI conditions. At the same CID energy, the product ions are the same as those obtained from $[M+Na]^+$ ions, except that K^+ adducts replace the Na^+ ones; the relative abundances are similar to those of the product ions of $[M+Na]^+$ ions.

Lithium adduct ions have been demonstrated to enhance product ion abundances, compared with sodium or potassium adducts, because they can dissociate under low-energy CID conditions.[26] A solution containing 10 ng/µL of HS in a 50:50 methanol/water + 5m M LiCl mixture was infused to verify the conversion of $[M+Na]^+$ adducts into $[M+Li]^+$ ones. The full scan mass spectrum thus obtained shows a complete conversion of sodiated species into lithiated ones. The spectrum can be summarized as follows (with relative abundances in brackets): $[M+Li]^+$ at *m/z* 501 (100), $[M+LiCl+Li]^+$ at *m/z* 543 (45), $[M+Li–C_6H_5CH=CHCO_2H]^+$ at *m/z* 353 (20), $[M+Li_2–H]^+$ at *m/z* 507 (10), and $[M+Li–C_6H_5CH=CHCO_2H–H_2O]^+$ at *m/z* 335 (7). The consequence of such a dispersion in ion species is a decrease in the signal of $[M+Li]^+$ ions as precursor ions for MS^n experiments. A similar dispersion is observed using lithium iodide instead of lithium chloride.

In LC/MS, lithium chloride was added at 0.15 mM to the eluent (instead of formic acid) in order to form lithium adducts rather than sodium ones. *Figure III-5* shows a full scan MS^2 spectrum of lithiated HS obtained on the 3D ion trap mass spectrometer. The spectrum thus obtained respects the minimum criteria recommended by the AORC guidelines. Indeed, three characteristics peaks were observed in the MS^2 mass spectrum: the precursor $[M+Li]^+$ ion at *m/z* 501, *m/z* 353 resulting from the cleavage at $C_{(8)}$ of the ester bond, and *m/z* 335 resulting from dehydration from *m/z* 353. The relative abundance of the *m/z* 187 ion is too low to retain this ion as a diagnostic one according to the AORC criteria. The fragmentation pathways are similar to those of $[M+Na]^+$ ions, with differences in the relative abundances of product ions for a given CID energy value. The same results were observed with post-column derivation.[27] In this case, a solution of 5 mM of lithium chloride is introduced *via* the sheath liquid route at 2 µL/min using the syringe pump. The lithium solution is then mixed to the HPLC flow just before it is nebulized. If an excess of lithium salts was added only to the sample, no lithium adducts were detected, in agreement with results of previous work on iridoid glycosides.[28] The contribution of lithium salts is effective with standards but the conversion of sodiated adducts into lithiated ones is not complete in the presence of matrix interferents and the signal thus obtained is too low for sensitive analysis.

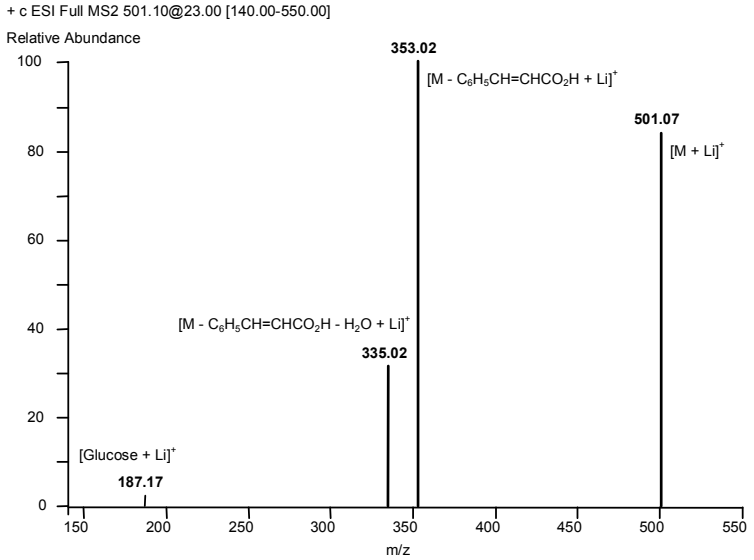


Figure III-5. *Full scan MS^2 spectrum in ESI positive ion mode of lithiated HS at 100 pg/mL with 0.15 mM LiCl in the eluting solvent (LCQ Deca XP Max).*

4.3. Comparison of mass spectrometers

Three mass spectrometers based on different technologies have been compared for HG, HS and 8PCHG analysis: a 3D ion trap *LCQ Deca XP Max*, a triple quadrupole *TSQ Quantum Ultra*, and a linear ion trap *LTQ*. *Table III-1* compares the scan rates of the mass spectrometers; as well as the LoD, LoQ and RSD estimated for each of them with standard solutions of harpagoside. *Figure III-6* shows extracted ion mass chromatograms and CID mass spectra of harpagoside.

Table III-1. *Comparison of mass spectrometers*

		Harpagoside standard			
Mass Spectrometer	Scan time*	Points/peak	RSD (n=12)	LoD	LoQ
LCQ Deca XP Max *(3D-IT)*	MS : 575 ms MS^n : 1000 ms	3-5	10%	1 pg/µL	2.5 pg/µL
TSQ Quantum Ultra *(TQ)*	SRM : 35 ms	> 50	3%	1 pg/µL	2.5 pg/µL
LTQ *(2D-IT)*	MS : 80 ms MS^n : 150 ms	15-18	< 2%	< 1 pg/µL	< 1 pg/µL

* Scan times have been estimated by measuring the number of microscans per minute. They may vary for ion traps according to the autogain control (AGC) parameters.

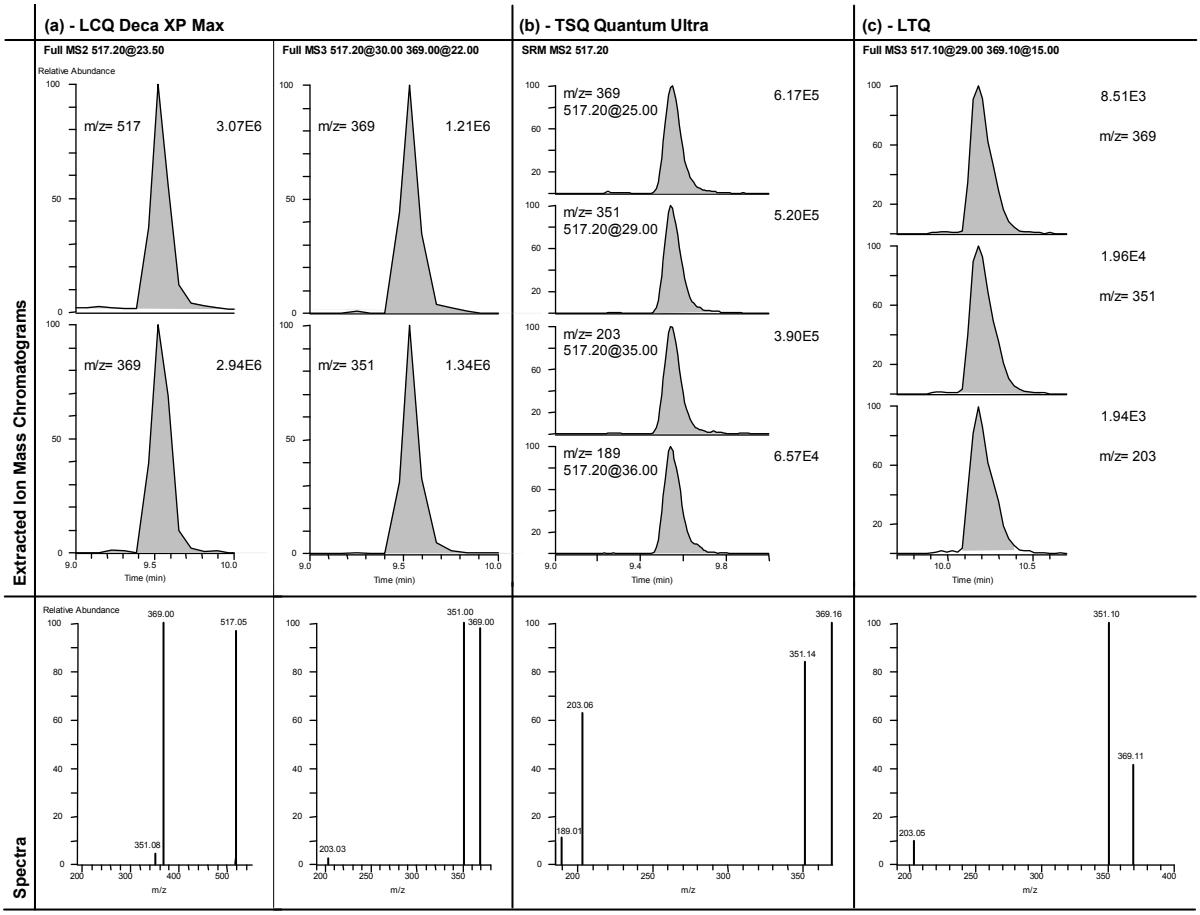


Figure III-6. *Extracted ion mass chromatograms (top) and spectra (bottom) in ESI positive ion mode of sodiated HS at 100 pg/mL obtained with different mass spectrometers: (a) LCQ Deca XP Max in full scan MS^2 and MS^3 modes; (b) TSQ Quantum Ultra in SRM mode; and (c) LTQ in full scan MS^3 mode.*

a. LCQ Deca XP Max

The ion trap LCQ Deca XP Max did not provide sufficient characteristic ions in the full scan mode, so that MS^2 and MS^3 analysis had to be performed. Thus two events were performed in the same segment for each analyte, *i.e.* four events in the segment used for the detection of HS and 8PCHG, which have very close retention times. The scan duration of this ion trap is long compared with other analyzers (see *Table III-1*), so that the chromatographic peaks are only described by 3 to 5 points (see *Figure III-6a*) when quantitation requires at least 10 points for reliable area integrations. The RSD on 12 consecutive injections (10 µL injected on a 25 µL sample loop in partial loop mode; 2 events in the segment) of the HS standard at 50 and 100 pg/mL is about 10 % in SRM (*m/z* 517 → 369) and CRM (*m/z* 517 → 369 → 351) modes. Using the SRM and CRM modes provides selectivity and sensitivity. Moreover, in the presence of biological matrices, SRM and CRM provide mass spectra more

reproducible that those obtained by full scan MS^2. The LoD and the LoQ were estimated on standard solution of HS at 1.0 and 2.5 pg/µL, respectively. This mass spectrometer is suitable for the first step of doping control, *i.e.* screening detection, but not for unambiguous characterization nor for the quantitation of analytes.

b. TSQ Quantum Ultra

The triple quadrupole TSQ Quantum Ultra was used to develop an identification method according to the rules of the AORC minimum criteria. *Figure III-6b* shows extracted *m/z* chromatograms of HS at 100 pg/µL obtained in the SRM mode. Although it is strongly specific and sensitive, SRM can mask the presence of interferent ions, so that the full scan mode has to be preferred for analyte identification in regard of the AORC guidelines (any interferent ion with relative abundances ≥ 20 % in the full scan spectrum). The scan duration of the triple quadrupole is very short (see *Table III-1*) and the chromatographic peaks are well described (more than 50 points per peak). The RSD on 12 consecutive injections of a standard solution of HS (10 µL injected on a 20 µL sample loop in partial loop mode at 50 and 100 pg/µL) is only 3 % in SRM mode (*m/z* 517 → 369). The LoD and the LoQ for HS were estimated at 1.0 and 2.5 pg/µL, respectively. This mass spectrometer offers a good sensitivity and reproducible results. It is well suited for quantitation but an ion trap full scan method is preferred for the identification of the analytes because it allows interferent ions to be seen and it is more sensitive in full scan mode.

c. LTQ

The linear ion trap LTQ provided the same ions as the LCQ Deca XP Max in full scan MS^2 mode. In this study, the interest in using the LTQ mass spectrometer is that, in full scan MS^3, it provided three ions with relative abundances ≥ 10 % for each analyte. Moreover, the relative abundance of each ion is very stable, in the presence of biological matrix or not, and at low or high concentrations, making compliance with AORC minimum criteria easy. The RSD on 12 consecutive 10 µL injections of a standard solution of HS at 50 and 100 pg/µL is less than 2 % in the CRM mode (*m/z* 517 → 369 → 351). This is due to the scan rate of this ion trap (see *Table III-1*), which allows the chromatographic peak to be plotted with about 15 to 18 points. Another advantage of this system, related to MS^3 use, is the absence of interferences, even with complex matrices such as equine urine. This last property allows us to reach a very low LoD and LoQ: LoQ is less than 1 pg/µL for a standard solution of HS. This mass spectrometer provides excellent sensitivity with reproducible spectra and chromatograms. Among those tested, it is the most efficient for confirmation analysis and quantitation.

d. Selectivity

The selectivities of the extraction processes and of the LC/MS^n methods were verified for urine and plasma samples and described in previous work.[19] With the LCQ Deca XP Max, some interferences may occur with $[M+Na]^+$ ions in the MS^2 window, but the other characteristic ions for HG, or the product ions resulting from MS^3 on HS and 8PCHG, allow any doubt to be removed. With the TSQ Quantum Ultra, there are interferent ions in the matrix with the same *m/z* values as the $[M+Na]^+$ ions, so that MS^2 is not really selective in this case. With the LTQ, analyses were performed in MS^3 with sufficient characteristic ions. The probability that a compound from the matrix interferes with an analyte, at the same retention time and with the same MS^3 fragmentations, is very low. For each biological matrix, a blank (a sample from a horse that has received no *Harpagophytum* medication) is compared with the same sample spiked at a known concentration. No interfering peak was observed in the expected retention time window of all the compounds, making this mass spectrometer an ideal tool for identification of the analytes and it will be used for further work on post-administration samples. The selectivity on biological samples with the LTQ is shown in *Figure III-7a* for plasma and *Figure III-7b* for urine.

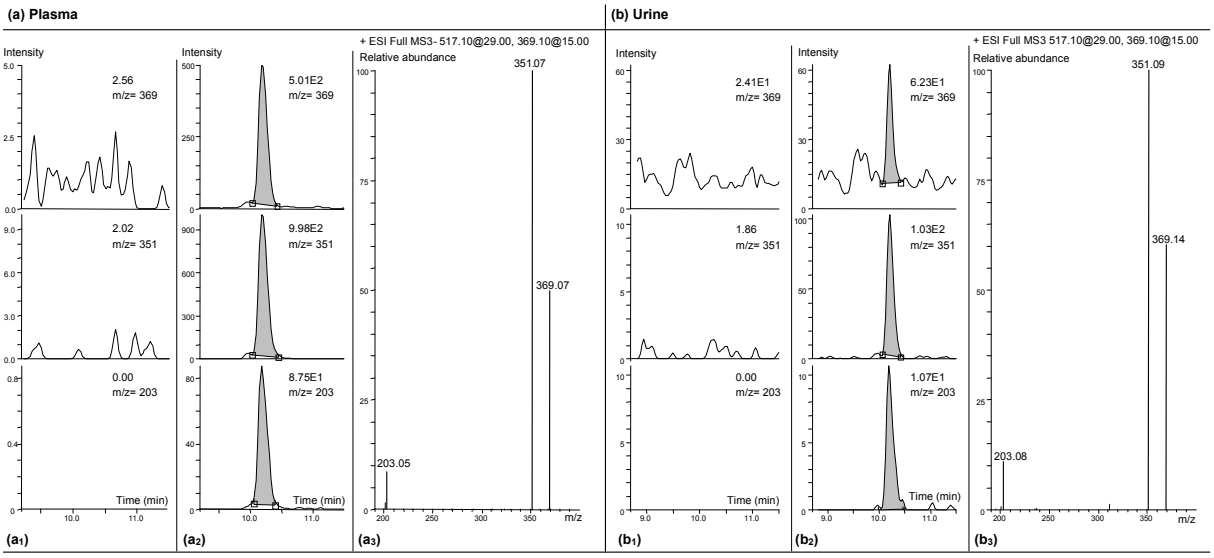


Figure III-7. *Selectivity of harpagoside detection in plasma (a) and urine (b) in ESI positive ion mode. Extracted ion mass chromatograms at m/z 369, 351 and 203, corresponding to the sodiated harpagoside fragmentations in MS^3 mode on the LTQ mass spectrometer, obtained from a blank sample (a_1, b_1), and a biological sample spiked with 2 ng/mL (a_2) or with 10 ng/mL (b_2) of harpagoside. Mass spectra of sodiated harpagoside (a_3, b_3).*

4.4. Semi-quantitative approach of Harpagoside in post-administration samples

The principal aim of our study is to detect the administration of *Harpagophytum*. The main characteristic marker of *Harpagophytum* administration is HS, on which we decided to develop a semi-quantitative approach. A quantitative approach to all analytes on post-administration samples would not be necessary because, as previously seen, HG and 8PCHG are not always present in *Harpagophytum* species. OHL is used as internal standard since no labeled HS standard is available. Other iridoid glycosides (agnuside, picroside II, kutkoside...) have been tested as internal standards, but the results were not satisfactory.

a. Quantitation in plasma

Quantitation in plasma was performed using a calibration graph with blank plasma samples spiked with HS at concentrations ranging from 0.2 to 10 ng/mL and with the internal standard (OHL) at 2.5 ng/mL. The RSDs on 12 different plasmas spiked at 0.5 and 5 ng/mL in HS were determined at 7 and 8 %, respectively, showing the reliability of results: the analysis is quite dependent on the plasma matrix. The LoDs and LoQs measured on the LTQ were less than 0.2 ng/mL in plasma.

b. Quantitation in urine

Quantitation in urine was first developed using a calibration graph with urine samples spiked with HS at concentrations ranging from 0.5 to 75 ng/mL and OHL at 2.5 ng/mL. The RSDs on 12 different urines spiked at 2 and 20 ng/mL in HS were determined at 48 and 42 %, respectively. This variation is too high for quantitation using a calibration graph with good reliability. Quantitation in urine was thus performed using the method of standard additions to avoid matrix interference effects leading to ion suppression, a phenomenon commonly observed with ESI sources.[29] The linearity range of the LTQ mass spectrometer on urine samples was verified from 0.2 to 200 ng/mL, a range suitable for the expected concentrations in post-administration samples. After extraction and evaporation, the extracts were dissolved in a constant volume of 200 µL. Thus, all the required parameters for applying quantitation by the method of standard additions were satisfied. The mean LoDs and LoQs of this method were estimated to be at about 0.2 and 0.5 ng/mL in urine, respectively, but these values are matrix dependent. *Figure III-8* shows an example of quantitation by the method of standard additions on a urine sample collected 4 h after administration of Twydil Artridil.

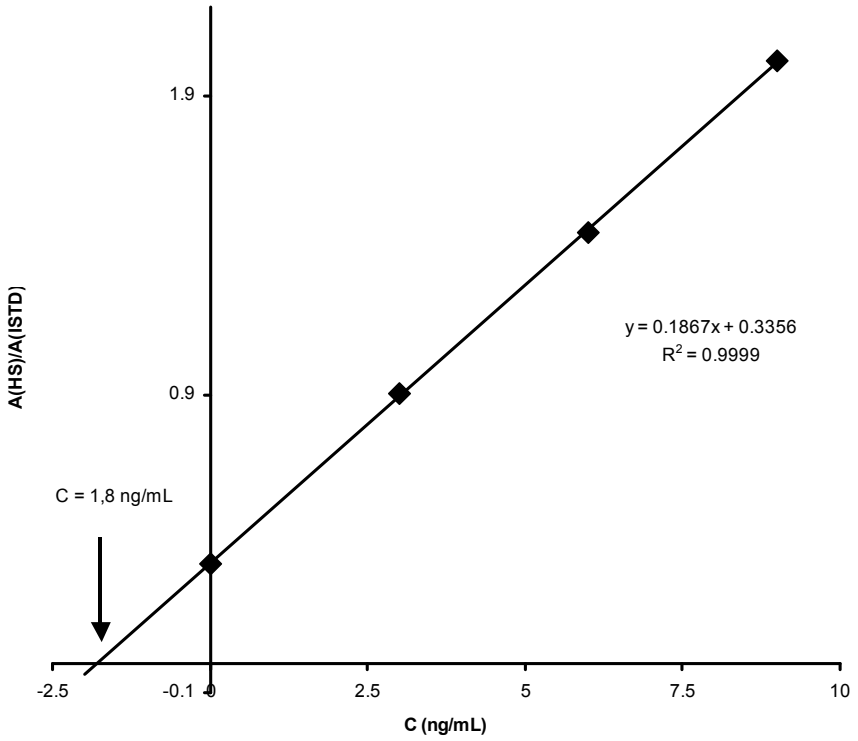


Figure III-8. *Quantitation by standard additions experiment of harpagoside in an equine urine sample collected 4 h after oral administration of Twydil Artridil (LTQ). The sample concentration is obtained at the intersection between the regression line and the X-axis.*

c. Application to post-administration samples

In post-administration plasmas, HS, HG and 8PCHG were detected up to 4 h after oral administration, indicating that the absorption and elimination of *Harpagophytum* compounds are very quick. HG and 8PCHG were only detected when they were present in commercial preparations.

The method of standard additions previously described permits elimination curves of HS in urine to be plotted after oral administration of Harpadol, Harpagophyt, Artridil and harpagoside (*Figure III-9*). HS, 8PCHG and HG were detected up to 24, 12 and 8 h, respectively, after oral administration. HG and 8PCHG were only detected when they were present in commercial preparations.

The HS concentrations in post-administration urine samples seem not to be proportional to the administered dose for the four horses. However, these administrations have been carried out using different HS-containing preparations, so the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters corresponding to each experiment

would not be the same. In addition, in order to compare properly the HS elimination curves, at least six horses should be administered with the same dose of a given preparation.[30]

The fact that HG was only detected when it was present in commercial preparations seems to indicate that for horses HG is not a direct metabolite, even if it is commonly considered that HG is produced by acidification of HS and 8PCHG in the stomach of humans.[2,31] The kinetics of elimination are comparable with those observed for other natural glycoside products such as lignans.[32,33]

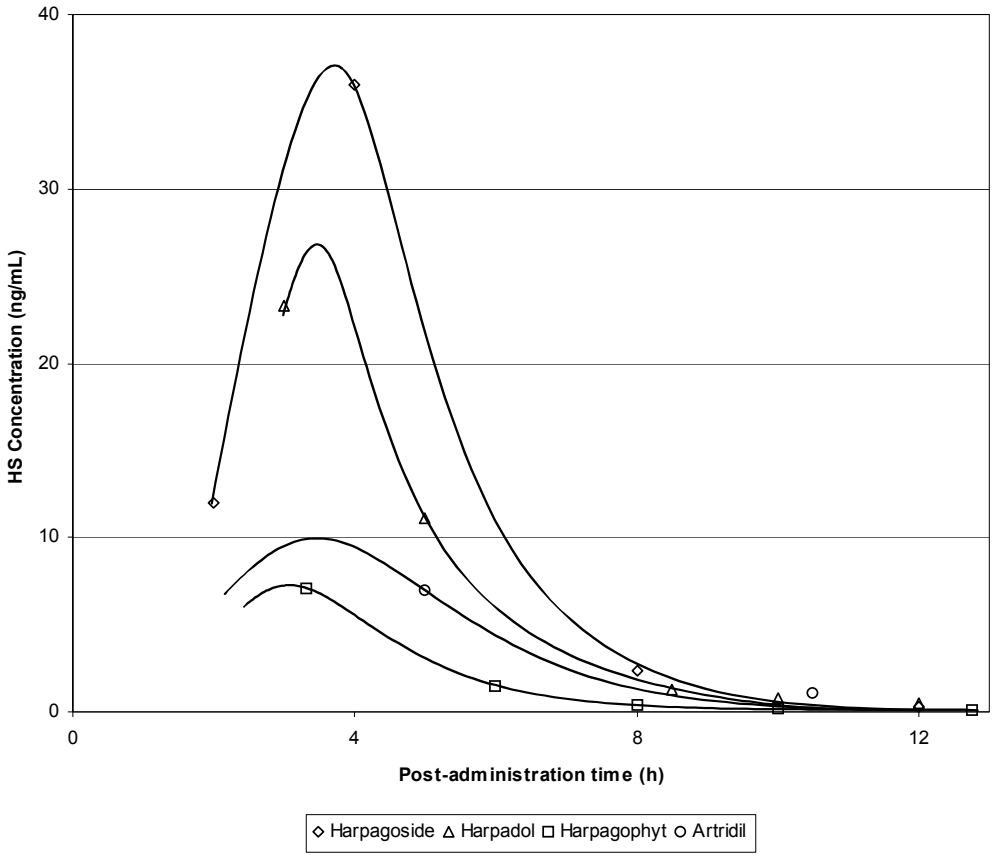


Figure III-9. *Elimination curves of harpagoside in urine after oral administration of Harpadol, Harpagophyt, Artridil and harpagoside.*

5. CONCLUSIONS

The analysis of HG, HS and 8PCHG in equine urine and plasma can be performed by LC/MS using methanol and acidified water as eluent solvent; the resulting mass spectra are largely dominated by $[M+Na]^+$ adduct ions although no sodium salt is added. A method that combines deliberate sodium attachment and source CID has been developed and led to a twofold increase in sensitivity compared with 'classical' conditions. The use of lithium salts has been tested for analyte characterization but these salts are not suitable in the presence of matrix interferences due to an incomplete conversion of sodiated adducts into lithiated ones. MS^n experiments allowed us to propose fragmentation pathways for the $[M+Na]^+$ ions of HG, HS and 8PCHG. The fragmentations described in MS^4, either in the positive or in the negative ion mode, did not fulfill the identification criteria of the AORC guidelines because of the lack of sensitivity of the method.

A comparison of mass analyzers showed that the 3D ion trap LCQ Deca XP Max is well suited for screening analysis, whereas the linear ion trap LTQ is more appropriate for the identification and quantitation of *Harpagophytum* constituents in order to comply with the AORC guidelines. The method allowed us to determinate the kinetics of harpagoside elimination in urine after oral administration of commercial preparations containing *Harpagophytum*.

Acknowledgements

This work was funded by ANRT and by *Les Haras Nationaux*, the French Ministry of Agriculture, Food Trade, Fishing and Rural Business. The authors are indebted to Dr Garin and the staff for assistance with the animal experiments and would like to thank Twydil for donation of horse urine for this project.

6. REFERENCES

1. **Grote K.**
The increased harvest and trade of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) and its impacts on the peoples and environment of Namibia, Bostwana and South Afrika. Global facilitation unit for underutilized species, via dei tre denari, 472a, 00057 Maccarese, Italy, August **2003,** http://www.underutilized-species.org/documents/devils_claw.pdf.

2. **Beresford T.**
The chemistry & pharmacology of *Harpagophytum procumbens*. *The Australian Naturopathic Network*, **2002**, http://www.ann.com.au/features/harpago.htm.

3. **Baghdikian B., Lanhers M.C., Fleurentin J., Ollivier E., Maillard C., Balansard G., Mortier F.**
An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*. *Planta Medica*, **1997**, 63(2), pp. 171-176.

4. **Eich J., Schmidt M., Betti G.**
HPLC analysis of iridoid compounds of *Harpagophytum taxa* – Quality control of pharmaceutical drug material. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, **1998**, 8(2), pp. 75-78.

5. **European Scientific Council on Phytotherapy.**
Harpagophiti radix – Devil's claw root (2nd Edn). Thieme, New York, E/S/C/O/P Monographs, **2003**, pp 233-240.

6. **El-Naggar L.J., Beal J.L.**
Iridoids – A review. *Journal of Natural Products*, **1980**, 43(6), pp. 649-707.

7. **Boros C.A., Stermitz F.R.**
Iridoids – An updated review – Part 1. *Journal of Natural Products*, **1990**, 53(5), pp. 1055-1147.

8. **Chrubasik S., Junck H., Breitschwerdt H., Conradt C., Zappe H.**
Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *European Journal of Anaesthesiology*, **1999**, 16(2), pp. 118-129.

9. **Chrubasik S., Thanner J., Künzel O., Conradt C., Black A., Pollak S.**
Comparison of outcome measures during treatment with the proprietary *Harpagophytum* extract Doloteffin® in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine*, **2002**, 9(3), pp. 181-194.

10. **Chrubasik S., Künzel O., Thanner J., Conradt C., Black A.**
A 1-year follow-up after a pilot study with Doloteffin® for low back pain. *Phytomedicine*, **2005**, 12(1-2), pp. 1-9.

11. **Chrubasik S., Conradt C., Black A.**
The quality of clinical trials with *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine*, **2003**, 10(6-7), pp. 613-623.

12. **Chrubasik S.**
Osteoarthritis: pharmacology and clinical indications of selected botanicals. *The Pain Clinic*, **2004**, 16(1), pp. 1-16.

13. **Andersen M.L., Santos E.H.R., Seabra M.L.V., Da Silva A.A.B., Tufik S.**
Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvent-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 91(2-3), pp. 325-330.

14. **Chantre P., Cappelaere A., Leblan D., Guedon D., Vandermander J., Fournie B.**
Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, **2000**, 7(3), pp. 177-183.

15. **Gagnier J.J., Chrubasik S., Manheimer E.**
Harpagophytum procumbens for ostheoarthitis and low back pain: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2004**, 4:13.

16. **Mahomed I.M., Ojewole J.A.O.**
Analgesic, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) secondary roots aqueous extract. *Phytotherapy Research*, **2004**, 18(12), pp. 982-989.

17. **Thomas J., Meffin P.**
Aromatic hydroxylation of lidocaine and mepivacaine in rats and humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1972**, 15(10), pp. 1046-1049.

18. **Harkins J.D., Mundy G.D., Woods W.E., Lehner A., Karpiesiuk W., Rees W.A., Dirikolu L., Bass S., Carter W.G., Boyles J., Tobin T.**
Lidocaine in the horse: its pharmacological effects and their relationship to analytical findings. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **1998**, 21, pp. 462-476.

19. **Colas C., Garcia P., Popot M.A., Bonnaire Y., Bouchonnet S.**
Optimization of solid-phase extraction for the liquid chromatography/mass spectrometry analysis of harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide and harpagide in equine plasma and urine. *Journal of Chromatographic Science*, **2006**, submitted for publication.

20. **Association of Official Racing Chemists.**
AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry. MS Criteria Working group, Internal communication to AORC members, **2002**.

21. **Van Eenoo P., Delbeke F.T.**
Criteria in chromatography and mass spectrometry – A comparison between regulations in the field of residue and doping analysis. *Chromatographia Supplement*, **2004**, 59(S1), pp. S39-S44.

22. **Colas C., Bouchonnet S., Rogalewicz-Gilard F., Popot M.A., Ohanessian G.**
Proton and sodium cation affinities of harpagide: A computational study. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2006**, 110(23), pp. 7503-7508.

23. **Botek E., Debrun J.L., Hakim B., Morin-Allory L.**
Attachment of alkali cations on β-$_D$-glucopyranose: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight studies and *ab initio* calculations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2001**, 15(4), pp. 273-276.

24. **Mauri P.L., Iemoli L., Gardana C., Riso P., Simonetti P., Porrini M., Pietta P.G.**
Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1999**, 13(10), pp. 924-931.

25. **Dall'Asta C., Sforza S., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R.**
Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1054(1-2), pp. 389-395.

26. **Chen R., Li L.**
Lithium and trasition metal ions enable low energy collision-induced dissociation of polyglycols in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2001**, 12(7), pp. 832-839.

27. **Bruggink C., Maurer R., Herrmann H., Cavalli S., Hoefler F.**
Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1085(1), pp. 104-109.

28. **Kostova M.B., Konaklieva M.I., Alipieva K.I., Popov S.S., Handjieva N.V.**
ESI-MS study of some C_{10} iridoid glycosides. *Instrumentation Science and Technology*, **2005**, 33(6), pp. 691-702.

29. **King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T.**
Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2000**, 11(11), pp. 942-950.

30. **Houghton E., Williams R.B., Toutain P.L.**
In *Proceedings of the 15th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Albert P.H., Morton T., Wade J.F., Eds. R&W Communications, Dubai, United Arab States, **2005**, pp. 16-18.

31. **Guillerault L., Ollivier E., Elias R., Balansard G.**
Determination of harpagide, 8-*para*-coumaroyl harpagide, and harpagoside by high performance liquid chromatography in *Harpagophytum procumbens* drugs and in commercial extract. *Journal of Liquid Chromatography*, **1994**, 17(13), pp. 2951-2960.

32. **Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.**
In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(7), pp. 3178-3186.

33. **Medon P.J., Ferguson P.W., Watson C.F.**
Effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts on hexobarbital metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, 10(2), pp. 235-241.

IV. APPROCHE THÉORIQUE DE LA CATIONISATION

Proton and Sodium Cation Affinities of Harpagide: A Computational Study

Cyril Colas[†,‡], Stéphane Bouchonnet[†], Françoise Rogalewicz-Gilard[†], Marie-Agnès Popot[‡] and Gilles Ohanessian[†].

[†] Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, UMR CNRS 7651, École Polytechnique, Route de Saclay, 91128 Palaiseau Cedex, France.

[‡] Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières le Buisson, France.

The Journal of Physical Chemistry A, **2006**, 110(23), pp. 7503-7508.
Received: March 13, 2006.
In final form: April 21, 2006.

1. ABSTRACT

The aim of this work was to estimate the proton and sodium cation affinities of harpagide (Har), an iridoid glycoside responsible for the anti-inflammatory properties of the medicinal plant *Harpagophytum*. Monte Carlo conformational searches were performed at the semi-empirical AM1 level to determine the most stable conformers for harpagide and its protonated and Na^+-cationized forms. The 10 oxygen atoms of the molecule were considered as possible protonation and cationization sites. Geometry optimizations were then refined at the DFT B3LYP/6-31G* level from the geometries of the most stable conformers found. Final energetics were obtained at the B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G* level. The proton and sodium ion affinities of harpagide have been estimated at 223.5 and 66.0 kcal/mol, respectively. Since harpagide mainly provides $HarNa^+$ ions in electrospray experiments, the $\Delta_r G_{298}$ associated with the reaction of proton/sodium exchange between Har and methanol, $MeOHNa^+ + HarH^+ \rightarrow MeOH_2^+ + HarNa^+$ ***(1)***, has been calculated; it has been estimated to be 1.9 kcal/mol. Complexing a methanol molecule to each reagent and product of reaction ***(1)*** makes the reaction become exothermic by 1.7 kcal/mol. These values are in the limit of the accuracy of the method and do not allow us to conclude definitely whether the reaction is endo- or exothermic, but, according to these very small values, the cation exchange reaction is expected to proceed easily in the final stages of the ion desolvation process.

2. INTRODUCTION

Harpagophytum procumbens or *zeyheri*, also called Windhoek's root or Devil's claw, is a medicinal plant from South Africa, Namibia, and Botswana. Its secondary dried, cut, tuberous roots containing harpagophyton have been included in the *French pharmacopeia* for about fifteen years. In phytopharmaceutical treatment, *Harpagophytum* is usually recommended to treat inflammatory processes. According to Anderson *et al.*, *H. procumbens* acts by migration of interleukins and leucocytes to the painful and inflamed joint area and displays anti-inflammatory, analgesic, and antiphlogistic properties.[1]

As a result of a number of recent studies in rats and humans, *Harpagophytum* is proposed as a complementary treatment for chronic rheumatisms, tendinitis, osteoarthrosis, and arthritis.[2-4] It acts on the muscular system. Athletes also use it to avoid or ease pains due to effort. Herbal preparations containing *Harpagophytum* with other plants are used for prevention of inflammatory processes of competition horses and in the treatment of animals suffering from lameness. Chemically, *Harpagophytum* contains a number of compounds, especially iridoid glycosides like harpagoside, harpagide (Har), and 8-*para*-coumaroyl harpagide, which are assumed to be responsible for the anti-inflammatory properties of the plant. Apart from the recent study by Baranska *et al.*, there is very little information in the literature about the analysis of these compounds from vegetal *medium* and biological fluids.[5]

We recently developed an analytical method involving the coupling of high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) to detect and quantify harpagide in horse plasma and urine.[6] The chemical structure of harpagide is given in *Figure IV-1*.

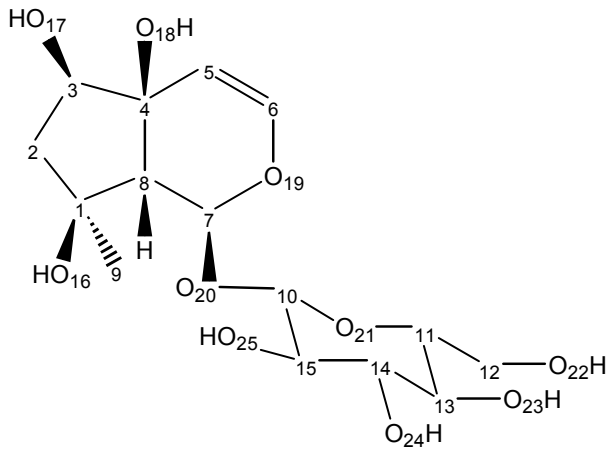


Figure IV-1. *Chemical structure of harpagide and numbering of heavy atoms.*

Under electrospray ionization, a standard solution of harpagide provides much more $HarNa^+$ (sodiated harpagide) than $HarH^+$ (protonated harpagide) pseudomolecular ions, even when only vessels made of polypropylene are used (Pyrex and borosilicate vessels are well-known to provide many sodium ions). The predominance of $HarNa^+$ over $HarH^+$ ions, in the absence of added sodium salts, is a well-known phenomenon in electrospray experiments for a number of complex sugars such as N-linked carbohydrates and oligosaccharides.[7-9] Tandem mass spectrometry experiments showed that the precursor ion of $HarNa^+$ is [$HarNa^+$,MeOH]. $HarNa^+$ ions might result from proton/sodium exchange during the electrospray process of the analyte. Experiments by Amad *et al.* demonstrated that ions formed in solution are likely to be altered in the gas phase by the presence of molecules that are stronger gas phase bases.[10] It must be kept in mind that predominance of $HarNa^+$ ions could also be due to the presence of harpagide sodium salt in the commercial product. The first aim of this study was to estimate the proton and sodium ion affinities of harpagide and the $\Delta_r H_{298}$ associated with reaction ***(1)***:

$$MeOHNa^+ + HarH^+ \rightarrow MeOH_2^+ + HarNa^+ \qquad \textbf{\textit{(1)}}$$

In order to determine the plausibility of the former hypothesis. $\Delta_r H_{298}$***(1)*** can be calculated as:

$$\Delta_r H_{298}\textbf{\textit{(1)}} = SA(\text{MeOH}) + PA(\text{Har}) - PA(\text{MeOH}) - SA(\text{Har})$$

where *SA*(Har) and *SA*(MeOH) are the sodium cation affinities of harpagide and methanol and *PA*(Har) and *PA*(MeOH) the proton affinities of harpagide and methanol, respectively. *SA*(MeOH) and *PA*(MeOH) values are available in the literature; *PA*(Har) and *SA*(Har) have to be calculated. Since $HarNa^+$ ions were retained as precursor ions for MS/MS experiments, the second aim of this study was to obtain information about the possible structures of $HarNa^+$, in order to interpret, in further work, the collision-induced mass spectra of cationized harpagide.

3. COMPUTATIONAL METHODS

3.1. Semi-empirical calculations

Geometry optimizations were first performed at the semi-empirical AM1 level,[11,12] with the *Hyperchem 7.5* package for Windows.[13] Given the large number of possible conformers of Har, $HarH^+$, and $HarNa^+$, Monte Carlo conformational searches were performed on the neutral form and on the cationized structures. Randomized values were assigned to the torsion angles that traduce the rotation of hydroxyl groups around the (C_1-O_{16}), (C_3-O_{17}), (C_4-O_{18}), (C_{12}-O_{22}), (C_{13}-O_{23}), (C_{14}-O_{24}), and (C_{15}-O_{25}) bonds, and the rotation around the (C_{11}-C_{12}), (C_7-O_{20}), and (C_{10}-O_{20}) bonds, according to the numbering presented in *Figure IV-1*. The potential energy surface was then explored from this starting point, along all the torsion angles of the backbone and the O-H bond orientations, without geometry constraint. For each cationised structure, the 10 oxygen atoms were considered as possible cationization sites: the starting geometry is that of the most stable neutral harpagide to which a H^+ or Na^+ cation is bound to an oxygen atom. Ten conformational searches were thus performed for both $HarH^+$ and $HarNa^+$. The Monte Carlo parameters were the following: a Metropolis criterion was used with a temperature of 400 K and a RMS gradient of 0.01 kcal/(Å mol). One to eight dihedral angles were simultaneously changed with torsion variations from ± 30° to 180°. The optimized structures were considered to be duplicates if the difference in energy between two structures was less than 0.1 kcal/mol or if the varied torsion was within 5° or if the RMS error was within 0.25 Å. Each conformational search was stopped after 1000 successfully completed geometry optimizations.

3.2. DFT (Density Functional Theory) calculations

The most stable structure of Har and the most stable conformer of each one of the 10 cationized forms of $HarH^+$ and of the 4 cationized forms of $HarNa^+$ (see below) were submitted to DFT calculations. Geometry optimizations and vibrational frequency calculations were carried out at the B3LYP/6-31G* level in order to check that optimized structures correspond to true minima on the potential energy surface. These calculations were also used to obtain zero point vibrational energies (ZPVE) and thermal corrections at 298 K (E_{therm}). Except as otherwise stated, the relative energies mentioned in the text and in the tables include the E_{therm} correction and are given in kcal/mol. We verified that thermal corrections do not change the energetic ordering of isomers. In order to calculate the proton affinity and the sodium binding affinity of harpagide, final energetics of the most stable conformer of Har, $HarH^+$, and $HarNa^+$ were obtained with B3LYP/6-311+G(2d,2p) wave

functions at the optimized geometries. The *Gaussian 03* program package[14] was used throughout. Optimized geometries are available upon request.

4. RESULTS AND DISCUSSION

PA(Har) and *SA*(Har) are defined as the enthalpies of reactions ***(2)*** and ***(3)***, respectively:

$$\mathrm{HarH^+} \rightarrow \mathrm{Har} + \mathrm{H^+} \qquad \textbf{(2)}$$

$$PA(\mathrm{Har}) = -\Delta_f H_{298}(\mathrm{HarH^+}) + \Delta_f H_{298}(\mathrm{Har}) + \Delta_f H_{298}(\mathrm{H^+})$$

$$\mathrm{HarNa^+} \rightarrow \mathrm{Har} + \mathrm{Na^+} \qquad \textbf{(3)}$$

$$SA(\mathrm{Har}) = -\Delta_f H_{298}(\mathrm{HarNa^+}) + \Delta_f H_{298}(\mathrm{Har}) + \Delta_f H_{298}(\mathrm{Na^+})$$

The calculation of *PA*(Har) and *SA*(Har) requires the determination of the most stable conformation of Har, $HarH^+$, and $HarNa^+$. It led us to establish the preferential binding for H^+ and Na^+ sites in harpagide.

4.1. Geometry of the neutral form

Previous NMR studies[15,16] carried out on harpagide extracted from *H. procumbens* indicated that the configuration of asymmetric carbon atoms is that displayed in *Figure IV-2*, which shows the geometry of the most stable conformer according to our calculations. It is to be noted that the geometry optimization performed at the DFT level did not significantly change the geometric parameters of the most stable conformer obtained by AM1 optimization.

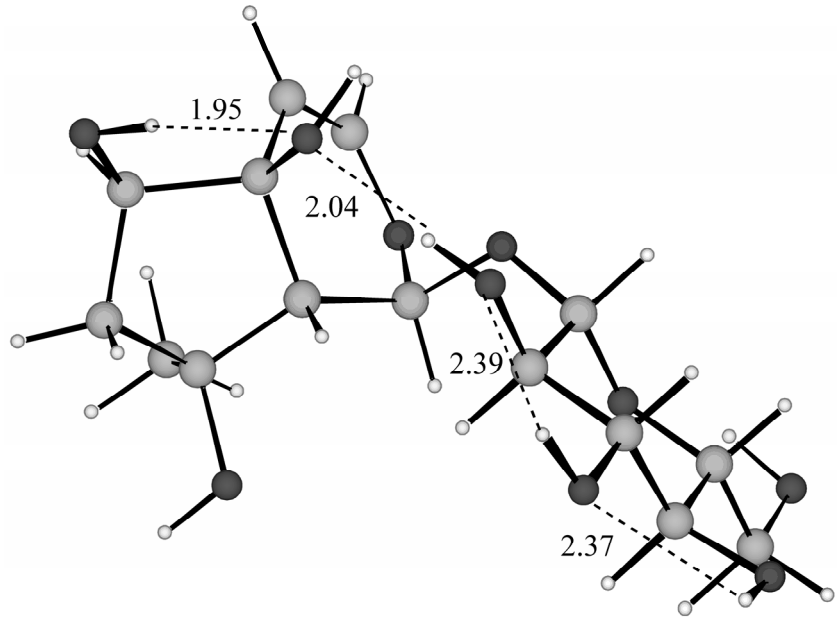


Figure IV-2. *The most stable structure optimized for harpagide, at the B3LYP/6-31G* level. Hydrogen bond lengths (in dotted lines) are in Å.*

As displayed in *Figure IV-2*, the glucose is in the expected chair conformation. The C_1-C_8-C_4-C_5 and C_3-C_4-C_8-C_7 dihedral angle values are 101.5° and 153.0°, respectively. C_8-C_7-O_{20}-C_{10} and C_7-O_{20}-C_{10}-C_{15} dihedral angles were optimized at 97.2° and -72.3°, respectively. The hydrogen atom of the O_{23}-H hydroxy group forms a hydrogen bond with O_{24} while the one of O_{24}-H forms a hydrogen bond with O_{25}. The hydrogen atoms of O_{17}-H and O_{25}-H hydroxy groups are involved in hydrogen bonds with O_{18} (hydrogen bond lengths are given in *Figure IV-2*).

4.2. Geometry of the protonated form

The total and relative energies of the most stable conformers resulting from the protonation of each oxygen atom are given in *Table IV-1*, at the semi-empirical AM1 level and at the B3LYP/6-31G* level. They are named $HarH^+_x$, where *x* is the number (see *Figure IV-1*) of the protonated oxygen atom. At the AM1 level, no proton was transferred during geometry optimization. At the B3LYP/6-31G* level, the geometry optimization of $HarH^+_{24}$ shifted the proton from O_{24} to O_{18} and that of $HarH^+_{20}$ shifted the proton from O_{20} to O_{22}, leading to eight distinct structures. *Table IV-1* shows that the protonation on O_{18} provided the most stable structure according to AM1 calculations while DFT calculations gave $HarH^+_{16}$ as the most stable one. The B3LYP results show that the most favorable protonation sites are O_{16}, O_{18}, and O_{25}. With the AM1 method, these sites are also the most likely to be protonated (although in a different order) but O_{20}, O_{22}, and O_{24} are found to be also favored. This latter result shows the insufficient reliability of semi-empirical calculations to compare the relative energies of isomers of such molecules. However, the AM1 method can be used to compare efficiently the conformers for a given cationization site as described in the Method Validation section.

Table IV-1 *Relative energies of the most stable conformers resulting from protonation of each oxygen atom of harpagide with both AM1 and B3LYP/6-31G* calculation levels*[a].

	$HarH^+_{16}$	$HarH^+_{17}$	$HarH^+_{18}$	$HarH^+_{19}$	$HarH^+_{20}$	$HarH^+_{21}$	$HarH^+_{22}$	$HarH^+_{23}$	$HarH^+_{24}$	$HarH^+_{25}$
AM1	1.8	5.3	0.0	11.9	3.0	6.9	1.4	18.0	4.4	4.4
B3LYP/6-31G*	0.0	12.6	2.2	21.7	*b*	7.8	7.4	17.9	*c*	2.8

[a] Values are given in kcal/mol.

[b] The proton on O_{20} shifted to O_{22} during geometry optimization of $HarH^+_{20}$ so that geometry optimizations of $HarH^+_{20}$ and $HarH^+_{22}$ led to the same structure.

[c] In the same way, the proton on O_{24} shifted to O_{18} during geometry optimization of $HarH^+_{24}$.

$HarH^+_{16}$ has been retained as the most stable structure of protonated harpagide. Its geometry optimized at the B3LYP/6-31G* level is displayed on *Figure IV-3*. It shows that the

most stable geometry of protonated harpagide is very different from that of the neutral molecule. Both hydrogen atoms on O_{16} are involved in hydrogen bonds: the first one with O_{17}, the second one with O_{22}. The latter and the hydrogen bond between the hydrogen of O_{18}-H with O_{24} lead the molecule to fold up. The C_1-C_8-C_4-C_5 and C_3-C_4-C_8-C_7 dihedral angle values are 105.5° and -143.8°, respectively. C_8-C_7-O_{20}-C_{10} and C_7-O_{20}-C_{10}-C_{15} dihedral angles were optimized at 107.7° and -171.0°, respectively. The structure is stabilized by seven hydrogen bonds, including the three ones mentioned above. The hydrogen atom of the O_{17}-H hydroxy group forms a hydrogen bond with O_{18}, the hydrogen of O_{22}-H with O_{23}, the hydrogen of O_{24}-H with O_{25}, and that of O_{25}-H with O_{20} (hydrogen bond lengths are given on *Figure IV-3*).

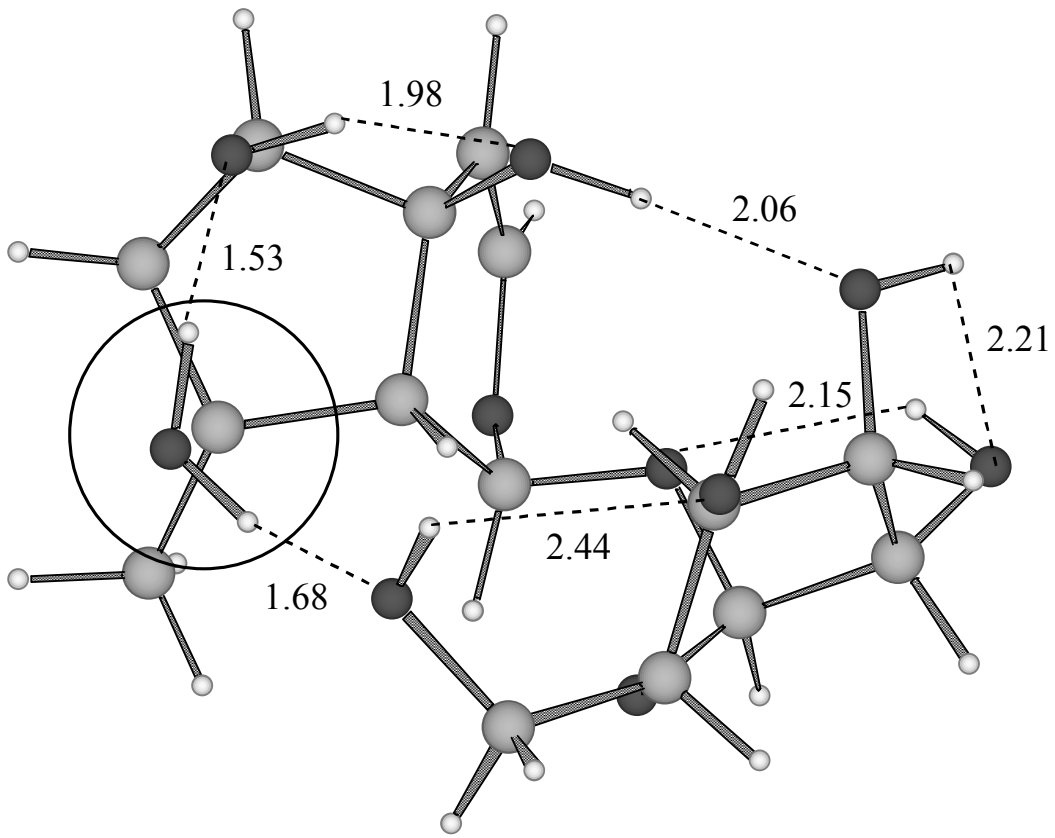


Figure IV-3. *The most stable structure of protonated harpagide, optimized at the B3LYP/6-31G* level: $HarH^+_{16}$. The protonation site is circled. Hydrogen bond lengths (in dotted lines) are in Å.*

4.3. Geometry of the Na^+-cationized form

Geometry optimizations of harpagide-Na^+ complexes were carried out in the same way as for $HarH^+$ ions, *i.e.* performing Monte Carlo conformational searches from 10 starting points, each one corresponding to cationization on a different oxygen atom. The starting

points are named $HarNa^+_x$, where *x* is the number (see *Figure IV-1*) of the oxygen atom which is cationized. It is to be noted that conformational searches performed on $HarNa^+_{18}$ to $HarNa^+_{24}$ provided minima very close to each other in energies and structures. DFT optimization of these minima led to the same structure, named $HarNa^+_{II}$ (see below), in which the Na^+ ion is chelated between four oxygen atoms: O_{18}, O_{20}, O_{21}, and O_{22}. $HarNa^+_I$ results from the conformational search on $HarNa^+_{25}$; in this structure, the sodium ion is bonded to O_{18}, O_{20}, O_{24}, and O_{25}. $HarNa^+_{III}$, in which Na^+ is bonded to O_{16}, O_{17}, and O_{22}, corresponds to the most stable structure obtained from the conformational search from $HarNa^+_{17}$. $HarNa^+_{IV}$ results from the conformational search of $HarNa^+_{16}$: Na^+ is complexed to O_{16}, O_{20}, O_{21}, and O_{22}. The geometries optimized are consistent with previous work by Cerda and Wesdemiotis, who studied the multidentate coordination of sodium ion by the oxygen sites of sachacharides and showed that Na^+ is usually attached to three or four oxygen atoms.[17] In the same way, an *ab initio* study by Botek *et al.* devoted to cationization of glucopyranose showed that Na^+ is coordinated to four oxygen atoms.[18] Although multidentate binding was expected for harpagide as well, we chose to start with all 10 possible monodentate structures in order to avoid as much as possible *a priori* biases, and to explore the potential energy surface in a comprehensive manner. The fact that the 10 starting structures converged to only four distinct minima is an indication that the structures obtained are the most stable. The relative energies and the oxygen atoms involved in Na^+ complexation in the four resulting minima, namely, $HarNa^+_I$ to $HarNa^+_{IV}$, are given in *Table IV-2*. The energy ordering of the four complexes is not the same for AM1 and DFT calculations, as already noted for $HarH^+$ structures. Given the small energy differences between the four minima, further single point calculations were performed at the B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G* level. Semi-quantitative agreement is obtained between both DFT levels. $HarNa^+_I$ corresponds to the most stable isomer; it has been retained for the determination of sodium affinity of harpagide.

Table IV-2. *Relative energies at AM1, B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G* calculation levels for the most stable conformers of Na^+-cationized harpagide[a].*

	$HarNa^+_I$	$HarNa^+_{II}$	$HarNa^+_{III}$	$HarNa^+_{IV}$
Na^+ coordination	O_{18}, O_{20}, O_{24}, O_{25}	O_{18}, O_{20}, O_{21}, O_{22}	O_{16}, O_{17}, O_{22}	O_{16}, O_{20}, O_{21}, O_{22}
AM1	3.3	0.0	5.3	3.2
B3LYP/6-31G*	0.0	1.7	3.4	12.6
B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G*	0.0	3.4	5.9	10.0

[a] Values are given in kcal/mol.

Figures IV-4a-d display the most stable structures, $HarNa^+_I$ to $HarNa^+_{IV}$, optimized at the B3LYP/6-31G* level. Based on the computed geometries for Na^+-alcohol and Na^+-ether species,[19-23] we consider that Na^+ is bound to an oxygen atom if the O-Na^+ distance is smaller than 2.7 Å. In $HarNa^+_I$, Na^+ is bound to four oxygen atoms: O_{18}, O_{20}, O_{24}, and O_{25}. The hydrogen atom of the O_{18}-H hydroxy group forms a hydrogen bond (1.91 Å) with O_{17}, that of O_{17}-H with O_{16} (1.94 Å). An electrostatic interaction is also involved between the hydrogen atom of the O_{24}-H hydroxy group and O_{23} (distance H• • •O_{23}) 2.63 Å). In $HarNa^+_{II}$, Na^+ is bonded to O_{18}, O_{20}, O_{21}, and O_{22}. As in $HarNa^+_I$, the hydrogen atom of the O_{18}-H hydroxy group forms a hydrogen bond (1.90 Å) with O_{17}, that of O_{17}-H with O_{16} (1.96 Å). $HarNa^+_{III}$ is the only low-energy isomer found where Na^+ is complexed to only three oxygen atoms: O_{16}, O_{17}, and O_{22}. Two hydrogen bonds are involved in $HarNa^+_{III}$: one between the hydrogen atom of the O_{17}-H hydroxy group and O_{18} (2.08 Å) and one between the hydrogen atom of the O_{22}-H hydroxy group and O_{23} (2.05 Å). In $HarNa^+_{IV}$, Na^+ is complexed to O_{16}, O_{20}, O_{21}, and O_{22}. The hydrogen atom of the O_{18}-H hydroxy group forms a hydrogen bond (2.12 Å) with O_{17}, that of O_{25}-H with O_{19} (1.88 Å).

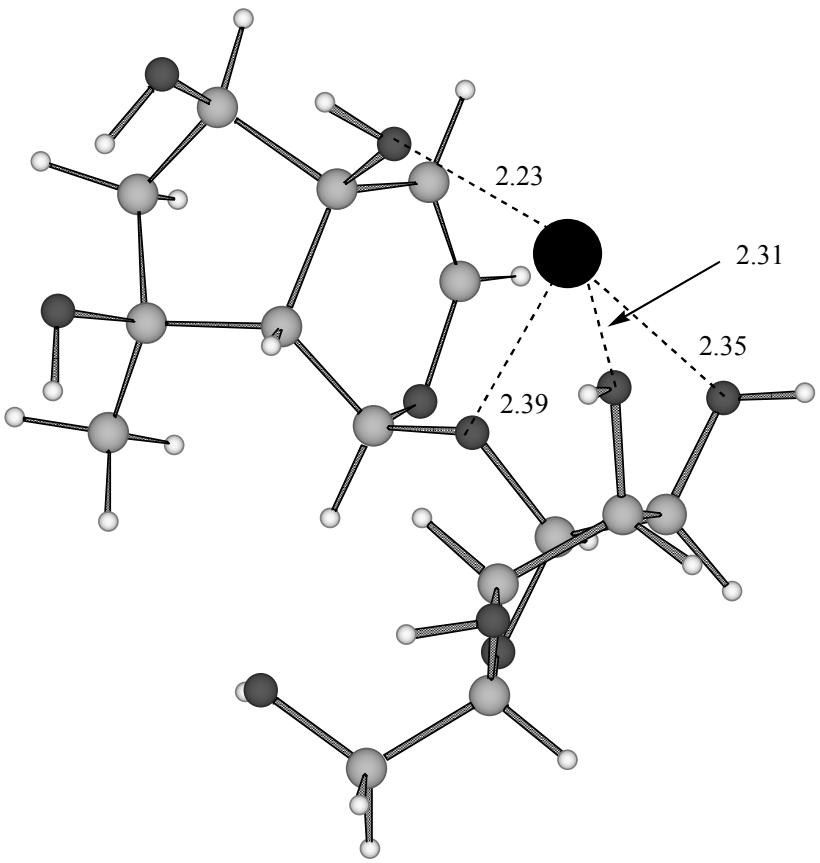


Figure IV-4a. *Geometry of $HarNa^+_I$ optimized at the B3LYP/6-31G* level; distances are in Å.*

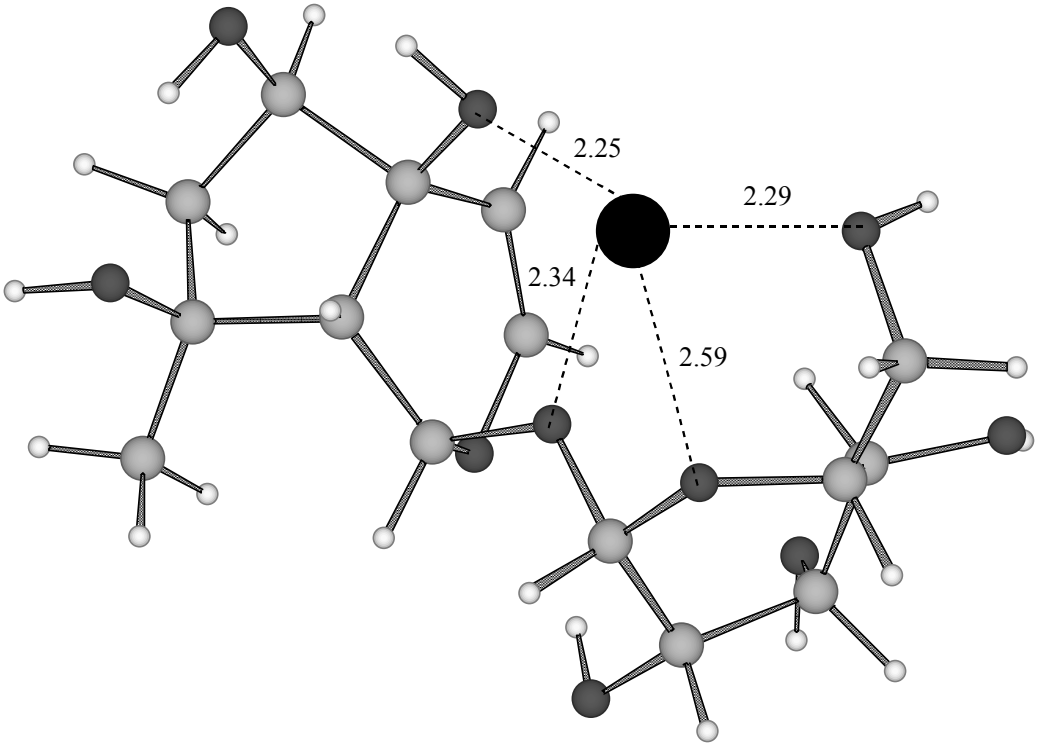


Figure IV4b. *Geometry of $HarNa^{+}_{II}$ optimized at the B3LYP/6-31G* level; distances are in Å.*

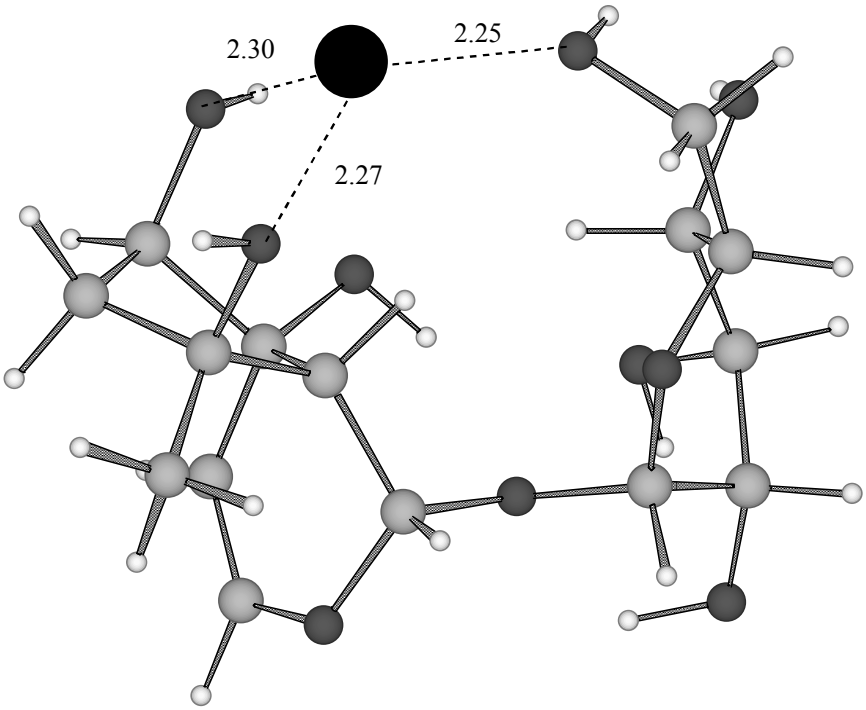


Figure IV-4c. *Geometry of $HarNa^{+}_{III}$ optimized at the B3LYP/6-31G* level; distances are in Å.*

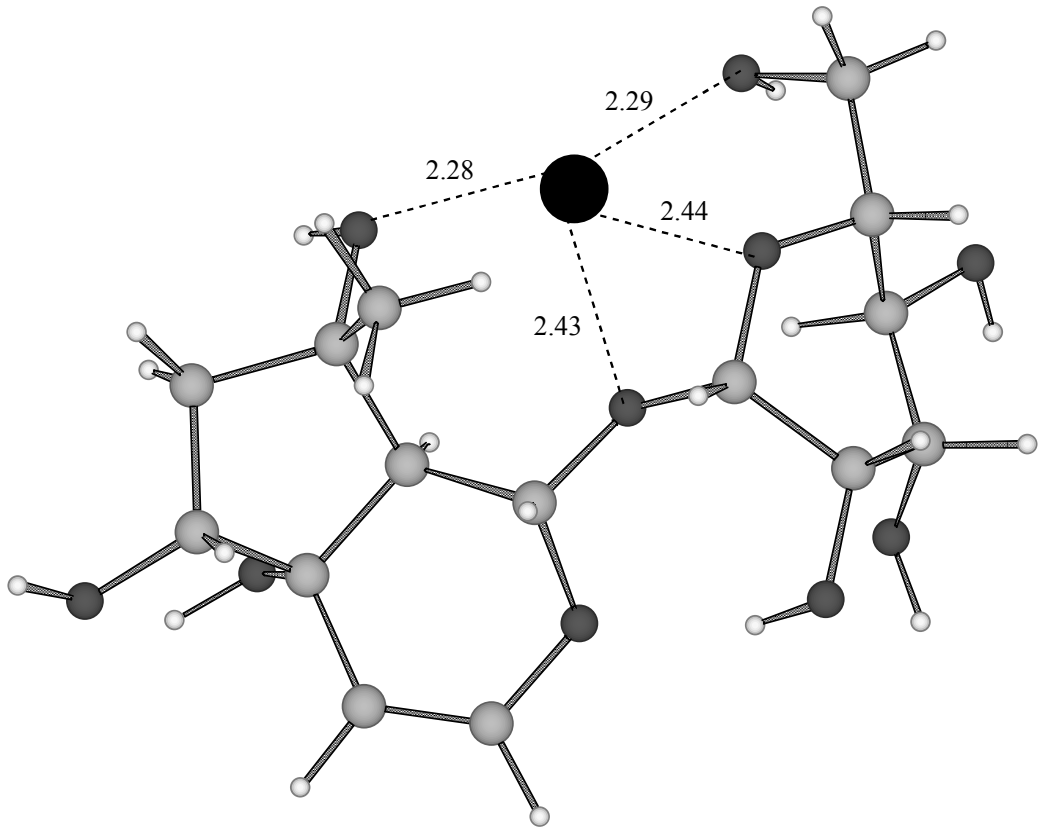


Figure IV-4d. *Geometry of $HarNa^{+}_{IV}$ optimized at the B3LYP/6-31G* level; distances are in Å.*

5. METHOD VALIDATION

The aim of the Monte Carlo conformational searches is to find the most stable structure of $HarH^+$ and that of $HarNa^+$, for the determination of *PA*(Har) and *SA*(Har), respectively. Therefore, it is to be remarked that the second or third *best* geometry for a given $HarH^+$ or $HarNa^+$ isomer might have an energy lower than the most stable geometry of an other isomer. It could lead to omission of the true minimum if DFT calculations modify the stability order for the AM1 minima of a given isomer. In order to check that the energy orders of conformers are the same according to both levels of calculation, the three geometries of lowest energies found for each of the isomers of $HarH^+_{16}$, $HarH^+_{25}$, and $HarNa^+_{18}$ by AM1 conformational searches were also computed at the DFT level. Relative energies of protonated and cationized conformers are compared in *Table IV-3*.

Table IV-3. *Relatives energies, in kcal/mol, of the three most stable conformers of $HarH^+_{16}$, $HarH^+_{25}$ and $HarNa^+_{18}$ at both AM1 and B3LYP/6-31G* levels.*

	$HarH^+_{16}$			$HarH^+_{25}$			$HarNa^+_{18}$		
	min 1	min 2	min 3	min 1	min 2	min 3	min 1	min 2	min 3
AM1	0.0	0.8	1.2	0.0	3.7	5.4	0.0	0.2	1.0
B3LYP/6-31G*	0.0	1.3	4.3	0.0	0.6	3.4	0.0	0.8	2.6

According to values in *Table IV-3*, semi-empirical and DFT results are in good agreement concerning the stability order of conformers. It is therefore very unlikely that the overall minimum has been missed with the computational procedure used.

6. Determination of Proton and Cation Sodium Affinities

The total energies determined at the B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G* level for H^+, Na^+, Har, $HarH^+$, and $HarNa^+$ are given in *Table IV-4*.

Table IV-4. *Total energies, E (B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G*), and thermal corrections at 298 K, E_{therm} (B3LYP/6-31G*) of the most stable structure of each species.*

species	*E* (hartree)	E_{therm} (kcal/mol)
H^+	0	0.9
Na^+	-162.087523	0.9
Har	-1338.670194	270.5
$HarH^+$	-1339.037162	278.7
$HarNa^+$	-1500.863430	272.3

Calculation of the proton affinity of Har is done as follows:

$$PA(\text{Har}) = -[E(\text{HarH}^+) + E_{therm}(\text{HarH}^+) + RT] + [E(\text{Har}) + E_{therm}(\text{Har}) + RT] + [E(H^+) + E_{therm}(H^+) + RT]$$

Using the results displayed in *Table IV-4*, the proton affinity of harpagide is calculated as *PA*(Har) = 223.5 kcal/mol. In the same manner, the sodium ion affinity of harpagide is calculated as *SA*(Har) = 66.0 kcal/mol.

The computed sodium ion affinity of harpagide is significantly smaller than the sum of the affinities of methanol molecules in $Na^+(CH_3OH)_4$ (66.0 *vs* about 80.0 kcal/mol),[24] even though the number of oxygens is the same and the functional groups are similar. This is due to the fact that harpagide has to fold to provide several binding sites simultaneously, which has an intramolecular energy cost. In addition, this does not allow for optimum binding of each individual site. Previous calculations on molecules with analogous binding oxygens have already underlined this feature. For instance, a 1,2-diol or a 1,3-diol cannot bind as strongly as two individual alcohol molecules,[19-23] and glycerol has a binding interaction with Na^+ that is much smaller than those of 3 methanol molecules (44.0 *vs* about 65.0 kcal/mol).[23,24] The *SA* computed for harpagide is not much different from the value determined for monosaccharides by Cerda and Wesdemiotis.[17]

The calculation of the $\Delta_r H_{298}$ of reaction ***(1)***, $\Delta_r H_{298}$***(1)*** = *SA*(MeOH) + *PA*(Har) - *PA*(MeOH) - *SA*(Har), requires *PA*(MeOH) and *SA*(MeOH) values. The literature values for *PA*(MeOH) and *SA*(MeOH) are 180.3 kcal/mol[25] and 24.0 kcal/mol, respectively;[19-22] they were retained for the calculation of $\Delta_r H_{298}$***(1)***. At the B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-31G* level, we determined *PA*(MeOH) = 179.2 kcal/mol and *SA*(MeOH) = 25.2 kcal/mol, in good agreement with literature data. $\Delta_r H_{298}$***(1)*** = 24.0 + 223.5 - 180.3 - 66.0 = 1.2 kcal/mol. $\Delta_r S_{298}$***(1)*** was calculated as $\Delta_r S_{298}$***(1)*** = $S_{298}(MeOH_2^+)$ + $S_{298}(HarNa^+)$ - $S_{298}(MeOHNa^+)$ - $S_{298}(HarH^+)$. Our calculations gave $\Delta_r S_{298}$***(1)*** = 58.36 + 162.19 - 70.04 - 152.71 = -2.2 cal•mol^{-1}•K^{-1}. $\Delta_r G_{298}$***(1)*** can be calculated as $\Delta_r G_{298}$***(1)*** = $\Delta_r H$***(1)*** - T$\Delta_r S_{298}$***(1)*** = 1.2 - [298.15(-2.2)/1000] = 1.9 kcal/mol. Such a value is in the limit of the accuracy of the method and does not allow us to conclude definitely whether reaction ***(1)*** is endo- or exothermic. Given this very small value, reaction ***(1)*** is expected to proceed easily in the final stages of the ion desolvation process. Thus it is conceivable that harpagide is under its protonated form in solution, and that a cation transfer reaction occurs in the gas phase, leading to the observation of $HarNa^+$ as the predominant pseudo-molecular ion.

7. MICROSOLVATION: EFFECT OF A METHANOL MOLECULE COMPLEXATION TO EACH REAGENT AND PRODUCT OF REACTION *(1)*

It is to be noted that reaction *(1)* does not take into account any solvation effect. Let us consider reaction *(4)* corresponding to reaction *(1)* to which a methanol molecule has been complexed to each reagent and product.

$$(MeOH)_2Na^+ + [Har,MeOH,H^+] \rightarrow (MeOH)_2H^+ + [Har,MeOH,Na^+] \qquad (4)$$

Calculation of $\Delta_r H_{298}$*(4)* requires the knowledge of the $\Delta_r H_{298}$ for reactions *(5)* to *(8)*:

$$(MeOH)H^+ + MeOH \rightarrow (MeOH)_2H^+ \qquad (5)$$

$$(MeOH)Na^+ + MeOH \rightarrow (MeOH)_2Na^+ \qquad (6)$$

$$HarH^+ + MeOH \rightarrow [Har,MeOH,H^+] \qquad (7)$$

$$HarNa^+ + MeOH \rightarrow [Har,MeOH,Na^+] \qquad (8)$$

Literature data provide values of -32.6 kcal/mol[26] and -20.5 kcal/mol[27] for $\Delta_r H_{298}$*(5)* and $\Delta_r H_{298}$*(6)*, respectively. Geometries of the complexes [Har,MeOH,H^+] and [Har,MeOH,Na^+] were optimized at the B3LYP/6-31G* level from the most stable structures of $HarH^+$ and $HarNa^+$ to which a methanol molecule was added. The resulting structures are displayed in *Figures IV-5a-b*. [Har,MeOH,H^+] is a proton-bound dimer of Har and MeOH, with a shorter O• • •H^+ bond on the Har side (1.10 *vs* 1.35 Å), consistent with the larger proton affinity of Har. The hydroxyl group of methanol also makes a strong hydrogen bond with O_{22} (1.67 Å). Thus introducing the methanol molecule into the structure of $HarH^+_{16}$ makes a hydrogen bond network between O_{16} and O_{22}, leading to a significant stabilization. The structure of $HarNa^+_I$ is such that an additional methanol molecule can easily bind to Na^+. Still, the complexation of methanol to Na^+-cationized harpagide leads to an increase of the distances between Na^+ and the four oxygen atoms to which Na^+ is bonded, of 0.06 to 0.08 Å (see *Figures IV-4a* and *IV-5b*). This accounts for the relief of steric repulsions between ligands in the more crowded sodium environment. $\Delta_r H_{298}$*(7)* and $\Delta_r H_{298}$*(8)* were estimated at the B3LYP/6-311+G(2d,2p) level to be -19.4 and -9.7 kcal/mol, respectively. The binding enthalpy of the additional methanol molecule on $HarNa^+$ is comparable to that of the fifth and sixth molecules in $Na^+(CH_3OH)_n$, which have been computed to be 6.5 and 12.3 kcal/mol, respectively.[24] $\Delta_r H_{298}$*(4)* can be calculated as $\Delta_r H_{298}$*(4)* = 1.2 - 32.6 + 20.5 + 19.4-9.7 = -1.2 kcal/mol. $\Delta_r S_{298}$*(4)* can be calculated as $\Delta_r S_{298}$*(4)* = $\Delta_r S_{298}$*(1)* + $\Delta_r S_{298}$*(5)* - $\Delta_r S_{298}$*(6)* - $\Delta_r S_{298}$*(7)* + $\Delta_r S_{298}$*(8)* = -2.2 - 29.0 + 21.7 + 33.1 - 21.8 = 1.8 cal•mol^{-1}•K^{-1}. $\Delta_r S_{298}$*(1)*, $\Delta_r S_{298}$*(7)*,

and $\Delta_r S_{298}$(***8***) are issued from our calculations while $\Delta_r S_{298}$(***5***) and $\Delta_r S_{298}$(***6***) values were taken from the literature.[26,28] $\Delta_r G_{298}$(***4***) = $\Delta_r H_{298}$(***4***) - T$\Delta_r S_{298}$(***4***) = -1.2 - (298.15x1.8/1000) = -1.7 kcal/mol. Complexing a methanol molecule to the reagents and products of reaction *(**1**)* makes it become slightly exothermic but does not change the reaction enthalpy significantly. It is likely that further solvation would not change the conclusion that reaction *(**1**)* is relatively easy at room temperature.

It is to be remarked that a model using only two molecules of methanol is certainly insufficient given the enormous capacity of harpagide to form hydrogen bonds with the solvent, even if it is likely that some of the interactions between harpagide and methanol molecules would cancel out comparing the protonated and the cationized forms. Given its insufficiency, the model just allows one to conclude that the proton/sodium exchange reaction is quasi thermoneutral at the end of the desolvation step, as in the gas phase; it does not allow one to conclude about the feasibility of proton/sodium ion exchange in bulk solvent.

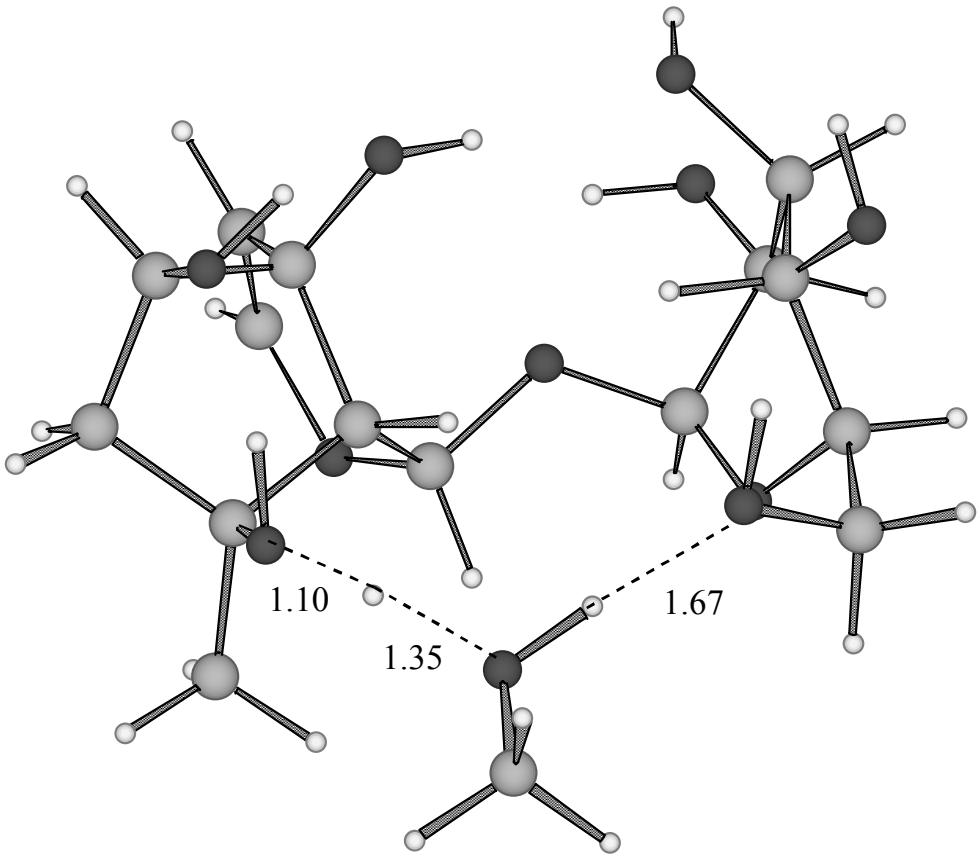


Figure IV-5a. *Geometry of $HarH^+_{16}$ complexed to a methanol molecule optimized at the B3LYP/6-31G* level; distances are in Å.*

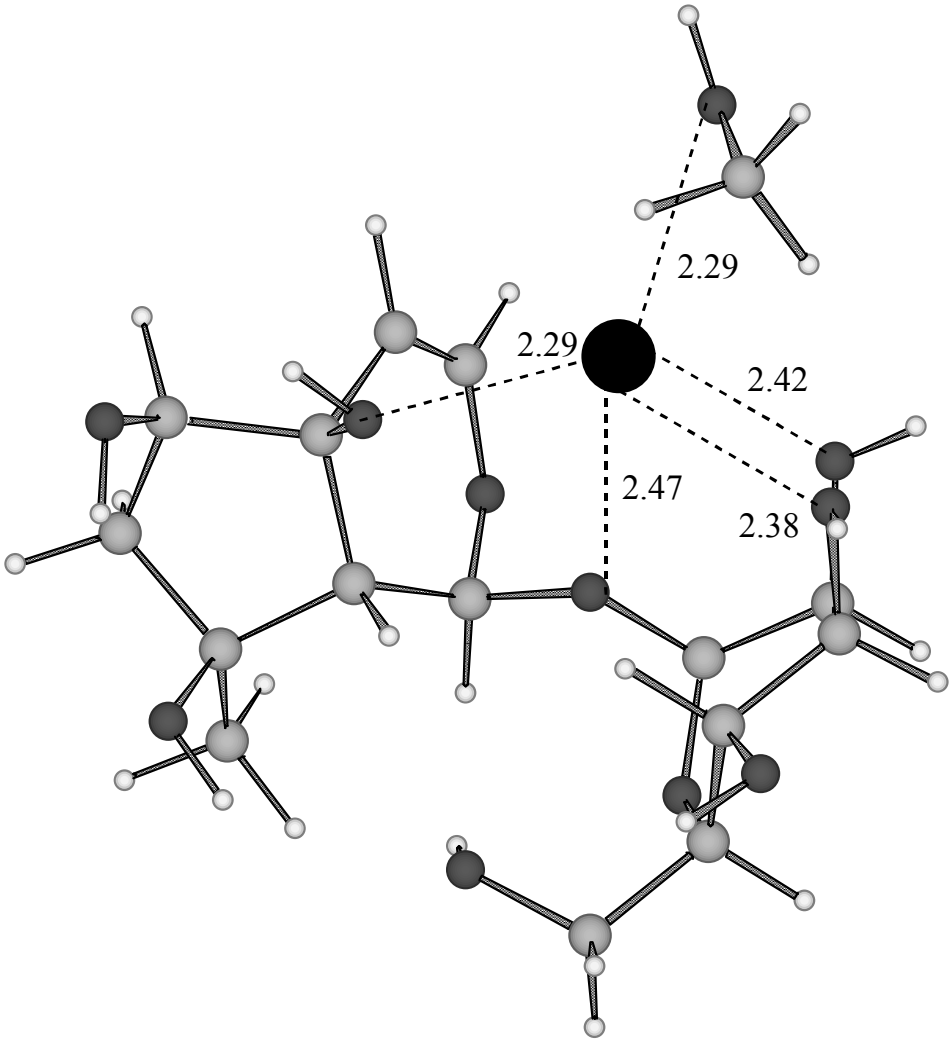


Figure IV-5b. *Geometry of $HarNa^{+}_{I}$ complexed to a methanol molecule optimized at the B3LYP/6-31G* level; distances are in Å.*

8. CONCLUSION

This study allowed the establishment of the most stable conformations of harpagide and its protonated and sodium cationised forms. Proton and sodium cation affinities of harpagide were estimated to be 223.5 and 66.0 kcal/mol, respectively. The cation transfer reaction of sodium and proton between harpagide and methanol, yielding protonated methanol and sodiated harpagide, is slightly endothermic by 1.9 kcal/mol. Complexing a methanol molecule to each reagent and product (*i.e.* considering $(MeOH)_2Na^+$ and a complex [Har,MeOH,H^+] as reagents and $(MeOH)_2H^+$ and a complex [Har,MeOH,Na^+] as products) makes the reaction become slightly exothermic by 1.7 kcal/mol. These small values are in the limit of accuracy of the method; they suggest that cationization of harpagide is easily feasible either in solution or within electrospray droplets as long as Na+ is available in the solution. Yet, this result does not allow one to discard the possibility that harpagide is in a sodium salt form (*preformed* $HarNa^+$ ions) in the commercial product and in biological samples.

9. REFERENCES AND NOTES

1. **Andersen M.L., Santos E.H.R., Seabra M.L.V., Da Silva A.A.B., Tulfik S.**
Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvent-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 91(2-3), pp. 325-330.

2. **Chantre P., Cappelaere A., Leblan D., Guedon D., Vandermander J., Fournie B.**
Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, **2000**, 7(3), pp. 177-183.

3. **Gagnier J.J., Chrubasik S., Manheimer E.**
Harpagophytum procumbens for ostheoarthitis and low back pain: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2004**, 4:13.

4. **Mahomed I.M., Ojewole A.O.**
Analgesic, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Harpagophytum procumbens* DC (Pedaliaceae) secondary roots aqueous extract. *Phytotherapy Research*, **2004**, 18(12), pp. 982-989.

5. **Baranska M., Schultz H., Siuda R., Strehle M.A., Rosch P., Popp J., Joubert E., Manley M.**
Quality control of *Harpagophytum procumbens* and its related phytopharmaceutical products by means of NIR-FT-Raman spectroscopy. *Biopolymers*, **2005**, 77(1), pp. 1-8.

6. **Colas C., Garcia P., Popot M.A., Bonnaire Y., Bouchonnet S.**
Optimization of solid-phase extraction for the liquid chromatography/mass spectrometry analysis of harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide and harpagide in equine plasma and urine. *Journal of Chromatographic Science*, **2007**, *in press*.

7. **Harvey D.J.**
Electrospray mass spectrometry and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2000**, 11(10), pp. 900-915.

8. **Harvey D.J.**
In *Encyclopaedia of Mass Spectrometry*, Elsevier, New-York, **2005**, Vol. 4, pp. 584-593.

9. **Orlando R., Bush C.A., Fenselau C.**
Structural analysis of oligosaccharides by tandem mass spectrometry: Collisional activation of sodium adduct ions. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry – Biological Mass Spectrometry*, **1990**, 19(12), pp. 747-754.

10. **Amad M.H., Cech N.B., Jackson G.S., Enke C.G.**
Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35(7), pp. 784-789.

11. **Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.P.P.**
AM1: a new general purpose *quantum* mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, **1985**, 107(13), pp. 3902-3909.

12. **Brothers E., Merz Jr. K.M.**
Sodium parameters for AM1 and PM3 optimized using a modified genetic algorithm. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2002**, 106(10), pp. 2779-2785.

13. **Hypercube.**
HyperChem™ Professional 7.51, Hypercube Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.

14. **Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Montgomery Jr. J.A., Vreven T., Kudin K.N., Burant J.C., Millam J.M., Iyengar S.S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G.A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J.E., Hratchian H.P., Cross J.B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Ayala P.Y., Morokuma K., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Zakrzewski V.G., Dapprich S., Daniels A.D., Strain M.C., Farkas O., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cui Q., Baboul A.G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Gonzalez C., Pople J.A.**
Gaussian 03, Revision B.05. Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, **2003**.

15. **Kikuchi T., Matsuda S., Kubo Y., Namba T.**
New iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* DC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1983**, 31(7), pp. 2296-2301.

16. **Seger C., Godejohann M., Tseng L.H.**

LC-DAD-MS/SPE-NMR hyphenation – A tool for the analysis of pharmaceutically used plant extracts: identification of isobaric iridoid glycoside regioisomers from *Harpagophytum procumbens*. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77(3), pp. 878-885.

17. **Cerda B.A., Wesdemiotis C.**
Thermochemistry and structures of Na^+ coordinated mono- and disaccharide stereoisomers. *International Journal of Mass Spectrometry*, **1999**, 189(2-3), pp. 189-204.

18. **Botek E., Debrun J.L., Hakim B., Morin-Allory L.**
Attachment of alkali cations on *β*-D-glucopyranose: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight studies and *ab initio* calculations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2001**, 15(4), pp. 273-276.

19. **McMahon T.B., Ohanessian G.**
An experimental and *ab initio* study of the nature of the binding in gas phase complexes of sodium ion. *Chemistry – A European Journal*. **2000**, 6(16), pp. 2931-2941.

20. **Hoyau S., Norrman K., McMahon T.B., Ohanessian G.**
A quantitative basis for a scale of Na^+ affinities of organic and small biological molecules in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, 121(38), pp. 8864-8875.

21. **Armentrout P.B., Rodgers M.T.**
An absolute sodium cation affinity scale: Threshold collision-induced dissociation experiments and *ab initio* theory. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2000**, 104(11), pp. 2238-2247.

22. **Bloomfield J., Davies E., Gatt P., Petrie S.**
Extending, and repositioning, a thermochemical ladder: High-level *quantum* chemical calculations on the sodium cation affinity scale. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2006**, 110(3), pp. 1134-1144.

23. **Albirami S., Ma N.L., Groh N.K.**
A Gaussian-3 (G3) theoretical study of the interactions between alkali metal cations and polyhydroxyl ligands. *Chemical Physics Letters*, **2002**, 359(5-6), pp. 500-506.

24. **Garcia-Muruais A., Cabaleiro-Lago E.M., Hermida-Ramon J.M., Rios M.A.**
The study of $A(CH_3OH)_{1–6}$ (A = Li^+, Na^+) in the gas phase based on *ab initio* calculations, analysis of the solvation process. *Chemical Physics*, **2000**, 254(2-3), pp. 109-123.

25. **Hunter E.P., Lias S.G.**
Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: An update. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1998**, 27(3), pp. 413-656.

26. **Meot-Ner M.**
Intermolecular forces in organic clusters. *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114(9), pp. 3312-3322.

27. **Amicangelo J.C., Armentrout P.B.**
Relative and absolute bond dissociation energies of sodium cation complexes determined using competitive collision-induced dissociation experiments. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2001**, 212(1-3), pp. 301-325.

28. **Guo B.C., Conklin B.J., Castleman A.W.**
Thermochemical properties of ion complexes $Na^+(M)_n$ in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**, 111(17), pp. 6506-6510.

V. APPROCHE MÉTABOLIQUE

1. BIBLIOGRAPHIE

Dans la littérature scientifique, il existe très peu de références relatives au métabolisme de l'harpagoside, et même au métabolisme des iridoïdes glycosides dans leur ensemble. Les quelques articles qui ont été publiés ne concernent que des études *in vitro* réalisées à partir de bactéries intestinales issues de la flore fécale humaine.[1-3] Les hypothèses de métabolisme qui ont été proposées n'ont jamais pu être vérifiées *in vivo* et on ne sait toujours pas quels sont les métabolites qui sont absorbés au niveau de la barrière gastro-intestinale.[1-2]

Selon Vanhaelen *et al.*, les extraits d'*Harpagophytum* conduiraient au niveau de l'estomac à la formation d'harpagogénine (*Figure V-1*), qui doit être considérée comme le premier métabolite actif dans l'organisme.[4] Les études *in vitro* qui ont été réalisées par Baghdikian *et al.* et Yang *et al.* sur l'harpagoside, l'harpagide et le 8-*para*-coumaroyl harpagide avec des bactéries intestinales aboutissent à la formation de plusieurs alcaloïdes pyridiniques monoterpéniques (PMTA ou *pyridine monoterpene alcaloide*).[1-3] La *Figure V-1* représente une possible voie de formation de trois d'entre eux à partir de l'harpagoside : l'aucubinine B et les harpagométabolines I et II. Deux autres molécules, les béatrines A et B (*Figure V-2*) ont été identifiées de façon similaire par des expériences *in vitro* directement réalisées sur la racine d'*Harpagophytum*.[2] La formation de ces différents métabolites, en particulier de l'aucubinine B, a été tentée par voie enzymatique et en présence d'ammoniaque à partir de l'harpagoside, mais le rendement obtenu est très faible (environ 0,004 %) alors qu'il peut atteindre 12 % par voie bactérienne.[1]

Au cours de cette thèse, l'approche du métabolisme de l'harpagoside a été abordée de deux manières différentes. La première consiste à utiliser les échantillons obtenus au cours des différentes expérimentations, la seconde à placer de l'harpagoside en présence de microsomes équins.

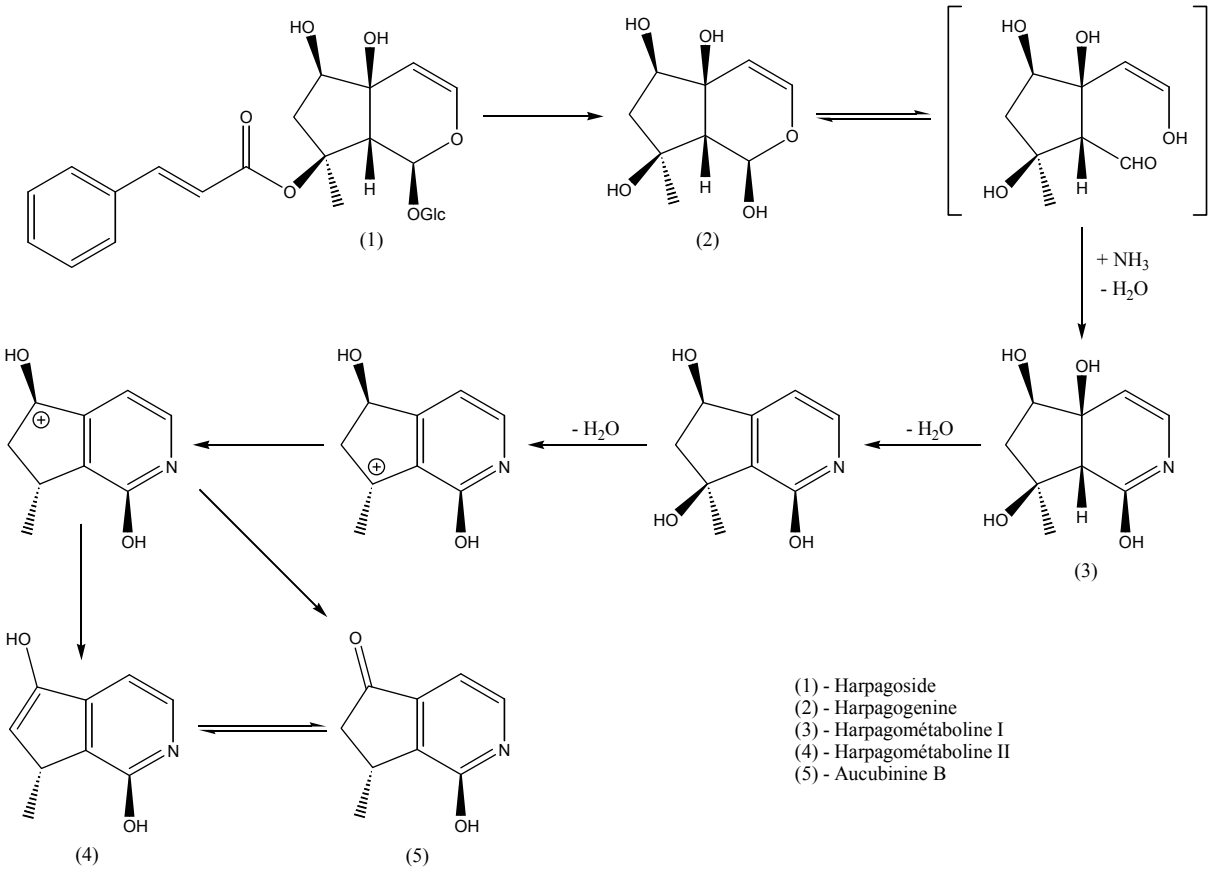


Figure V-1. *Hypothèses sur le métabolisme de l'harpagoside par les bactéries intestinales humaines.*[1,3]

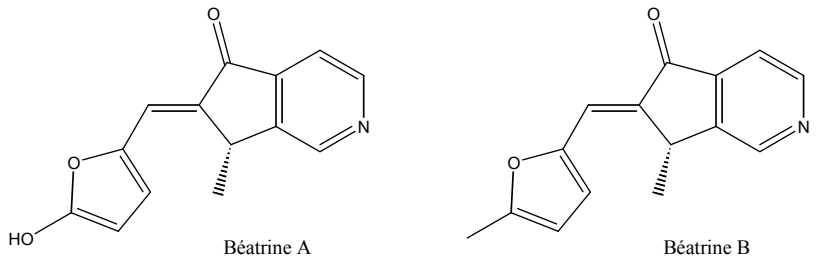


Figure V-2. *Structure chimique des béatrines A et B,*
possibles métabolites de l'harpagoside et du 8-para-coumaroyl harpagide.[2]

2. IN VIVO

Les essais qui ont été réalisés sur les échantillons issus des différentes expérimentations sont basés soit sur des données de la littérature, soit sur des similitudes de fragmentations qui ont été observées pour les différentes molécules.

2.1. Utilisation d'un triple quadripôle

Pour la recherche de métabolites, le triple quadripôle présente deux modes particulièrement intéressants : la recherche d'ions précurseurs et la perte de neutres. Ces modes ont été utilisés dans le but de trouver des métabolites de l'harpagoside. La *Figure V-3* présente les hypothèses qui ont été émises.

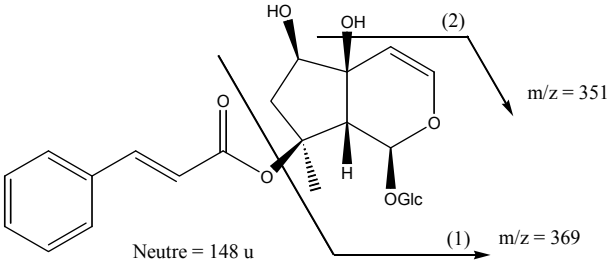


Figure V-3. *Hypothèses de fragmentations pour la recherche de métabolites de l'harpagoside.*

a. Recherche d'ions précurseurs

Les différents iridoïdes glucosides qui ont été observés dans le cadre de cette étude présentent des similitudes au niveau des schémas de fragmentation. Dans tous les spectres de masse qui ont été réalisés, les ions de rapports *m/z* 369 et *m/z* 351 correspondant à la perte de la fonction ester suivie d'une déshydratation sont présents.

On formule l'hypothèse selon laquelle la partie ester de l'harpagoside est modifiée lors du métabolisme de la molécule, mais pas le noyau iridoïde. En utilisant un triple quadripôle avec le mode *recherche d'ions précurseurs* sur les rapports *m/z* 369 et *m/z* 351, on doit être en mesure de détecter un métabolite qui réponde à ces critères.

La *Figure V-4* représente les chromatogrammes reconstruits sur Q3 aux rapports *m/z* 369 et 351 pour un mélange de standards HS+8PCHG dans le cadre de la recherche d'ions précurseurs, ainsi que les spectres de masse des ions précurseurs obtenus sur Q1.

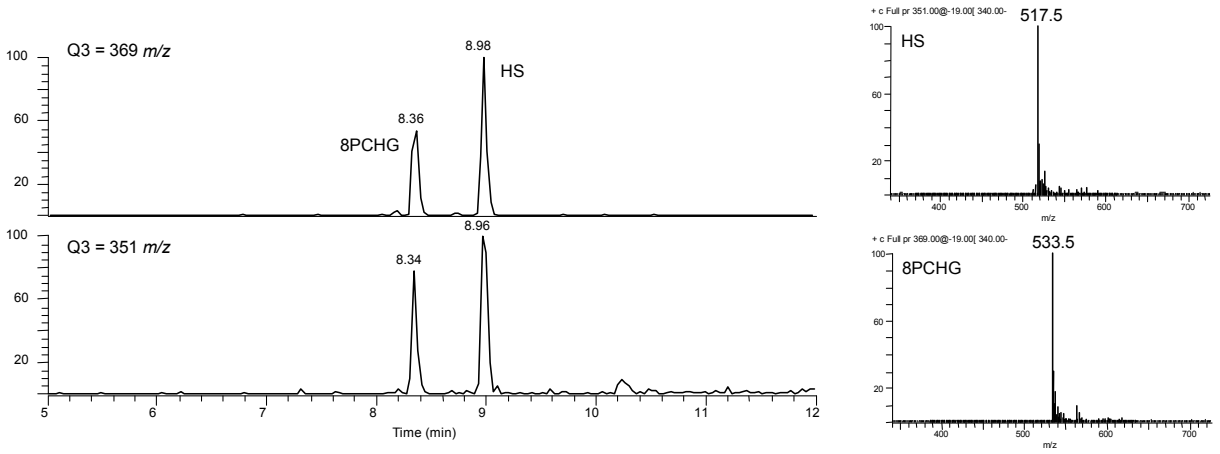


Figure V-4. *Recherche d'ions précurseurs de l'harpagoside et du 8-para-coumaroyl harpagide. A gauche, chromatogrammes reconstruits sur l'intégration du signal des ions fragments (Q3). A droite, spectres de masse (obtenus sur Q1) correspondants aux pics chromatographiques observés.*

L'utilisation de cette technique sur les échantillons issus des expérimentations animales n'a pas permis la mise en évidence de métabolites.

b. Recherche de perte de neutres

La seconde hypothèse qui peut être formulée à partir de la *Figure V-3* consiste à considérer que le métabolisme se produit sur le noyau iridoïde (perte du glucose impliquant une ouverture de la lactone) et que l'ester cinnamoïque reste inchangé.

Dans ces conditions, le triple quadripôle sera utilisé dans le mode *recherche de perte de neutres*. La perte correspondante à l'acide cinnamique est de 148 u. Un exemple de spectre est représenté en *Figure V-5*.

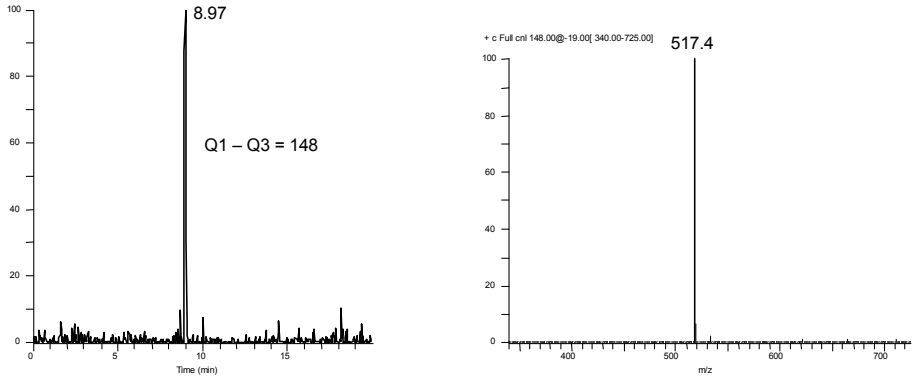


Figure V-5. *Recherche de perte de neutres sur l'harpagoside. A gauche, le chromatogramme reconstruit sur Q3 correspondant à Q1-Q3 = 148. A droite, le spectre de masse (Q1) correspondant au pic chromatographique.*

Cette technique n'a pas permis d'identifier de métabolite dans les échantillons issus des expérimentations.

2.2. Utilisation d'un piège quadripolaire 2D

Le LTQ a été utilisé en mode *Data Dependant Scan* afin de rechercher d'éventuels métabolites de l'harpagoside. Au niveau du paramétrage, les ions correspondants aux métabolites qui ont fait l'objet de publications sont placés dans une liste prioritaire : *m/z* 256 et 240 pour les béatrines A et B, *m/z* 206 et 148 pour les harpagométabolines I et II et *m/z* 148 pour l'aucubinine B. Les données obtenues sur un échantillon post-administration sont ensuite comparées à un échantillon blanc du même cheval.

Une autre expérience, assez proche de celle menée sur le triple quadripôle en mode *perte de neutres* a été réalisée. Pour cela le mode *Data Dependant Scan* est paramétré de sorte qu'une MS^3 soit effectuée si une perte de 18 u est observée sur un spectre MS^2. On a en effet observé que consécutivement à la perte de l'ester en MS^2, HS et 8PCHG perdaient également une molécule d'eau en MS^3. Le fait d'ajouter une condition de fragmentation supplémentaire permet un retraitement beaucoup plus rapide des données.

Cependant, de même que lors des expériences menées sur le triple quadripôle, aucun métabolite n'a pu être identifié. En dehors du fait de ne pas connaître la structure, ni même la masse des métabolites que l'on recherche, le fait que ceux-ci ne soient probablement présents qu'à l'état de traces ne facilite pas la recherche. En effet, les techniques qui ont été utilisées ici sont couramment appliquées avec succès dans le milieu pharmaceutique, mais sur des échantillons beaucoup plus concentrés, généralement issus, dans un premier temps, d'expérimentations in vitro.

3. IN VITRO

Cette étude sur l'harpagoside avec des microsomes de foie équin a été réalisée en collaboration avec le Hong-Kong Jockey Club. La préparation des échantillons a été réalisée par le Hong-Kong Jockey Club, et les analyses ont été effectuées dans les deux laboratoires.

a. Mode opératoire

Le milieu réactionnel utilisé est composé d'un tampon phosphate à pH 7,4, de chlorure de magnésium, de glucose-6-phosphate, du co-enzyme *β*-NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et de l'enzyme glucose-6-phosphate déhydrogénase. Lors de l'étude *in vitro*, trois échantillons sont préparés. Le premier, où se déroule la réaction, contient le milieu réactionnel dans lequel l'harpagoside est placé au contact des microsomes. Le second échantillon, qui sert de témoin pour mesurer l'avancement de la réaction ne contient que de l'harpagoside dans le milieu réactionnel, et le troisième qui est composé du milieu réactionnel et des microsomes permet de déterminer les pics caractéristiques du milieu.

Les échantillons sont incubés sous agitation à 37 °C pendant 18 heures, puis la mixture est portée à ébullition pendant 10 min, extraite à l'acétate d'éthyle et évaporée à sec.

b. Analyse

Pour l'analyse, les échantillons sont repris dans un mélange eau/méthanol 90/10. Les échantillons sont analysés sur le LTQ en mode *Data Dependant Scan* avec les mêmes paramètres que décrits précédemment. Des analyses de type full scan MS sont également réalisées. Lors de l'interprétation, le spectre issu du troisième échantillon (milieu réactionnel + microsomes) est soustrait du spectre correspondant à la réaction des microsomes sur l'harpagoside.

Cette fois encore, la seule molécule que l'on obtienne à l'issue des analyses est l'harpagoside. Compte tenu des données de la littérature, une expérience réalisée avec des bactéries intestinales de cheval en présence d'ammoniaque donnerait peut être de meilleurs résultats.

4. RÉFÉRENCES

1. **Baghdikian B., Guiraud-Dauriac H., Ollivier E., N'Guyen A., Dumenil G., Balansard G.**
   Formation of nitrogen-containing metabolites from the main iridoids of *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri* by human intestinal bacteria. *Planta Medica*, **1999**, 65(2), pp. 164-166.
2. **Baghdikian B., Ollivier E., Faure R., Debrauwer L., Rathelot P., Balansard G.**
   Two new pyridine monoterpene alkaloids by chemical conversion of a commercial extract of *Harpagophytum procumbens*. *Journal of Natural Prodructs*, **1999**, 62(2), pp. 211-213.
3. **Yang X.W., Zou C.T., Hattori M.**
   Harpagometabolins I and II, two new metabolites from harpagoside by human intestinal bacteria. *Chinese Chemical Letters*, **2000**, 11(9), pp. 779-782.
4. **Vanhaelen M., Vanhaelen R., Samaey-Fontaine J., Elchamid A., Niebes P., Matagne D.**
   Aspects botaniques, constitution chimique et activite pharacologique d'*Harpagophytum procumbens* DC. *Phytotherapy*, **1983**, 5, pp. 7-13.

VI. CONCLUSION

Les méthodes développées dans ce chapitre pour l'extraction des marqueurs de l'*Harpagophytum* (harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide et harpagide) dans les urines et les plasmas équins sont faciles à mettre en œuvre, efficaces et reproductibles. Les extractions sont réalisées à l'aide d'automates sur des cartouches SPE et les échantillons sont analysés en LC/MS. Les analyses de *screening* peuvent être effectuées en mode SRM avec une ionisation ESI positive sur le LCQ Deca XP Max. Les analyses de caractérisation des molécules doivent être effectuées sur le LTQ afin d'obtenir un nombre d'ions fragments suffisant pour respecter les recommandations de l'AORC. La quantification des analytes s'effectue en mode CRM, également sur le LTQ, en raison de sa vitesse de balayage élevée qui permet de décrire correctement les pics chromatographiques et de l'utilisation de la MS^3 qui permet de supprimer pratiquement tout le bruit chimique.

L'analyse des échantillons d'urine et de plasma obtenus après expérimentation a permis de montrer que la vitesse d'élimination de l'harpagoside est très rapide : élimination en moins de 24 h dans les urines et 3 h dans les plasmas. Des plasmas prélevés 15 min après administration d'*Harpagophytum* contiennent déjà de l'harpagoside, ce qui montre que l'absorption de ces principes actifs est très rapide. De la même façon, le 8-*para*-coumaroyl harpagide est éliminé en moins de 12 h dans les urines et l'harpagide en moins de 8 h.

Les différentes approches métaboliques qui ont été entreprises n'ont pas permis d'identifier de métabolites de l'harpagoside, mais les différentes expérimentations animales ont permis de montrer que l'harpagide n'est pas, chez le cheval, un métabolite de l'harpagoside. La détection de l'harpagide, non utilisable pour des analyses de *screening*, peut être très intéressante dans le cadre d'analyses de confirmation. Du fait de son élimination très rapide (entre 5 et 8 h), sa présence dans les urines indique que l'administration d'*Harpagophytum* s'est déroulée peu de temps avant le prélèvement.

Une étude de population sur des urines de routine est en cours, les premiers résultats sont présentés dans le *Chapitre 5-I* ainsi que dans la publication de l'*Annexe II*. Une méthode d'extraction de l'harpagoside dans les compléments alimentaires est également en cours de développement. L'objectif de la thèse étant en partie de développer des méthodes *large spectre*, les méthodes mises au point dans le cadre de l'étude de l'*Harpagophytum* vont être appliquées, dans le chapitre suivant, à l'étude de l'*Eleutherococcus senticosus*.

Chapitre 4 - ELEUTHEROCOCCUS

I. PRÉSENTATION

Les éleuthérosides B et E, qui ont été retenus comme marqueurs de l'administration d'*Eleutherococcus senticosus* sont des glucosides, tout comme l'harpagoside (*Figure I-1*). Nombre d'essais réalisés sur l'harpagoside ont également été menés en parallèle sur les éleuthérosides. Ainsi, les connaissances acquises lors de la mise au point des techniques d'analyse pour les marqueurs de l'*Harpagophytum* et décrites précédemment peuvent être utilisées.

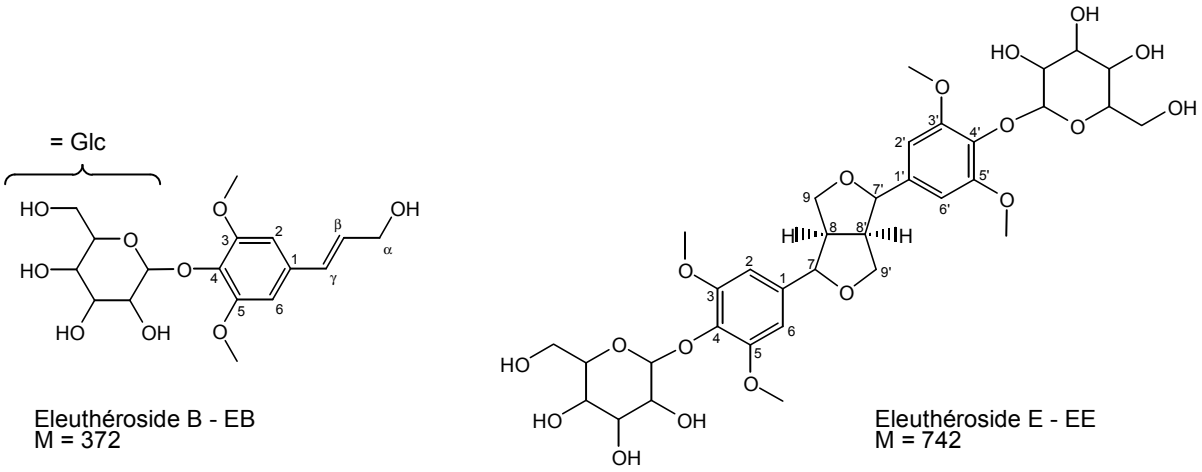


Figure I-1. *Structures chimiques des éleuthérosides B et E et numérotation des atomes.*[1,2]

Ce chapitre consiste principalement à montrer comment la méthode développée dans le cadre de la détection de l'*Harpagophytum* a pu être adaptée à d'autres molécules possédant des propriétés physico-chimiques proches de celles des constituants de l'*Harpagophytum*. Cette démarche est la première étape vers le développement d'une méthode de *screening* applicable à grande échelle dans le domaine du contrôle de la médication pour la détection des glucosides.

Ce chapitre présente également l'extension des méthodes d'analyse développées dans le cadre des urines et des plasmas aux compléments alimentaires. Pour ce faire, une méthode d'extraction adaptée aux solides a dû être développée.

II. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

1. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON

Les éleuthérosides sont extraits du plasma et de l'urine par extraction sur phase solide. Après l'extraction, les éluats sont évaporés à sec à 48 °C au Turbovap (Zymarck). Les extraits secs ainsi obtenus sont repris par 25 µL de méthanol auxquels sont ajoutés 175 µL d'eau ultra-pure, et déposés dans des flacons munis de réducteurs coniques.

1.1. Extraction plasmatique

Les éleuthérosides sont extraits du plasma selon deux méthodes de SPE différentes, mais avec la même préparation d'échantillon. L'éleuthéroside E est extrait de la même façon que les marqueurs de l'*Harpagophytum* dans le plasma[3] alors que l'éleuthéroside B est extrait suivant une méthode inspirée de celle décrite par Feng *et al.*[4]

a. Préparation de l'échantillon

A 1 mL de plasma, on ajoute 2,5 mL d'eau déminéralisée pour diminuer la viscosité de l'échantillon ainsi que 25 µL d'hydroxylidocaïne à 0,1 ng/µL dans le méthanol, l'hydroxylidocaïne servant d'étalon interne pour la quantification. Le plasma dilué est centrifugé pendant 30 min à 3000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube auquel on ajoute 2 mL d'eau déminéralisée. La solution est ensuite extraite sur phase solide selon le procédé décrit ci-dessous.

b. Extraction sur phase solide

Éleuthéroside B

L'extraction sur phase solide est réalisée à l'aide d'un automate Rapid Trace (Zymark) sur des cartouches polymériques de type Oasis HLB (Waters) de 3 mL contenant 60 mg de phase solide, selon les paramètres suivants : conditionnement par 2 mL de méthanol puis 2 mL d'eau, rinçage par 2 mL d'un mélange eau/méthanol 90/10, séchage puis élution par 3 mL d'un mélange eau/méthanol 40/60.

Éleuthéroside E

L'extraction de EE est réalisée à l'aide de cartouches BondElut PPL (Varian) de 3 mL contenant 200 mg de phase solide. Les cartouches sont conditionnées par 3 mL de méthanol puis 3 mL d'eau, l'échantillon est chargé, puis la cartouche est rincée par 3 mL d'eau. L'élution réalisée par 3 mL d'un mélange méthanol/acétonitrile 50/50.

1.2. Extraction urinaire

Seul EE est extrait par SPE de l'urine équine. EB, de par sa structure plane et sa polarité élevée est peu retenu sur les supports solides. EE étant le composé majoritaire et le plus actif de *Eleutherococcus senticosus*, il sera le seul à être recherché dans les urines.[5]

a. Préparation de l'échantillon

La préparation des échantillons urinaires est identique à celle décrite pour l'harpagoside. A 1 mL d'urine on ajoute 2,5 mL de tampon phosphate 0,1 M pH 7,7 ainsi que 6,5 mL d'eau déminéralisée et 25 µL d'hydroxylidocaïne à 0,1 ng/µL dans le méthanol (étalon interne). Le pH est ajusté à 7,7 et la solution est centrifugée à 3000 g pendant 30 min. Le surnageant est ensuite extrait sur phase solide selon le procédé décrit ci-dessous.

b. Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide est réalisée sur des cartouches polymériques de type AbsElut Nexus (Varian) de 3 mL contenant 60 mg de phase solide selon les paramètres suivants : conditionnement par 3 mL de méthanol puis 3 mL d'eau, rinçages avec 3 mL d'eau puis 3 mL d'un mélange eau/méthanol 95/5, séchage de 3 min, rinçage avec 3 mL de *n*-hexane et séchage de 3 min ; élution par 3 mL d'un mélange dichlorométhane/isopropanol 80/20.

Ce protocole d'extraction est très proche de celui développé dans le cadre de la détection de l'*Harpagophytum* dans les urines. En effet, la seule différence est le second rinçage, effectué ici avec un mélange eau/méthanol 95/5 contre 70/30 dans le cas de HS et 8PCHG. Ceci est cohérent avec les temps de rétention observés en LC/MS : EE est élué entre 1 et 2 min avant HS et 8PCHG sur une colonne de type C_{18} avec un gradient eau/méthanol.

1.3. Extraction dans les compléments alimentaires

Les éleuthérosides B et E sont extraits des compléments alimentaires à l'aide d'une extraction par solvant à haute température et sous pression (ou ASE pour *Accelerated Solvent Extraction*).

a. Préparation de l'échantillon

Environ 0,5 g de complément alimentaire finement broyé sont ajoutés à du sable de Fontainebleau dans une cellule ASE de 22 mL. 100 µL d'une solution méthanolique de

codéine-D3 à 50 ng/µL sont ajoutés. La cellule est placée 1 h à l'étuve à 55 ± 5 °C afin d'évaporer le solvant, puis refermée en vue de l'extraction.

b. Extraction par ASE

La cellule est placée dans l'ASE 200 et les analytes sont extraits à l'aide d'un tampon formate 0,1 M à pH 3,7 dans les conditions suivantes : la cellule ASE est chauffée pendant 6 min à 120 °C avec une pression maximale de 100 bars. Une pause de 5 min permet d'atteindre l'équilibre thermodynamique entre l'échantillon, les analytes et le solvant, puis 60 % du volume de la cellule est récupéré et remplacé par du solvant frais. La cellule est à nouveau chauffée à 120 °C pendant 6 min avec une pause de 5 min. Le solvant est entraîné de la cellule vers le flacon de récupération par d'un courant d'azote.

L'éluat ainsi obtenu (environ 35 mL) est transvasé dans une fiole jaugée de 50 mL, complétée au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée. Une dilution au 1/50e avec un mélange eau/méthanol 90/10 est ensuite réalisée en vue de l'analyse par LC/MS.

2. COUPLAGE LC/MS

Les analyses sont effectuées par couplage LC/MS sur les appareils de type piège à ions précédemment décrits : LCQ Deca ou LCQ Deca XP Max couplés à une chaîne HPLC Surveyor et LTQ couplé à une chaîne HPLC Agilent 1100 Series.

2.1. Conditions chromatographiques

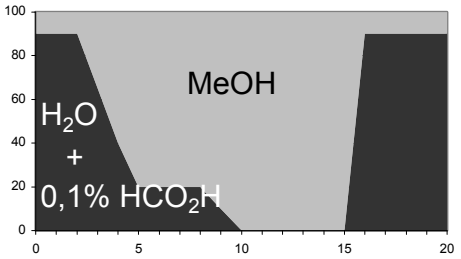
Les propriétés physico-chimiques des éleuthérosides B et E étant proches de celles des iridoïdes glycosides présentés au chapitre relatif à l'*Harpagophytum*, les conditions chromatographiques définies précédemment conviennent également à l'analyse de ces composés. Il est envisagé dans l'optique d'un *screening* de routine d'analyser les différents analytes lors d'une seule et même injection. La colonne utilisée est une Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Solvent saver plus (3,5 µm, 150 x 3 mm) équipée d'une précolonne Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 12,5 x 4,6 mm) et d'un fritté haute pression de 0,5 µm. Les paramètres chromatographiques sont décrits dans le *Tableau II-1*.

2.2. Détection par spectrométrie de masse

Le *screening* et la quantification des éleuthérosides sont effectués par électronébullisation, en mode positif, avec le mode SRM, à partir des ions $[M+Na]^+$ sur les transitions les plus importantes : *m/z* 395 → 364 et *m/z* 395 → 233 pour EB, *m/z* 765 → 603 pour EE. Pour confirmer l'identification de EE dans un échantillon, une analyse full scan MS^2

en mode ESI négatif est effectuée à partir de l'ion $[M+HCO_2]^-$ de rapport *m/z* 787. Les principaux paramètres relatifs au spectromètre LTQ sont récapitulés dans le *Tableau II-1*.

Tableau II-1. *Paramètres utilisés en LC/MS sur le LTQ pour l'analyse des échantillons après extraction SPE ou ASE.*

Chromatographie	Colonne		Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 solvent saver plus 3,0*150 mm, 3,5 µm + Précolonne XDB-C18 4,6x12 mm, 5 µm		
1100 Series Binary Pump + Standard Autosampler + Vacuum Degasser + Thermostatted Column Compartment, Agilent Technologies	Volume injecté		10 µL		
	Phase mobile 400 µL/min				
Spectromètrie de masse	T capillaire		350 °C		
	Débit gaz gaine *		40		
Finnigan LTQ (trappe linéaire) Thermo Electron	Débit gaz auxiliaire *		5		
	Molécule détectée		EB	EE	
	Ionisation		ESI +	ESI +	ESI -
	MS^2	m/z de l'ion parent	395,1	765,2	787,1
		Energie de collision *	30%	36%	49%

* Unités arbitraire Thermo Electron

3. COUPLAGE GC/MS

Les analyses relatives à l'étude de métabolisme sont effectuées par couplage GC/MS en ionisation électronique sur un simple quadripôle : MSD 5973N couplé à un chromatographe Agilent 6890. Les conditions GC/MS habituellement utilisées dans le cadre de l'analyse des alcalins hydrolysés ont été employées après vérification de leur compatibilité sur un standard.

3.1. Dérivation au TMS

Avant d'être injectés en GC/MS les échantillons sont dérivés par 50 µL d'un agent silylant (MSTFA (*N*-méthyl,*N*-triméthylsilylefluoroacétamide) + toluène) pour former des dérivés TMS (triméthylsilyles), plus faciles à vaporiser et ayant une meilleure réponse en spectrométrie de masse, comparée à celle de leurs analogues non dérivés.

3.2. Conditions chromatographiques

La colonne utilisée est une colonne capillaire Agilent J&W Scientific DB-5MS de 30 m avec un diamètre interne de 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,25 µm. Le débit d'hélium est autorégulé à 1 mL/min. La température de l'injecteur est de 260 °C, ce dernier est utilisé en mode *splitless* pendant 45 s. 1 µL d'échantillon est automatiquement injecté. L'interface entre le chromatogramme et le spectromètre de masse est maintenue à 285 °C. Le chromatographe est utilisé en gradient de température : température initiale de 80 °C pendant 30 s, puis montée à 200 °C à 18 °C/min et à 305 °C à 8 °C/min, la température est maintenue à 305 °C pendant 8 min.

3.3. Détection par spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse est utilisé avec une source à ionisation électronique. Le délai de solvant est fixé à 4 min. Le balayage du quadripôle est effectué en mode *Scan* entre 50 et 650 *m/z* à la fréquence de 1,27 scan/s.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. FRAGMENTATIONS

1.1. Full scan MS

Les spectres de masse réalisés en mode full scan MS (*Figure III-1*) montrent que les éleuthérosides forment des adduits sodés en mode ESI positif. EB est caractérisé par l'ion $[M+Na]^+$ de rapport *m/z* 395, alors que EE forme un adduit à *m/z* 765.[6,7] Quelques adduits potassium sont également observés, et comme dans le cas de l'*Harpagophytum*, les ions $[M+H]^+$ sont pratiquement absents. On peut observer en infusion des dimères $[2M+Na]^+$ mais ces derniers sont absents des spectres obtenus en couplage LC/MS.

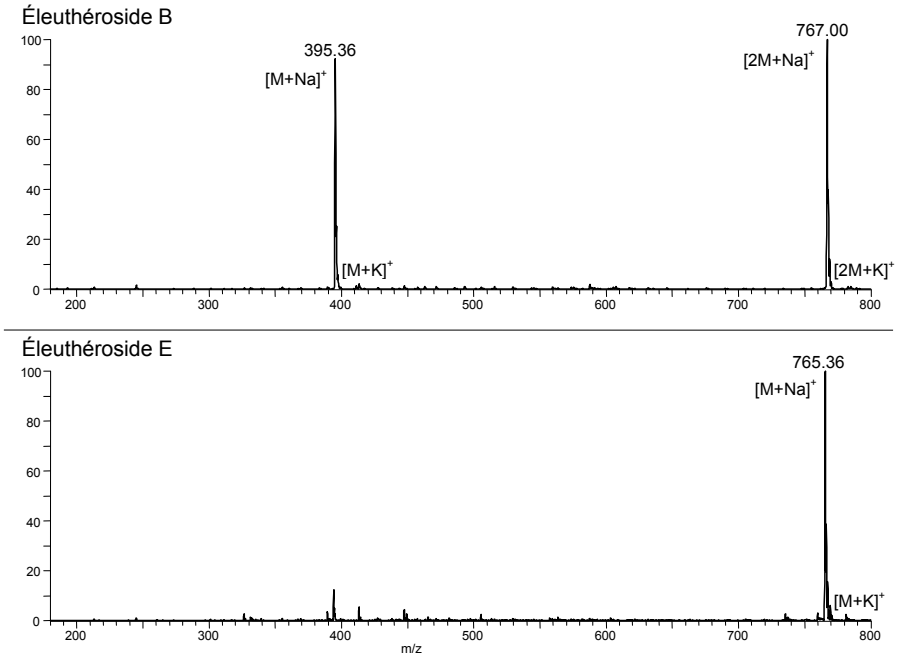


Figure III-1. *Spectres full scan MS des éleuthérosides B et E obtenus par infusion de solutions à 10 ng/µL en mode ESI positif (LTQ).*

En mode ESI négatif les éleuthérosides forment des adduits formate $[M+HCO_2]^-$ de rapports *m/z* 417 pour EB et *m/z* 787 pour EE.

1.2. Fragmentations de l'éleuthéroside B

Les fragmentations de EB ont été déterminées par MS^n en mode ESI positif à l'aide d'un piège à ions. Le spectre obtenu en MS^2 sur l'ion $[M+Na]^+$ de rapport *m/z* 495 montre qu'en raison de la présence du cycle aromatique, les groupements chimiques éliminés peuvent être neutres ou radicalaires (*Figure III-2*). L'ion *m/z* 380 correspond à la perte du radical $^{\bullet}CH_3$ de l'un des groupements méthoxy. Les fragments observés à *m/z* 365 et *m/z* 364 correspondent respectivement aux pertes de CH_2O et de $CH_3O^{\bullet}$. La perte de glucose, neutre ou radicalaire, conduit respectivement à la formation des ions *m/z* 233 et *m/z* 232. L'ion sodé de rapport *m/z* 185 correspond au glucose après rupture de la liaison $C_{(4)}$-O. Les fragmentations par MS^3 des ions *m/z* 365 et *m/z* 233 sont en accord avec les structures proposées puisqu'elles conduisent à la formation des ions *m/z* 335, *m/z* 334 et *m/z* 203, *m/z* 202 suite à la perte des groupements CH_2O ou $CH_3O^{\bullet}$; ces fragmentations sont présentes en faible abondance dans le spectre de MS^2.

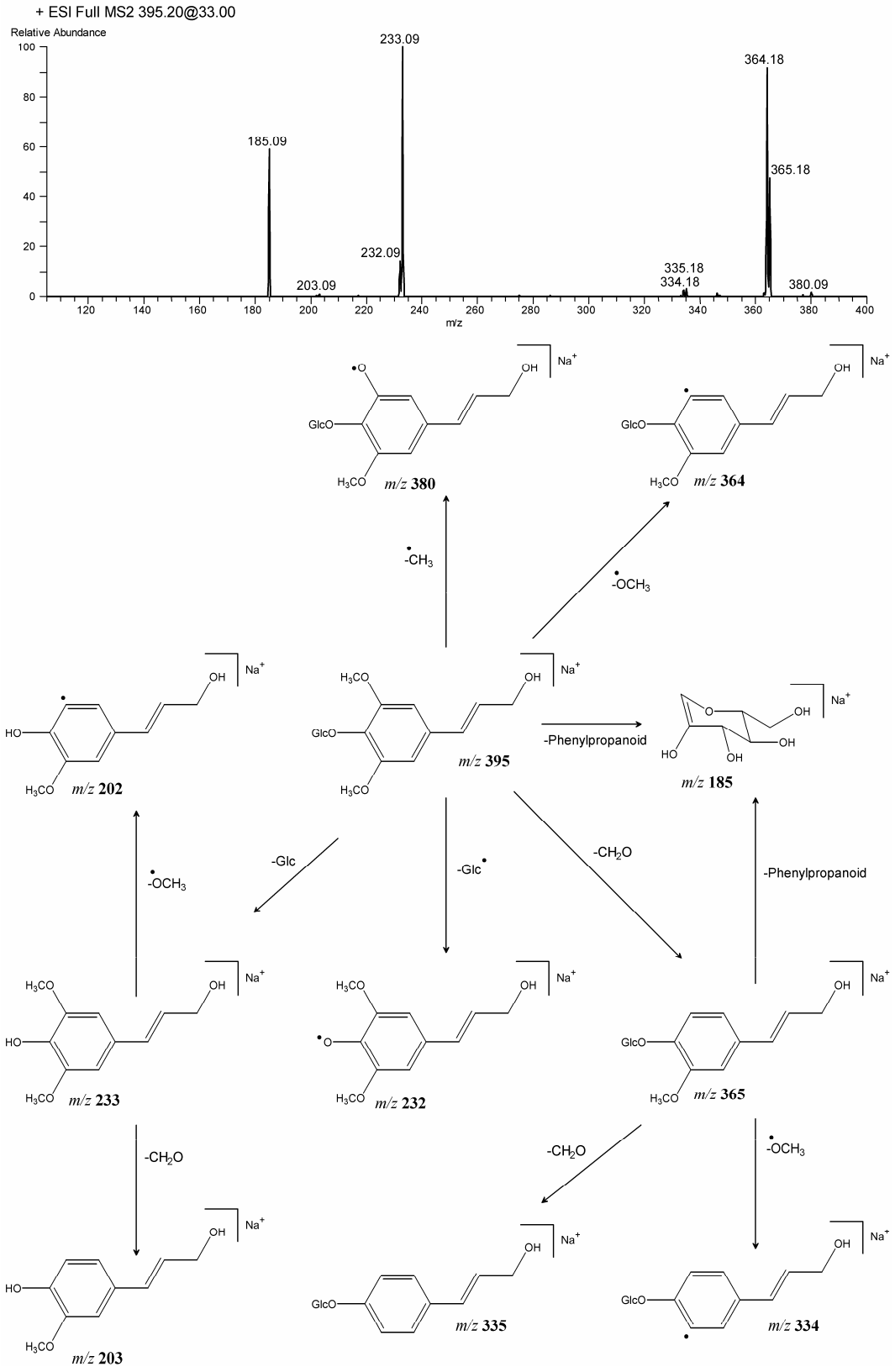


Figure III-2. *Spectre full scan MS² de EB sodé en mode ESI positif et proposition de mécanismes de fragmentation.*

1.3. Fragmentations de l'éleuthéroside E

Les fragmentations de EE ont également été déterminées en ESI sur un piège à ions. Dans la mesure où dans la nature, EE résulte de la dimérisation de EB,[8] un certain nombre de fragmentations sont communes, en particulier les pertes de CH_2O et $CH_3O^{\bullet}$ en mode ESI positif.

a. Mode ESI positif

La MS^2 est réalisée sur l'ion $[M+Na]^+$ de rapport *m/z* 765. Dans ces conditions, seul un ion fragment à *m/z* 603 correspondant à la perte d'un glucose est observé. Cet ion est à son tour isolé et fragmenté en MS^3 (*Figure III-4*). Le fragment majoritaire ainsi obtenu correspond à la perte du second glucose et forme un ion à *m/z* 441. D'autres fragments sont également observés, suite à des fragmentations déjà décrites dans le cas de EB, à savoir la perte des radicaux $^{\bullet}CH_3$, $CH_3O^{\bullet}$ et du neutre CH_2O, conduisant respectivement à la formation des ions *m/z* 588, *m/z* 572 et *m/z* 573. Comme précédemment, l'ion sodé de rapport *m/z* 185 correspond au glucose après rupture de la liaison $C_{(4)}$-O.

b. Mode ESI négatif

Le précurseur sélectionné dans ce mode d'ionisation pour effectuer de la MS^n est l'adduit formate $[M+HCO_2]^-$ de rapport *m/z* 787. En MS^2, celui-ci conduit à la formation des ions *m/z* 741, *m/z* 579 et *m/z* 417, suite aux pertes consécutives du formate, d'un premier puis d'un second glucose (*Figure III-3*). Il est également possible d'observer la formation de ces ions en mode full scan MS en augmentant la différence de potentiel entre le *skimmer* et le premier octapôle (Source CID), ce qui a pour effet d'augmenter l'énergie cinétique des ions, et par conséquent leur énergie interne lorsqu'ils entrent dans l'analyseur.

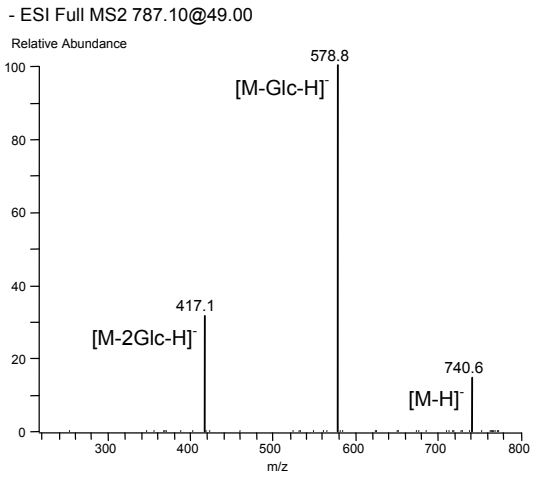


Figure III-3. *Spectre full Scan MS^2 en mode ESI négatif de l'ion formate de l'éleuthéroside E : $[M+HCO_2]^-$.*

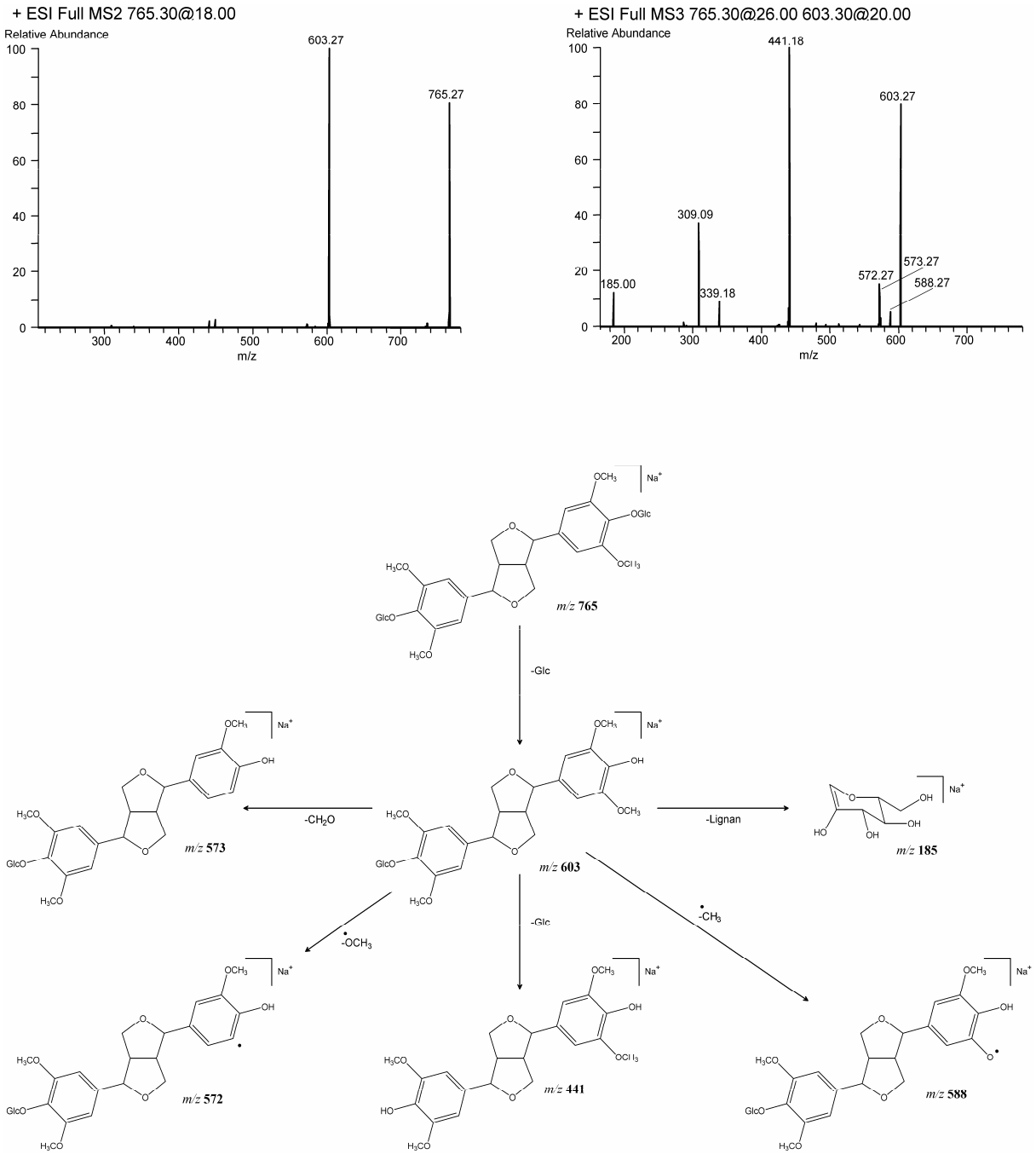


Figure III-4. *Spectres full scan MS^2 et MS^3 de EE sodé en mode ESI positif et proposition de mécanismes de fragmentation.*

2. EXTRACTION

2.1. SPE dans les plasmas

a. Influence du pH

Le plasma étant un milieu riche en protéines, il n'est pas rare que les analytes recherchés soient liés à certaines d'entre elles appelées protéines de transport.[9] Pour dénaturer les protéines il est courant d'utiliser de l'acide phosphorique (50 µL de H_3PO_4 84 % dilué au 1/5e pour 1 mL de plasma), le pH de l'échantillon se situant ainsi entre 3 et 4. Des échantillons plasmatiques fortifiés ont été extraits avec et sans acidification. Les rendements d'extraction obtenus dans les deux cas sont semblables, ce qui montre que les méthodes d'extraction développées peuvent être utilisées à pH acide ou neutre.

La nécessité d'acidifier les échantillons ne peut être validée que sur des échantillons réels car dans le cas de plasmas supplémentés les molécules sont toujours libres. Malheureusement, avec ou sans acidification aucune trace d'éleuthéroside (B ou E) n'a pu être décelée dans les plasmas.

b. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de EE sur les cartouches BondElut PPL a été déterminé sur 12 plasmas avec des supplémentations de 0,5 et 5 ng/mL, de la même façon que pour les marqueurs de l'*Harpagophytum*, tandis que le rendement d'extraction de EB sur les cartouches Oasis HLB n'a été déterminé que de façon apparente (comparaison avec un standard de concentration équivalente à 100 % d'extraction) sur quelques plasmas supplémentés à 2 ng/mL. Les rendements d'extractions dans le plasma sont résumés dans le *Tableau III-1*.

Tableau III-1. *Rendement d'extraction des éleuthérosides B et E dans les plasmas.*

	EB	EE	
Méthode d'extraction	Oasis HLB	BondElut PPL	
Ajouts (ng/mL)	2	0,5	5
Rendement (%)	~ 96	93	94
CV (%)	-	10	5

Les rendements d'extraction des éleuthérosides dans les plasmas sont du même ordre de grandeur que ceux observés dans le cadre de l'étude de l'*Harpagophytum*, avec

des coefficients de variation tout à fait acceptables. Une autre méthode d'extraction de EE a été développée sur des cartouches Focus (Varian), et présente un rendement d'extraction très proche (92 %). La méthode développée sur les cartouches PPL a été conservée car elle est légèrement meilleure et surtout commune à celle développée pour HG, HS et 8PCHG.

2.2. SPE dans les urines

a. Influence du pH

Afin de vérifier que le pH est bien adapté à l'extraction de l'échantillon, son influence sur le rendement apparent (effet matrice) et sur le rendement d'extraction réel a été étudiée. Les résultats sont présentés sur la *Figure III-5*.

Le rendement d'extraction réel est calculé comme étant le rapport de l'aire du pic chromatographique d'une urine blanche, supplémentée à 10 ng avant extraction sur phase solide, sur l'aire de la même urine supplémentée à 10 ng après extraction.

Le signal apparent correspond au rapport de l'aire du pic chromatographique d'une urine blanche supplémentée à 10 ng après extraction sur l'aire d'un standard de concentration équivalente à un rendement de 100 %. Ce paramètre prend en compte le phénomène de suppression ionique lié à la présence de matrice dans la mesure où la concentration en analyte est identique dans tous les échantillons.

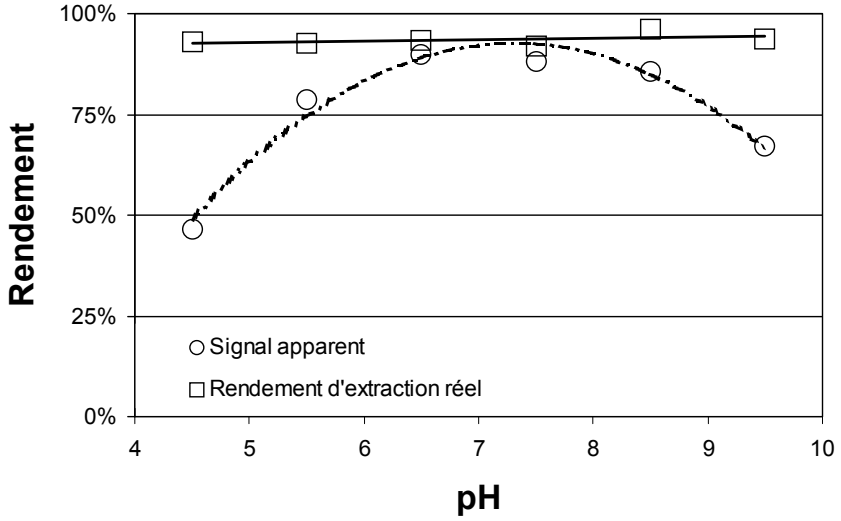


Figure III-5. *Influence du pH de l'urine sur le rendement d'extraction apparent. – Effet matrice avec la source ESI. Tous les échantillons ont été supplémentés à 10 ng/mL en EE après extraction.*

La *Figure III-5* montre que le signal apparent, c'est à dire le signal brut qui peut être observé est maximum pour un pH compris entre 7 et 8, ce qui correspond aux mêmes conditions de préparation d'échantillon que pour l'*Harpagophytum*. On remarque également que l'effet matrice est beaucoup plus faible dans le cas de EE qu'il ne l'est pour HS ou 8PCHG (signal apparent quasi-nul pour pH < 6).

Il est à noter que le rendement d'extraction réel de EE dans les urines est constant quel que soit le pH. Ce phénomène avait déjà été remarqué dans le cas de HS et 8PCHG.

b. Influence du volume

L'influence du volume de prise d'essai a également été étudiée (*Figure III-6*). Des volumes allant de 250 µL à 5 mL ont été prélevés d'un pool d'urines blanches supplémenté à 10 ng/mL, puis préparés et extraits avec la méthode habituelle.

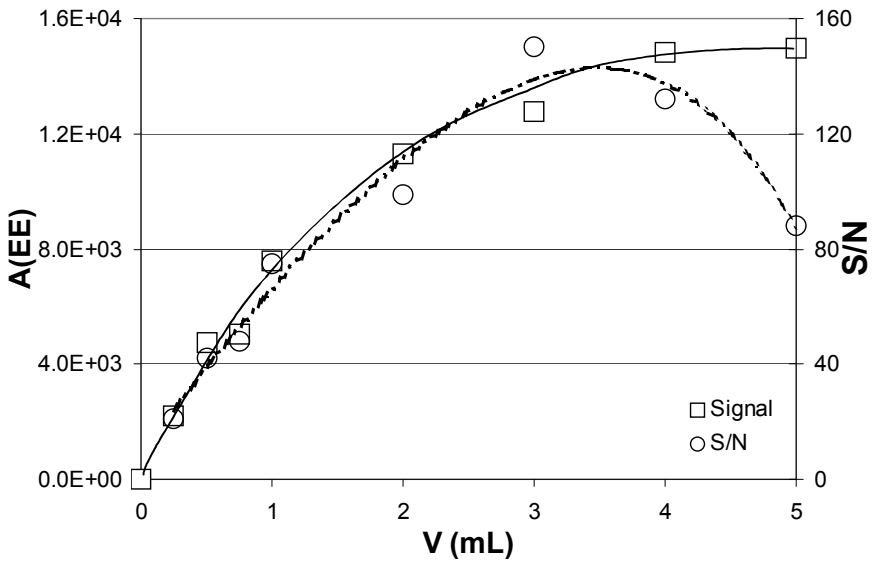


Figure III-6. *Influence du volume d'urine sur l'aire du pic chromatographique (mesures effectuées sur le LTQ). Tous les échantillons sont supplémentés à 10 ng/mL.*

La courbe pleine représente le signal brut correspondant à l'aire du pic chromatographique de EE (échelle de gauche) en fonction du volume de prise d'essai. Le signal augmente avec le volume de prise d'essai jusqu'à 4 mL puis atteint la saturation. Cette courbe est beaucoup plus *conventionnelle* que celles observées dans le cas de l'étude des marqueurs de l'*Harpagophytum* : EE est beaucoup moins sensible au phénomène de suppression ionique que HS ou 8PCHG.

La courbe en pointillés représente l'évolution du rapport signal sur bruit (échelle de droite) en fonction du volume de prise d'essai. On constate que ce rapport augmente avec le volume jusqu'à un volume de 3,5 mL avant de décroître. Cela signifie que l'on peut augmenter le volume de prise d'essai jusqu'à 3 mL si l'on veut gagner en sensibilité ou utiliser un appareil moins performant pour effectuer un *screening* de routine.

c. Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction qui sont reportés dans le *Tableau III-2* ont été calculés, comme décrit précédemment lors de la mesure de l'influence du pH, à deux concentrations différentes : 2 et 20 ng/mL avec la méthode d'extraction décrite dans le cadre de l'*Harpagophytum* (commune HS), et celle développée plus spécifiquement pour l'éleuthéroside E (spécifique EE).

Tableau III-2. *Rendements d'extraction de l'éleuthéroside E dans les urines.*

Méthode d'extraction	Commune HS[a]		Spécifique EE[b]	
Ajouts (ng/mL)	2	20	2	20
Rendement (%)	33	28	84	95
CV (%)	18	18	11	7

[a] $n = 12$
[b] $n = 8$

Le premier enseignement de ces résultats est un gain d'un facteur trois pour la méthode spécifique à EE, par rapport à celle commune avec HS. Ceci montre l'importance du choix des solvants de rinçage lors de l'extraction SPE : seule la proportion de méthanol lors du second rinçage varie entre ces deux méthodes. Ceci montre également les difficultés que l'on peut rencontrer lors de la mise au point de méthodes SPE : à partir d'une même phase solide, les résultats obtenus peuvent être très différents selon le solvant utilisé pour les opérations de rinçage et d'élution.

Les rendements observés pour la méthode spécifique à EE sont très satisfaisants et les CV correspondants, déterminés avec $n = 8$ échantillons, également. A noter cependant, compte tenu de la limite de détection et des grandeurs observées dans des échantillons issus d'expérimentations animales, qu'un rendement d'extraction d'environ 30 %, obtenu avec la méthode commune à HS, est suffisant pour déceler la présence d'EE dans les urines équines.

Ainsi, il est possible d'effectuer des analyses de *screening* communes à EE et HS tant au niveau de l'extraction SPE, que de l'analyse LC/MS. La méthode d'extraction spécifique à EE peut être exploitée pour des analyses de confirmation, ou de quantification pour lesquelles seul EE est recherché.

d. Limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification de EE ont été déterminées dans l'urine (prise d'essai de 1 mL) sur le LTQ. Dans les conditions spectrométriques de *screening* ou de quantification (mode SRM sur la transition 765 → 603, ESI positif), la limite de détection a été déterminée à 100 pg/mL et celle de quantification à 250 pg/mL.

Ces limites peuvent être légèrement améliorées. En effet, la *Figure III-6* montre que pour un volume de prise d'essai compris entre 3 et 4 mL le rapport signal sur bruit est doublé par rapport à 1 mL, ce qui devrait permettre d'abaisser les limites de détection et de quantification d'un facteur deux.

2.3. ASE

L'extraction des éleuthérosides dans les compléments alimentaires *via* l'ASE est à double objectif. Il s'agit d'une part d'être en mesure de détecter la présence de ces molécules lors d'analyses de routine, et d'autre part d'être quantitatif afin de répondre à une demande industrielle visant à contrôler la qualité des lots produits.

a. Influence des paramètres d'extraction

Ne disposant pas de méthode de référence pour l'extraction des éleuthérosides dans les solides et afin de vérifier que l'extraction est totale, différentes expériences ont été réalisées.

Changement des conditions ASE

Dans un premier temps un même échantillon de complément alimentaire (Twydil Hippacan+C) a été extrait en utilisant trois supports solides différents (sable de Fontainebleau, Hydromatrix et ChemElut), ainsi que trois solvants d'extraction différents (un mélange méthanol/eau 50/50, un autre 75/25 et un tampon formate 0,1 M pH 3,7).

Les résultats obtenus ne montrent pas de variation significative quelle que soit la combinaison solvant/support solide utilisée. Le coefficient de variation (CV) des neuf essais est d'environ 3 % pour EB et 5 % pour EE, les CV liés à l'utilisation d'un même solvant sont compris entre 3 et 6 % et ceux liés à l'utilisation d'un même support solide entre 2 et 6 % pour EB comme pour EE.

A l'issue de ces essais, le sable de Fontainebleau et le tampon formate ont été retenus. Il s'agit des mêmes matériaux que ceux utilisés pour les analyses de routine, ce qui permet de n'effectuer qu'une seule extraction des compléments alimentaires pour les analyses de *screening* et la recherche des éleuthérosides.

Extractions ASE successives

Dans un second temps, toujours dans le but de déterminer si l'extraction ASE ainsi paramétrée est quantitative, un même échantillon a été extrait plusieurs fois. Lors de cette expérience, l'échantillon de complément alimentaire est placé dans une cellule ASE qui sera extraite trois fois, chaque extraction étant récupérée dans des flacons différents. Les trois éluats présentent des différences de couleur : le premier est jaune, le second de couleur très pâle et le troisième incolore. Ces différences de couleur se confirment à l'analyse : la présence d'éleuthérosides B et E n'a été détectée que dans le premier flacon.

Ainsi, même si l'extraction ASE n'a pas été comparée à une méthode de référence de type Sohxlet ou d'autres méthodes décrites pour l'extraction des éleuthérosides à partir de la plante, il semble raisonnable de considérer que la méthode est quantitative.[5,10-12]

b. Influence du facteur de dilution

Dans la mesure où une simple dilution est effectuée entre l'extraction ASE et l'analyse LC/MS, il est important de vérifier qu'il n'y a pas de problème lié au phénomène de suppression ionique, bien que l'on ait montré que EE est bien moins sensible à ce phénomène que HS. La *Figure III-7* représente la concentration apparente d'un échantillon en fonction du facteur de dilution. Cette figure montre qu'un effet matrice est observé si le facteur de dilution n'est pas suffisamment élevé.

Le facteur de dilution qui a été retenu est 50 car il permet d'obtenir un facteur de réponse du spectromètre de masse (LTQ) exploitable, et qui demeure dans le domaine de linéarité de réponse des éleuthérosides. Les dilutions au 1/2 ou au 1/10e ne sont pas utilisables en termes quantitatifs. De plus, pour éviter un encrassement prématuré de la colonne et du spectromètre de masse, il est recommandé de diluer suffisamment les échantillons (les échantillons dilués au 1/2 sont chargés et très visqueux).

Ces différentes remarques montrent que le LCQ Deca, dont la plage d'utilisation pour les éleuthérosides correspondrait à une dilution au 1/2, n'est pas utilisable pour effectuer ces analyses. De plus, cet appareil est bien moins rapide en balayage de *m/z* que le LTQ, et les pics chromatographiques sont tracés avec un nombre de points insuffisant.

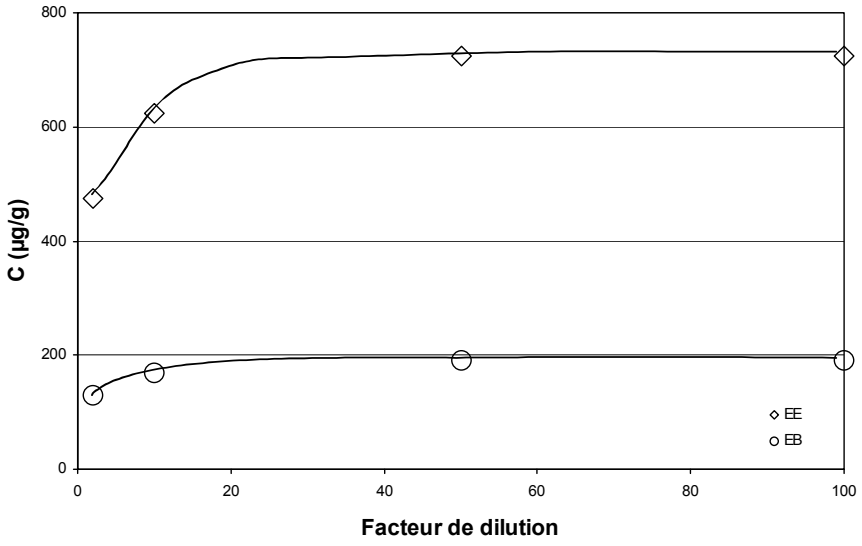


Figure III-7. *Influence du facteur de dilution sur la concentration apparente de l'échantillon : effet matrice.*

c. Répétabilité

Afin de vérifier la stabilité des résultats, la répétabilité de la méthode a été évaluée. Pour ce faire un échantillon d'Hippacan+C a été extrait trois fois par jour sur trois jours. Les CV calculés pour EE sont de 6 % en intra-jour et de 3 % en inter-jour. Pour EB les résultats sont très proches : CV de 6 % en intra-jour et 4 % en inter-jour. Ces résultats, du même ordre de grandeur que les CV obtenus lors des essais de solvant et de support solide montrent que la méthode développée est tout à fait applicable, tant pour la détection des échantillons que pour leur quantification.

d. Quantification

Les éleuthérosides B et E ont été quantifiés dans les compléments alimentaires par rapport à une gamme d'étalonnage de standards, comprise entre 50 et 500 pg/µL (correspondant à des quantités recherchées de 0,25 à 2,5 mg/g), réalisée dans un mélange eau/méthanol 90/10, le même solvant que celui utilisé pour effectuer la dilution.

3. SÉLECTIVITÉ

La sélectivité des méthodes d'extraction et de l'analyse par LC/MS a été vérifiée dans les urines et les plasmas. Pour chaque matrice biologique un échantillon blanc (urine ou plasma d'un cheval n'ayant pas reçu de médication à base d'*Eleutherococcus*) est comparé au même échantillon supplémenté à une concentration connue. La sélectivité de EE dans l'urine est montrée en exemple sur la *Figure III-8*.

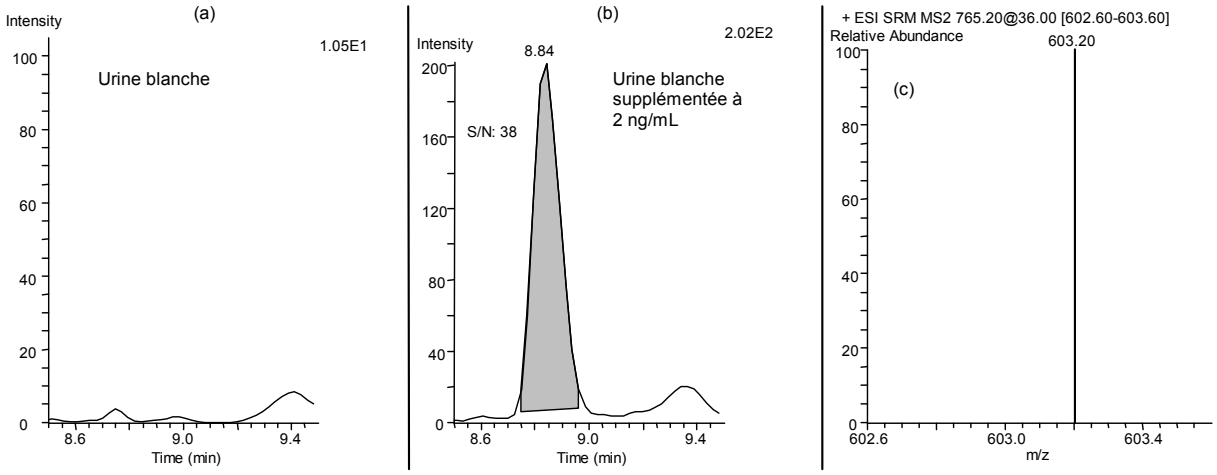


Figure III-8. *Sélectivité de la détection de l'éleuthéroside E dans les urines. Courant ionique total de la transition 765 → 603 correspondant à la première perte de glucose en mode SRM. (a) 1 mL d'urine blanche, (b) 1 mL d'urine blanche supplémentée à 2 ng/mL. (c) Spectre de masse.*

Sur la *Figure III-8*, on constate qu'aucun pic dans l'urine blanche ne vient interférer avec le signal correspondant avec EE, ce qui montre la sélectivité de la méthode.

La spécificité vis-à-vis de la molécule, afin de répondre aux recommandations de l'AORC (*Cf. Annexe I*) en termes d'identification, est obtenue en mode full scan MS^2 à partir de l'ion formate de l'éleuthéroside E $[M+HCO_2]^-$ par électronébullisation négative (*Figure III-4*).

4. APPLICATION À DES ÉCHANTILLONS RÉELS

Les échantillons expérimentaux ont été obtenus suite à l'administration par voie orale de Twydil Hippacan+C, préparation commerciale contenant des extraits d'*Eleutherococcus senticosus*. Ces expérimentations ont été menées pendant 5 jours sur deux chevaux pur-sang à raison de 2 doses quotidiennes (équivalent à 70 mg/j de EE et 18 mg/j de EB).

4.1. Analyse dans les plasmas

Les méthodes d'analyse développées pour l'extraction de EB et EE dans les plasmas ont été appliquées aux échantillons recueillis lors des expérimentations animales. Aucune trace de EB ou EE n'a pu être décelée dans les échantillons plasmatiques. Les extractions ont été réalisées avec et sans acidification de l'échantillon afin de s'assurer que les molécules ne sont pas liées à des protéines de transport.[9]

Ces résultats montrent que soit les éleuthérosides sont entièrement métabolisés lorsqu'ils passent dans le plasma, soit les éleuthérosides ont déjà été éliminés du plasma lors du premier prélèvement (1 h). Dans le cas de l'*Harpagophytum*, il a été montré que HS était présent dans le plasma en moins de 15 min, et qu'il était pratiquement éliminé au bout de 2 h.

4.2. Analyse dans les urines

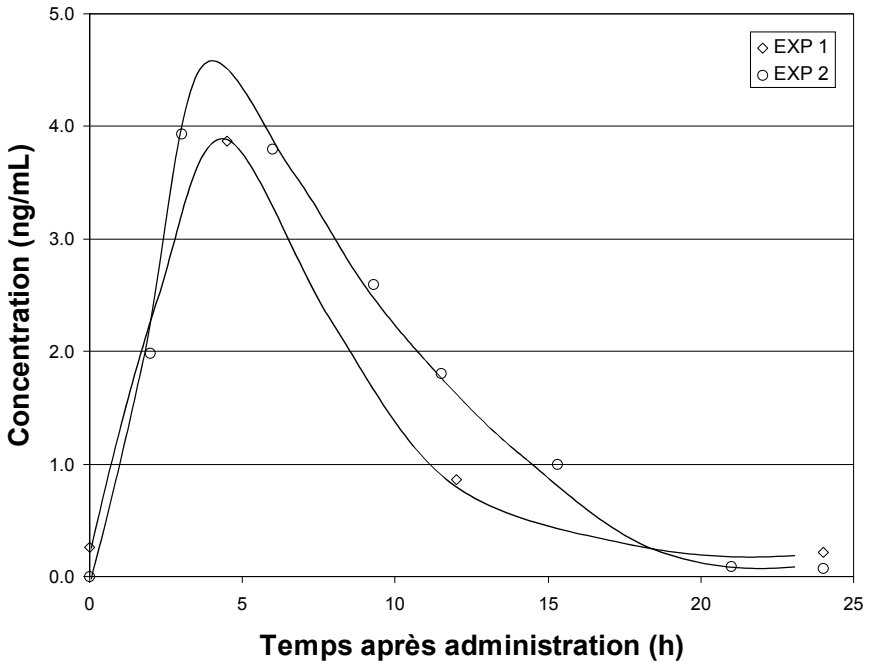


Figure III-9. *Courbes d'élimination de l'éleuthéroside E dans les urines après administration par voie orale de Twydil Hippacan+C.*

Les urines issues de ces mêmes expérimentations ont été extraites et analysées par LC/MS. Les résultats ainsi obtenus ont permis d'établir un profil d'élimination de EE. Les courbes correspondantes sont représentées sur la *Figure III-9*.

Sur ces courbes on constate que l'élimination de EE dans les urines est très rapide. En effet, le pic de concentration est observé environ 5 h après administration et toute trace de l'administration d'*Eleutherococcus* a entièrement disparu après 24 h. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux observés dans le cadre de l'étude de l'*Harpagophytum*.

4.3. Analyse dans les compléments alimentaires

Les analyses réalisées dans les compléments alimentaires ont permis de déterminer la quantité d'éleuthérosides B et E administrée lors des expérimentations.

IV. APPROCHE MÉTABOLIQUE

1. INTRODUCTION

Les données recueillies dans la littérature sur des composés proches des éleuthérosides B et E montrent que la première étape du métabolisme consiste à rompre les liaisons avec les glucoses afin de permettre l'absorption au niveau de la barrière gastro-intestinale et la libération du principe actif (les glycosides sont considérés comme des substances pro-actives).[8,13-19] Lors d'une étude *in vitro* avec des bactéries intestinales humaines, Kim *et al.* ont montré que la liriodendrine (épimère de l'éleuthéroside E) se transformait en (+)-syringarésinol-*β*-D-glucopyranoside puis en syringarésinol. De la même façon, ils ont obtenu de l'alcool sinapylique à partir de l'éleuthéroside B.[18] Des études menées sur différentes souches de rats montrent que pour réaliser cette opération, un équipement enzymatique à base de *β*-glycosidase capable de rompre la liaison entre le glucose et la molécule est nécessaire.[13] Cependant, toutes les bactéries, et par conséquent toutes les espèces animales, ne disposent pas des *β*-glycosidases capables de réaliser cette réaction.[13-14]

La *Figure IV-1* représente le rôle des bactéries intestinales dans le métabolisme des glycosides, substances pro-actives, en leurs aglycones.[13] Cette figure montre également les échanges qui existent entre le foie, les reins et les intestins.

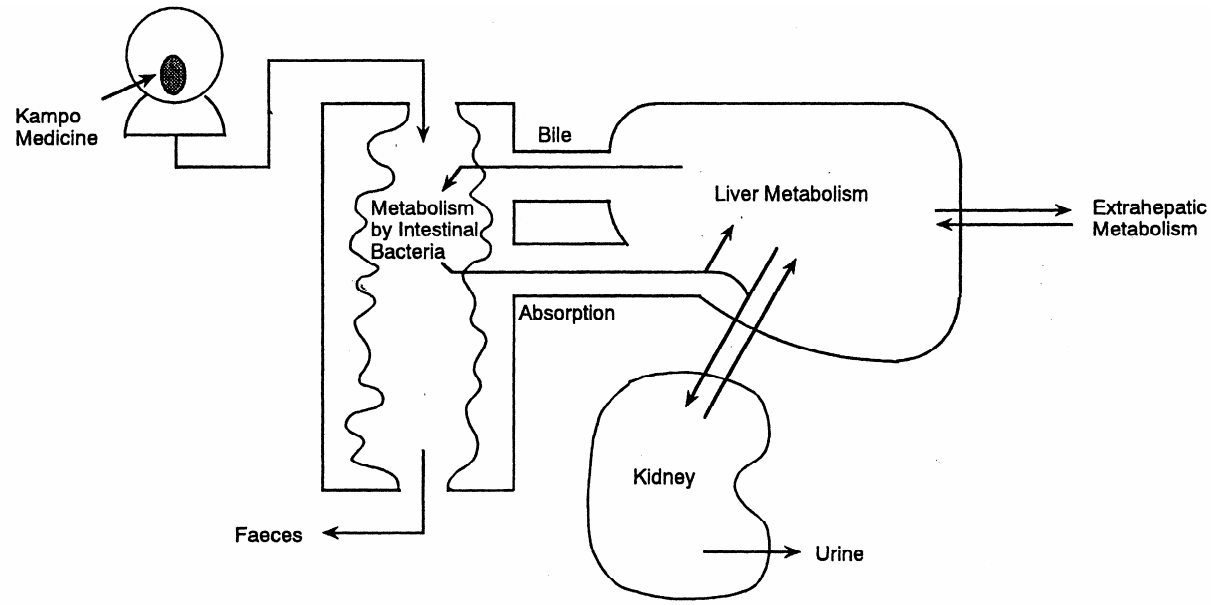


Figure IV-1. *Rôle des bactéries intestinales sur le métabolisme.*[13]

La *Figure IV-1* permet de comprendre comment des molécules éliminées de l'organisme sous forme de glucuroconjugués peuvent être réabsorbées au niveau de la paroi intestinale. Dans un premier temps, le glucoside entre dans l'organisme par voie orale et séjourne au niveau de l'estomac, où il est exposé aux sucs gastriques. Généralement les glucosides résistent bien à ces agressions et ils sont ensuite dirigés dans les intestins où ils sont retenus et soumis à la flore intestinale. La vitesse d'absorption des glycosides dépend des sucres (glucosides, rutinosides, xylosides, galactosides, arabinosides…) qui sont liés à la molécule (cette propriété est utilisée en synthèse pharmaceutique pour paramétrer la vitesse d'absorption d'une substance active).[14] De là, les aglycones circulent dans le plasma et sont ainsi distribués aux différents organes. Le foie peut métaboliser les formes libres en formes conjuguées qui seront éliminées dans l'urine ou les fèces. Il est possible que certaines de ces molécules conjuguées soient à nouveaux hydrolysées par les bactéries fécales et réabsorbées par l'organisme suivant un mécanisme semblable à celui d'absorption des oestrogènes.[15-16]

2. FORMATION DES AGLYCONES

La première étape de cette étude a consisté à former les aglycones des éleuthérosides (*Figure IV-2*). L'alcool sinapylique, aglycone de l'éleuthéroside B est disponible commercialement, tandis que le syringarésinol, aglycone de l'éleuthéroside E a dû être préparé par hydrolyse au laboratoire.

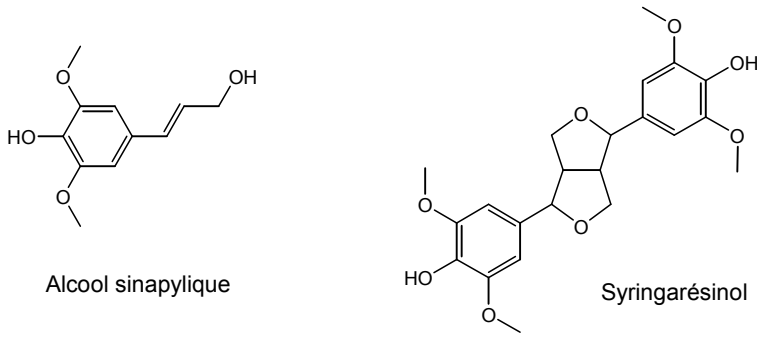


Figure IV-2. *Structures chimiques des aglycones des éleuthérosides.*

Peu de synthèses du syringarésinol sont décrites dans la littérature et celles-ci sont soit peu sélectives, soit difficiles à mettre en œuvre.[20-23] La solution la plus simple consiste à rompre les liaisons *O-Glc* sur la molécule de départ par hydrolyse acide ou enzymatique.[16-17,23-26]

Différents essais d'hydrolyse enzymatique de EE à l'aide de *β*-glucosidase *from Almond* ont été réalisés dans un tampon acétate 0,1 M de pH 5 à différentes températures comprises entre 37 et 50 °C, sur des durées allant de 30 min à 16 h, mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants : seul EE est retrouvé lors des analyses.

Une méthode d'hydrolyse chimique a donc été utilisée : 500 µL de HCl 37 % dilué au quart sont ajoutés à 50 µg de EE en solution dans 500 µL de méthanol. Le tout est incubé à 60 °C pendant 2 h 30. Cette solution servira de référence pour le syringarésinol.

3. ANALYSE PAR GC/MS

3.1. Spectre de référence

Afin de vérifier que la molécule obtenue précédemment correspond bien au syringarésinol, un aliquot est prélevé et dérivé à l'aide d'un agent de silylation, le TMS. Le spectre obtenu en GC/MS pour le syringarésinol est représenté sur la *Figure IV-3*. Sur ce spectre, on peut voir l'ion radical $[M]^{+\bullet}$ du syringarésinol à *m/z* = 562, ainsi que la perte de 15 u, caractéristique d'un groupement méthyle.

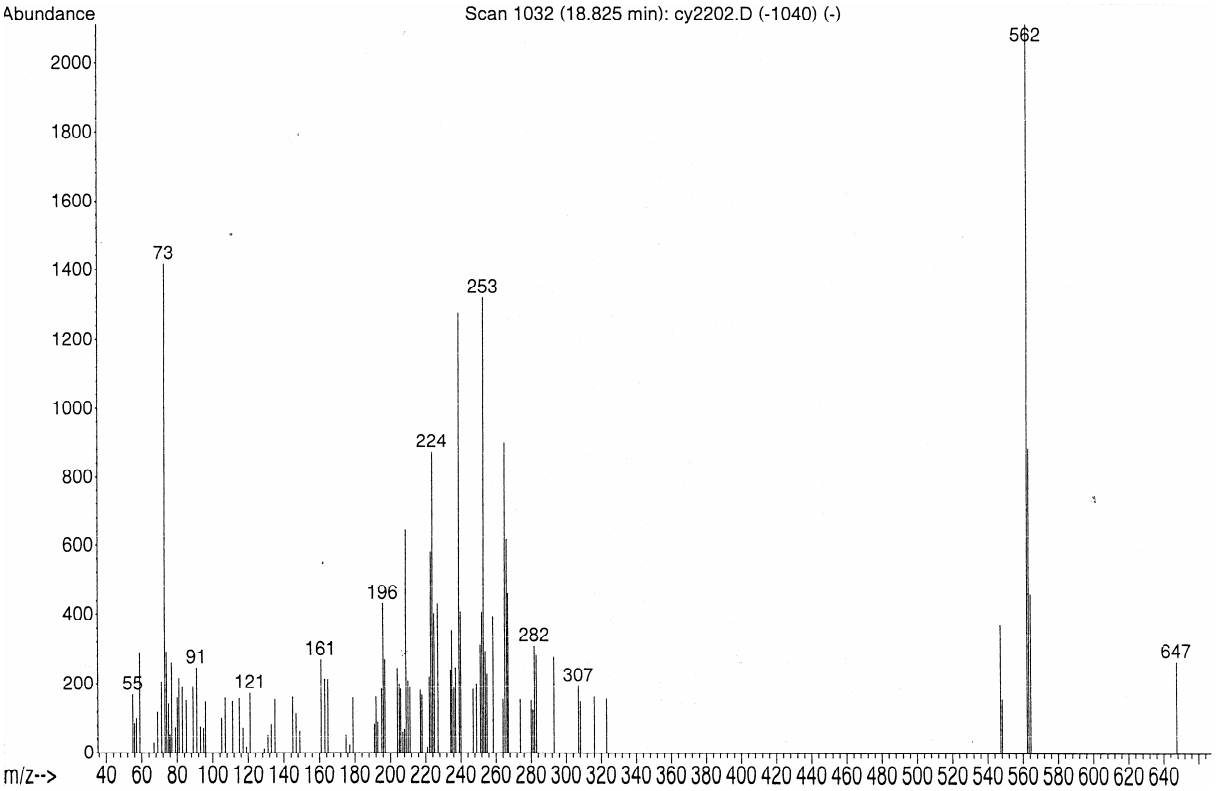


Figure IV-3. *Spectre GC/MS en ionisation électronique du syringarésinol dérivé TMS.*

3.2. Analyse des échantillons

Dans un premier temps, afin de vérifier les paramètres d'extraction, un échantillon de plasma blanc est supplémenté par 30 µL de la solution contenant le syringarésinol. Cet échantillon est extrait sur phase solide avec la même méthode que celle utilisée pour EE sur les cartouches BondElut PPL. Un autre échantillon de plasma blanc est extrait et supplémenté après l'extraction afin d'estimer le taux de recouvrement. Le rendement d'extraction du syringarésinol est quasiment de 100 %.

Dans un second temps, les plasmas issus des expérimentations sont extraits, dérivés et analysés de la même façon que précédemment. Aucun signal correspondant au syringarésinol n'a pu être détecté. Une seconde extraction des échantillons a été réalisée en acidifiant les plasmas avant l'extraction pour lever tout doute d'une éventuelle liaison entre le syringarésinol et des protéines de transport. Les résultats obtenus de cette façon se sont révélés identiques. Des expériences similaires ont été réalisées avec la même méthode d'extraction dans les urines et ont conduit aux mêmes résultats.

De ces expériences, on peut en déduire que soit le syringarésinol n'est pas un métabolite de EE, soit qu'il s'agit d'un précurseur d'autres métabolites comme suggéré sur la *Figure IV-4*, précurseur qui serait très rapidement transformé. Il est possible par ailleurs que le spectromètre de masse utilisé ne soit pas suffisamment sensible pour réaliser ce genre d'étude.

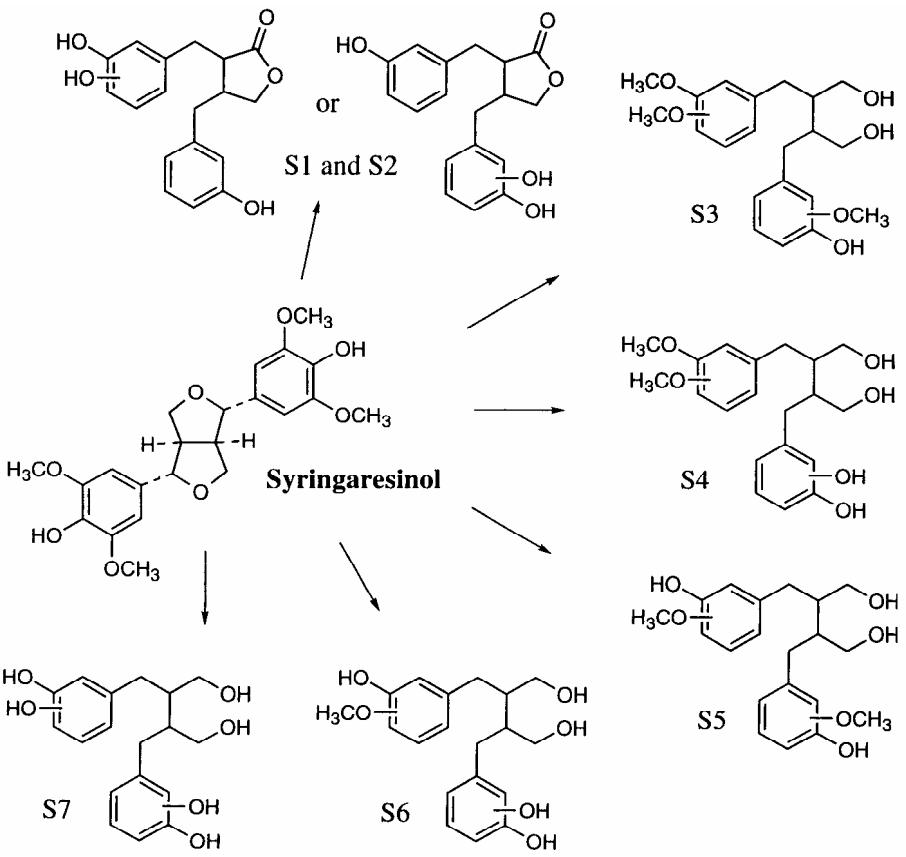


Figure IV-4. *Structures proposées pour les principaux métabolites identifiés du syringarésinol.*[15]

V. CONCLUSION

La combinaison entre l'extraction sur phase solide utilisant des cartouches AbsElut Nexus et le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse permet d'obtenir une méthode fiable et efficace pour la détection de l'éleuthéroside E dans les urines. Les analyses de *screening* ou de quantification sont effectuées en ionisation ESI positive, en mode SRM sur l'ion $[M+Na]^+$; les seuils de détection correspondants sont très bas. Les analyses de confirmation sont réalisées en ionisation ESI négative, en mode full scan MS^2 sur l'ion $[M+HCO_2]^-$ afin de satisfaire aux recommandations de l'AORC. Dans le cadre d'un *screening* de routine il est possible d'employer la même méthode que celle développée dans le cadre de l'étude de l'*Harpagophytum*, tant au niveau de l'extraction, qu'au niveau du couplage LC/MS, ce qui permet d'ouvrir la voie vers une analyse *large spectre*.

Concernant la cinétique d'élimination de l'éleuthéroside E dans les urines, elle est tout à fait comparable à celle observée pour l'harpagoside. Des études menées sur les éleuthérosides ou sur des flavonoïdes glycosides (quercétine et rutine) montrent des résultats similaires : pic d'absorption aux environs de 5 h, élimination rapide jusqu'à 12 h et absence totale de toute trace d'administration entre 15 et 24 h.[14,27-28] Les faibles quantités d'éleuthéroside E retrouvées peuvent s'expliquer par le fait que seulement 0,3 à 1,4 % de la quantité ingérée est éliminée sous forme libre ou conjuguée chez l'homme, ce qui laisse supposer que ces quantités ne sont pas très élevées chez le cheval.[14]

L'extension de l'analyse aux compléments alimentaires *via* une extraction ASE permet de compléter l'offre du laboratoire auprès de ses clients. Cela leur permet de contrôler la qualité de leurs produits lorsqu'ils ajoutent de l'*Eleutherococcus senticosus* à leurs préparations et de vérifier l'absence de contamination dans le cas contraire, les éleuthérosides étant présents dans de nombreuses plantes.

VI. RÉFÉRENCES

1. **Kang J.S., Linh P.T., Cai X.F., Kim H.S., Lee J.J., Kim Y.H.**
Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high-performance liquid chromatography. *Archives of Pharmacal Research*, **2001**, 24(5), pp. 407-411.

2. **International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Joint Commission on Biochemical Nomenclature.**
Nomenclature of lignans and neolignans – IUPAC recommendations 2000. *Journal of Pure and Applied Chemistry*, **2000**, 72(8), pp. 1493-1523.

3. **Colas C., Garcia P., Popot M.A., Bonnaire Y., Bouchonnet S.**
Optimization of solid-phase extraction for the liquid chromatography/mass spectrometry analysis of harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide and harpagide in equine plasma and urine. *Journal of Chromatographic Science*, **2006** *soumis pour publication*.

4. **Feng S.L., Hu F.D., Zhao J.X., Liu X., Li Y.U.**
Determination of eleutheroside E and eleutheroside B in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2006**, 62(3), pp. 315-320.

5. **Yat P.N., Arnason J.T., Awang D.V.C.**
An improved extraction procedure for the rapid, quantitative high-performance liquid chromatographic estimation of the main eleutherosides (B and E) in *Eleutherococcus senticosus* (eleuthero). *Phytochemical Analysis*, **1998**, 9(6), pp. 291-295.

6. **Guo M.Q., Song F.G., Liu Z.Q., Liu S.Y.**
Rapid analysis of eleutheroside By electrospray tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **2003**, 31(4), pp. 476-480.

7. **Wang Z., Zhang L., Sun Y.**
Semipreparative separation and determination of eleutheroside E in *Acanthopanax giraldii Harms* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, **2005**, 43(5), pp. 249-252.

8. **Slanina J., Glatz Z.**
Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B*, **2004**, 812(1-2), pp. 215-229.

9. **Law B., Weir S.**
Fundamental studies in reversed-phase liquid-solid extraction of basic drugs; III: sample matrix effects. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1992**, 10(7), pp. 487-493.

10. **Slacanin I., Marston A., Hostettmann K., Guédon D., Abbe P.**
The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, **1991**, 2, pp. 137-142.

11. **Harkey M.R., Henderson G.L., Gerschwin M.E., Stern J.S., Hackman R.M.**
Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 73, pp. 1101-1106.

12. **Apers S., Naessens T., Van Miert S., Pieters L., Vlietinck A.**
Quality control of roots of *Eleutherococcus senticosus* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, **2005**, 16(1), pp. 55-60.

13. **Kobashi K., Akao T.**
Relation of intestinal bacteria to pharmacological effects of glycosides. *Bioscience Microflora*, **1997**, 16(1), pp. 1-7.

14. **Hollman P.C.H., Van Trijp J.M.P., Buysman M.N.C.P., .v.d. Gaag M.S., Mengelers M.J.B., de Vries J.H.M., Katan M.B.**
Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, **1997**, 418(1-2), pp. 152-156.

15. **Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.**
In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(7), pp. 3178-3186.

16. **Oikarinen S., Heinonen S.M., Nurmi T., Adlercreutz H., Mutanen M.**
No effect on adenoma formation in Min mice after moderate amount of flaxseed. *European Journal of Nutrition*, **2005**, 44(5), pp. 273-280.

17. **Nurmi T., Heinonen S., Mazur W., Deyama T., Nishibe S., Adlecreutz H.**
Analytical, nutritional and clinical methods. Lignans in selected wines. *Food Chemistry*, **2003**, 83(2), pp. 303-309.

18. **Kim D.H., Lee K.T., Bae E.A., Han M.J., Park H.J.**
Metabolism of liriodendrin and syringin by human intestinal bacteria and their relation to *in vivo* cytotoxicity. *Archives of Pharmacal Research*, **1999**, 22(1), pp. 30-34.

19. **Medon P.J., Ferguson P.W., Watson C.F.**
Effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts on hexobarbital metabolism *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, 10(2), pp. 235-241.

20. **Yan Z.H., Yang C.H., Wu X.H., Xie Y.Y.**
The first facile synthesis of (±)-syringaresinol. *Chinese Chemical Letters*, **2004**, 15(4), pp. 408-410.

21. **Lu F., Ralph J.**
Highly selective syntheses of conyferyl and sinapyl alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46(5), pp. 1794-1796.

22. **Vermes B., Seligmann O., Wagner H.**
Synthesis of biologically active tetrahydrofurofuranlignan-(syringin, pinoresinol)-mono- and bis-glucosides. *Phytochemistry*, **1991**, 30(9), pp. 3087-3089.

23. **Jung H.J., Park H.J., Kim R.G., Shin K.M., Ha J., Choi J.W., Kim H.J., Lee Y.S., Lee K.T.**
In vivo anti-inflammatory and antinoceptive effects of liriodendrin isolated from stem bark of *Acanthopanax senticosus*. *Planta Medica*, **2003**, 69(7), pp. 610-616.

24. **Jolad S.D., Hoffman J.J., Cole J.R.**
Cytotoxic agent from Penstemon deustus (*Scrophulariaceae*): isolation and stereochemistry of liriodendrin, a symmetrically substituted furofuranoid lignan diglucoside. *Journal of Organic Chemistry*, **1980**, 45(7), pp. 1327-1329.

25. **Penalvo J.L., Nurmi T., Adlercreutz H.**
Analytical, nutritional and clinical methods. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry*, **2004**, 87(2), pp. 297-305.

26. **Waridel P.**
Investigation Phytochimique des Plantes Aquatiques Potagemon pectinatus L., P. lucens L., P. perfoliatus L. et P. crispus L. (Potamogetonaceae). Thèse de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, **2003**, 223 p.

27. **Ishii K., Furuta T., Kasuya Y.**
Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, **2001**, 759(1), pp. 161-168.

28. **Semenov V.A., Seifulla R.D., Azizov A.P., Kondrat'eva I.I.**
Chromatomass-spectrometric identification of eleutherosides in *Eleutherococcus* preparations and study of the pharmacokinetics of elton in the human organism under physical loading conditions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **1999**, 33(5), pp. 264-266 [Translated from *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, **1999**, 33(5), pp. 37-38].

Chapitre 5 - CONCLUSION GÉNÉRALE

I. ANALYSE D'ÉCHANTILLONS DE ROUTINE

Dans le but de vérifier la validité des méthodes analytiques qui ont été développées au cours de la thèse, et pour estimer l'occurrence des composés recherchés, des urines ne contenant pas de substances prohibées, issues des échantillons *de routine*, ont été analysées.

Harpagophytum

Dans un premier temps, quatre séries de 24 échantillons réparties de la façon suivante ont été analysées avec la méthode développée au chapitre 3 :

- 1 série de chevaux de trot
- 1 série de chevaux de galop
- 1 série de chevaux de sport français
- 1 série de chevaux de sport internationaux

Lors de l'interprétation des résultats, la présence d'harpagoside a pu être décelée dans deux échantillons sur les 96 analysés. Ces deux échantillons ont été prélevés sur des chevaux de sport, mais la population testée n'est pas suffisante pour que des conclusions puissent en être déduites quant à l'utilisation préférentielle d'*Harpagophytum* dans une discipline donnée.

Ce type d'étude a été reconduit ultérieurement sur 221 échantillons répartis de la manière suivante :

- 99 chevaux de trot
- 116 chevaux de galop
- 6 chevaux issus d'autres fédérations

De l'harpagoside a été retrouvé parmi quatre de ces échantillons (deux chevaux de galop et deux chevaux de trot), du 8-*para*-coumaroyl harpagide a été retrouvé dans deux d'entre eux et de l'harpagide a même été détecté dans l'un d'entre eux. Ceci montre que l'*Harpagophytum* qui est utilisé dans les compléments alimentaires peut aussi bien appartenir à la sous-espèce *procumbens*, que *zeyheri ;* cette dernière étant la seule à avoir une forte proportion de 8PCHG.

Sachant que le métabolisme de l'*Harpagophytum* chez les chevaux est très rapide, la présence d'harpagoside dans les urines au moment du prélèvement signifie que le cheval en a consommé le jour ou la veille de la compétition.

Eleutherococcus

De la même façon que précédemment, des échantillons de routine ont été analysés avec la méthode développée au chapitre 4 afin de se rendre compte de la fréquence d'utilisation de l'*Eleutherococcus* en complément de l'alimentation du cheval. Cette fois les analyses ont été effectuées sur six séries de 24 échantillons répartis parmi les catégories suivantes :

- 68 chevaux de course au trot
- 49 chevaux de course au galop
- 16 chevaux de sport
- 11 chevaux d'autres fédérations

Une difficulté supplémentaire apparaît dans le cas de l'éleuthéroside E : cette substance est susceptible d'être naturellement présente dans l'alimentation du cheval. En effet, des traces d'éleuthéroside E ont été retrouvées dans un grand nombre d'échantillons urinaires (environ 25 % des cas), ainsi que chez des résidants du centre d'administration et de prélèvement de Coye-la-Forêt, où les chevaux ne reçoivent pas d'aliments enrichis en *Eleutherococcus*. Dans le cadre de cette étude il a été considéré qu'une concentration inférieure à 1 ng/mL en éleuthéroside E ne provenait pas nécessairement d'une administration sous forme de compléments alimentaires, mais plus vraisemblablement de l'alimentation quotidienne du cheval. Il est nécessaire d'effectuer une étude de population sur un plus grand nombre d'échantillons, afin de déterminer une limite au-delà de laquelle la concentration en éleuthéroside E serait considérée comme suspecte.

Ainsi, parmi les 144 échantillons testés, 10 ont présenté une quantité en éleuthéroside E supérieure à 1 ng/mL (4 chevaux de course au trot, 3 de course au galop et 3 chevaux de sport).

En conclusion

Ces analyses menées sur des échantillons de routine sélectionnés au hasard ont permis d'établir que l'*Harpagophytum* est effectivement utilisé en phytothérapie équine, indépendamment du type d'épreuve. Il en est peut être de même pour l'*Eleutherococcus*. Des essais complémentaires sont actuellement réalisés au LCH et devraient permettre de répondre entièrement à cette question. Pour l'instant, parmi les échantillons analysés, la présence d'harpagoside a été mise en évidence dans 3 % des cas et celle d'éleuthéroside E dans 7 %. Une partie de ces résultats a été présentée à Tokyo à la 16ème ICRAV (*International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*) et publiée dans les *Proceedings* de ce congrès (*Cf. Annexe II*).

II. MÉTABOLISME

Métabolisme

Les iridoïdes glycosides et les éleuthérosides appartiennent à des familles de molécules qui n'avaient pas encore été abordées au laboratoire et dont le métabolisme a par ailleurs été relativement peu étudié. Par conséquent on ne sait pas sous quelle forme ces molécules sont généralement éliminées de l'organisme, en particulier chez le cheval, contrairement aux anabolisants stéroïdiens qui sont fréquemment éliminés dans l'urine sous forme de sulfo- et/ou glucuroconjugués, ou encore d'un grand nombre d'anti-inflammatoires non stéroïdiens qui sont également éliminés sous une forme oxydée (hydroxylée par exemple).

Les approches métaboliques mises en œuvre au cours de la thèse n'ont pas permis d'identifier de métabolites de l'harpagoside ou des éleuthérosides. Dans le cadre de l'*Harpagophytum*, on a montré que les molécules d'harpagide et de 8-*para*-coumaroyl harpagide étaient retrouvées dans les urines uniquement si elles étaient initialement présentes dans la substance administrée au cheval. Ceci montre en particulier que l'harpagide n'est pas un métabolite de l'harpagoside. L'étude *in vitro* réalisée sur l'harpagoside a conforté les résultats obtenus *in vivo* mais n'a pas donné d'informations supplémentaires. Il serait intéressant de pouvoir confirmer ou compléter ces études par d'autres essais *in vitro*, notamment à l'aide de micro-organismes comme *Cunninghamella elegans* ou de crustacés comme *Neomysis integer*, récemment utilisés avec succès dans différentes études de métabolisme.

Cinétique d'élimination

Les différentes expérimentations réalisées chez le cheval dans le cadre de cette thèse ont permis de montrer, aussi bien pour l'*Harpagophytum* que pour l'*Eleutherococcus*, que l'absorption et l'élimination des principes actifs sont très rapides ; ceci peut s'expliquer de par la polarité des molécules. Pour chacune de ces substances le pic de concentration maximum dans les urines se situe autour de 5 h après administration et l'élimination est totale en moins de 24 h. Il a également été montré que le plasma n'est pas un milieu de choix pour la détection des glucosides : l'harpagoside en est éliminé en moins de 3 h et les éleuthérosides n'y ont pas été détectés.

Dans le cas de l'*Harpagophytum*, l'élimination de l'harpagide dans les urines est plus rapide que celle de l'harpagoside. La détection de ce marqueur apporte des informations

supplémentaires quant au moment de l'administration. En effet, l'harpagide n'est plus détecté au-delà de 5 à 8 h après une administration. Ainsi, les méthodes nécessaires à un contrôle cohérent de l'utilisation de l'*Harpagophytum* chez le cheval ont été développées et il est possible de différencier si une administration a eu lieu la veille ou à un moment plus proche d'une compétition.

Compte-tenu des faibles quantités retrouvées dans le plasma et l'urine, une étude pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) complète devrait être réalisée afin de connaître les paramètres qui conditionnent l'absorption, la distribution et l'élimination de ces produits par l'organisme.

III. COMPLÉMENTS ALIMENTAIRES

Les travaux effectués sur les compléments alimentaires ont été réalisés en collaboration avec la société Pavesco AG qui commercialise les produits de la gamme Twydil (Twydil Artridil pour l'*Harpagophytum* et Twydil Hippacan+C pour *Eleutherococcus senticosus*).

En parallèle du dosage des éleuthérosides et de l'harpagoside dans les produits commerciaux, dans le cadre d'un contrôle qualité, des expérimentations animales ont été menées par la société Pavesco AG. Les échantillons obtenus ont été analysés au Laboratoire des Courses Hippiques avec les méthodes développées dans les chapitres 3 et 4 afin de déterminer le temps de rémanence de ces substances dans les urines équines après une cure de 10 jours.

Les courbes d'élimination observées pour chacun des compléments alimentaires sont très semblables. Ces dernières permettent de conforter les résultats déjà obtenus au laboratoire, à savoir une concentration maximale environ 5 h après la dernière administration et une élimination totale des substances en moins de 24 h. Le métabolisme d'une substance étant différent d'un cheval à un autre, une marge de sécurité a été prise et la société Pavesco, en accord avec le LCH, a fixé le délai de la dernière prise avant une compétition à 48 h pour chacun des produits. Dans le cas de l'Hippacan+C, une étude complémentaire sur six chevaux a été menée : un échantillon d'urine a été collecté 24 h après la dernière administration et analysé au LCH pour confirmer l'absence d'éleuthérosides.

Anti-doping certificate.
Officially certified can be used without risk up to the day of the competition.

Due to rapid scientific progress in control laboratories we must now introduce
a withdrawal period for complementary feedingstuffs containing eleutherosides.
To avoid all possible risks, we conducted a scientific trial with LCH to establish
the persistence of the eleutherosides contained in TWYDIL HIPPACAN+C.
Based on the results of that trial we recommend that TWYDIL HIPPACAN+C
should be withdrawn 2 days before competition.

Figure III-1. *Signalétique et légende accompagnant le complément alimentaire Twydil Hippacan+C. Avant (en haut) et après l'étude (en bas) réalisée en collaboration avec le LCH. Le produit Twydil Artridil a observé le même changement de signalétique.*

Au terme de ces études, comme le montre la *Figure III-1*, la signalétique qui accompagne les produits Twydil Artridil et Twydil Hippacan+C a été modifiée afin de prendre en compte les résultats de ces études.

IV. PERSPECTIVES

Les objectifs fixés au début de la thèse, c'est à dire le développement d'une méthode applicable à un dépistage *large spectre* d'une famille de molécules ainsi que le développement de méthodes de confirmation en accord avec les recommandations de l'AORC ont été atteints. Les temps de détection des différents marqueurs sont en accord avec la durée d'action effective des principes actifs de l'*Harpagophytum* et de l'*Eleutherococcus*, ce qui permet de parfaitement répondre aux attentes des Sociétés de Courses.

Les travaux menés au cours de ces trois années ont permis le développement de techniques d'extraction sur phase solide ainsi que de techniques d'analyse par couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse de glucosides, molécules très polaires, dans les urines et les plasmas équins. Les protocoles correspondants à ces méthodes ont également été rédigés, permettant ainsi à toute personne du laboratoire d'effectuer les analyses. Comme cela a été montré avec l'application à l'éleuthéroside E, la méthode développée dans le cadre de l'étude de l'*Harpagophytum* devrait être étendue à d'autres glucosides. Cependant, si la liste de ces substances n'est pas suffisante pour créer un poste *de routine*, il est possible d'y intégrer la détection de molécules de l'actuel *screening*. A titre d'exemple, la phénylbutazone ou l'hydroxylidocaïne, utilisée comme étalon interne, ont déjà été détectées par cette méthode.

Actuellement le *screening* de l'harpagoside et de l'éleuthéroside E est effectué sur une transition en mode SRM ou CRM. Pour effectuer un spectre en mode full scan MS^2 ou MS^3 une seconde analyse est nécessaire. Afin d'éviter cette analyse complémentaire il serait envisageable d'utiliser un programme basé sur le principe du *Data Dependant Scan*, qui au-delà d'un seuil pour une transition donnée déclencherait automatiquement l'acquisition d'un spectre de masse complet. Cela se pratique déjà sur des appareils de type Q-Trap (Applied Biosystems, triple quadripôle dont le troisième quadripôle est un piège quadripolaire 2D).

Cependant, avant que les techniques développées au cours de la thèse ne soient utilisées *en routine* pour créer un *screening* additionnel à ceux existants déjà au laboratoire, il sera nécessaire d'effectuer une campagne d'information auprès des éleveurs, entraîneurs et fabricants de compléments alimentaires quant à l'utilisation de la phytothérapie.

ANNEXES

ANNEXE I AORC GUIDELINES FOR THE MINIMUM CRITERIA FOR IDENTIFICATION BY CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

1. This document[1] provides a set of internationally-agreed recommendations for the comparison of chromatographic and mass spectral data consistent with ILAC-G7:1996 Part B *Guide for Establishing the Presence of Prohibited Substances*.[2] The AORC recognises that these represent guidelines for analysts and laboratories, whose responsibility it is to ensure the quality and integrity of the data is defensible and fit for purpose. Furthermore, AORC laboratories should have their own minimum criteria defined documented.

GENERAL ANALYTICAL REQUIREMENTS

2. In general, chromatographic separation coupled to mass spectrometric detection can be sufficiently specific to be used alone as a confirmatory method.

3. The injection sequence for a confirmatory batch should consistent with Part B Clause 14 of the ILAC-G7 document. An example of a sequence appropriate to a range of analytical circumstances is as follows:

- Negative control (can also serve as system blank for non-threshold substances)
- System blank
- Test sample to be confirmed
- Reagent blank or negative control
- Reference sample (reference material or other positive control)

CHROMATOGRAPHY

Option A

4A. When using a suitable internal standard or marker, the relative retention time (RTT) of the analyte in the test sample should not vary from that in the reference sample by more than the following:

- ± 1 % for gas chromatography (GC)
- ± 2 % for liquid chromatography (LC)

5A. Otherwise the following absolute retention time criteria should apply:

- ± 1 % or 6 seconds for GC (whichever is the greater)
- ± 2 % or 12 seconds for LC (whichever is the greater)

6A. These figures relate to conventional GC and LC. Laboratories using other high efficiency separation techniques, such as capillary electrophoresis, microbore LC or capillary GC, should set criteria appropriated for the technique used.

Option B

4B. When using a suitable internal standard or marker, the relative retention time (RTT) of the analyte in the test sample should vary from that in the reference sample by more than the following:

- ± 0.5 % for gas chromatography (GC)
- ± 1 % for liquid chromatography (LC)

5B. Otherwise the following absolute retention time criteria should apply:

- ± 0.5 % or 6 seconds for GC (whichever is the greater)
- ± 1 % or 12 seconds for LC (whichever is the greater)

6B. These figures relate to capillary GC and conventional LC. Laboratories using other high efficiency separation techniques, such as capillary electrophoresis or microbore LC, should set criteria appropriated for the technique used.

LOW RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

7. For any full scan MS technique, a minimum number of 3 ions is required to be selected, from the test (sample) spectrum, for the purpose of matching their relative abundances (RA) with those in the reference spectrum obtained within the same injection sequence.

8. The ions selected for matching should be a molecular ion, quasi-molecular ion or fragment ion whose presence and abundance are relatively more characteristic of the test substance (analyte). The molecular ion or quasi-molecular ion must be included if it is present at a RA of greater than 5 % in the test spectrum.

9. For product ion scan MS/MS techniques, the selection of the precursor ion (even if it is also the molecular or quasi-molecular ion) for matching should be avoided. However in case of insufficient ions it may still be selected, provided its RA in the test spectrum is between 10 % and 80 %.

10. Further techniques or derivatisations may be used in combination if a single technique produces less than 3 ions suitable for matching.

11. The signal of any ion used for matching must be significantly above the background level (noise). Typically, the signal to noise ration should be well above 3:1 in the single ion traces.

12. Within the common mass range, all ions that can be ascribed to the analyte and appearing in the reference spectrum whith RA greater than 10 % must also be present in the test spectrum. This requirement is independent of those in Clauses 13-15 for the ions selected for matching.

Maximum permitted difference (tolerance) for the matching ions

13. The relative abundance (RA) is the abundance of a particular ion relative to that of the most abundant ion (base peak) expressed as a percentage. RA may be calculated by integrating signals of single ion traces or from background-subtracted mass spectra.

14. The maximum permitted differences in RA are as follow:

- Single-stage MS: 10 % absolute or 30 % relative, whichever is the greater
- MS/MS & related techniques: 20 % absolute or 40 % relative, whichever is the greater

These criteria apply to all common ionisation techniques in the full scan mode, irrespective of the type of mass analyser used.

15. The maximum permitted difference (tolerance) in RA in the test spectrum may be absolute or relative, and is always calculated with respect to the RA of the corresponding ion in the reference spectrum:

	Full scan single-stage MS:	Full scan MS/MS & related techniques:
RA of matched ion in reference spectrum	Acceptable RA in test spectrum (10% absolute or 30% relative)	Acceptable RA in test spectrum (20% absolute or 40% relative)
100% (Base Peak)	70-100%	60-100%
90%	63-100%	54-100%
80%	56-100%	48-100%
70%	49-91%	42-98%
60%	42-78%	36-84%
50%	35-65%	30-70%
40%	28-52%	20-60%
30%	20-40%	10-50%
20%	10-30%	0-40%
10%	0-20%	0-30%
5%	0-15%	0-25%
1%	0-11%	0-21%

Extraneous ions

16. The presence of extraneous ions with *m/z* larger than 100 in the test spectrum should each not exceed 20 % RA unless it can be demonstrated to be extraneous using extracted ion chromatograms. This may be calculated from a background-subtracted spectrum or from single ion traces.

Application of background correction (subtraction)

17. The approach to background subtraction should be consistent across a batch of samples. The details of the background subtraction applied should be appropriate to the individual sample.

SIM

18. Since full scan data is preferred to selected ion monitoring (SIM) for the confirmation of the presence of an analyte in a sample, tighter criteria should be applied. A minimum of 4 ions should be selected for matching, and will stricter tolerances on their RA than those required for full scan techniques.

Macromolecular analytes

19. Laboratories working on macromolecules should set criteria appropriate for the technique and mass range used.

REFERENCE MATERIALS

20. The suitability of reference materials used in chromatographic and mass spectrometric analyses shall be consistent with Part B Clause 16 of the ILAC-G7 document. Materials of known, certified content are preferable for use as reference materials. Where these are not available, the source of a reference material should be documented in detail and its identity validated.

21. It is acceptable to use any of the following as positive control to obtain reference data:

- Extracted or non-extracted reference material
- Extract from a sample-matched matrix spiked with a reference material
- Isolate from a sample taken after an authenticated administration of the appropriate substance

22. In any case, the mass spectral (and chromatographic) data obtained should be attributable to the analyte concerned.

Ratio of sample and reference material concentrations

23. The mass spectral and chromatographic data obtained from the reference material should provide a definitive data set for comparison with those from the unknown test sample. The reference material concentration used should be such that the retention time and mass spectral data obtained are unaffected by instrumental or matrix effects. It is not necessary to match the concentrations of test and reference samples, although it is good practice to consider the potential for variations in mass spectral and chromatographic data due to concentration or matrix effects.

1. **Association of Official Racing Chemists.**
AORC guidelines for the minimum criteria for identification by chromatography and mass spectrometry, MS Criteria Working group, Internal communication to AORC members, **2002**.

2. **International Laboratory Accreditation Cooperation.**
ILAC G7:1996, *Accreditation Requirements and Operating Criteria for Horseracing Laboratories*., **1996**.

ANNEXE II 16TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF RACING ANALYSTS AND VETERINARIANS

A Study on the Detection of *Harpagophytum* Administration in Horse Urine: Application to the Detection of *Eleutherococcus senticosus* Administration

Marie-Agnès Popot[‡], Cyril Colas[‡,†], Patrice Garcia[‡], Yves Bonnaire[‡] and Stéphane Bouchonnet[†].

[‡] LCH – Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières le Buisson, France.

[†] DCMR – Laboratoire de Chimie des Mécanismes Réactionnels, École Polytechnique, route de Saclay, 91128 Palaiseau cedex, France.

In *Proceedings of the 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. R&W Communications, Tokyo, Japan, **2007**, in press.

1. SUMMARY

In horse urine, we have investigated the detection of the administration of (i) *Harpagophytum* and (ii) preparations containing a plant capable of anti-stress properties *Eleutherococcus senticosus*. Harpagoside has been found to be the main indicator of *Harpagophytum* in the horse. A method has been previously established to detect harpagoside in plasma and urine samples by LC/ESI-MS^n. In the present study, harpagoside has been quantified in post-administration urine samples collected from four horses having received harpagoside or preparations containing *Harpagophytum*. The extraction and LC/MS methods have been modified to detect eleutheroside E in urine samples. Eleutheroside E was found to be the main indicator of *Eleutherococcus senticosus* administration. It has been detected in post-administration samples collected from two horses having received feed supplement containing *Eleutherococcus senticosus* for several days. The administration data indicate that harpagoside or eleutheroside E are detectable for less than 24 hours after administration. The two methods were tested on post-race urine samples.

2. INTRODUCTION

Feed supplements have often been advertised for improving well-being and performance of human and animal athletes. While some of these feed supplements contain anabolic steroids, some of them are composed of plants products owning useful properties for preventing or removing pain such as *Harpagophytum* or suppressing stress such as *Eleutherococcus*.

Harpagophytum procumbens or *zeyheri*, also called Windhoek's root or Devil's claw, is a medicinal plant from South Africa, Namibia and Botswana, introduced in Europe a long time ago. Herbal preparations containing *Harpagophytum* with other plants are used for prevention of inflammatory processes of competition horses and in the treatment of animals suffering from lameness. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) monographs summarizes the pharmacological and clinical evidence behind the therapeutic indications for the individual plant materials. ESCOP recommends the use of Devil's claw for symptomatic treatment of painful osteoarthritis, relief of low back pain, loss of appetite and dyspepsia.[1] The effectiveness of *Harpagophytum* in the treatment of low back pain has been extensively studied.[2-3] Due to its action on the muscular system, it is recommended in the treatment of chronic rheumatisms, tendinitis, osteoarthritis and arthritis.[4] Consequently, there was a need for setting up a method to detect this class of compounds. Apart from recent studies such as those of Seger *et al.*, and Baranska *et al.*, there was very little information in the literature on the analysis and extraction of these compounds from vegetal media and biological fluids.[5-6] An LC/MS^n method has been developed at LCH to detect harpagoside (HS), harpagide (HG), and 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG) (*Figure AII-1a*), which are the major compounds of *Harpagophytum procumbens* or *zeyheri*.[7-8] This method has been modified to detect eleutheroside E (EE) in equine urine samples (*Figure AII-1b*). EE is present in plants such as *Eleutherococcus senticosus* and is a major constituent of feed supplements recommended to improve resistance to stress of competition horses.

The goal of this paper is (i) to present elimination profiles obtained from post-administration urine samples collected from horses to which *Harpagophytum* and related preparations were administered (ii) the development of a method for detecting administration of eleutheroside preparations (iii) the application of both methods on post-competition urine samples.

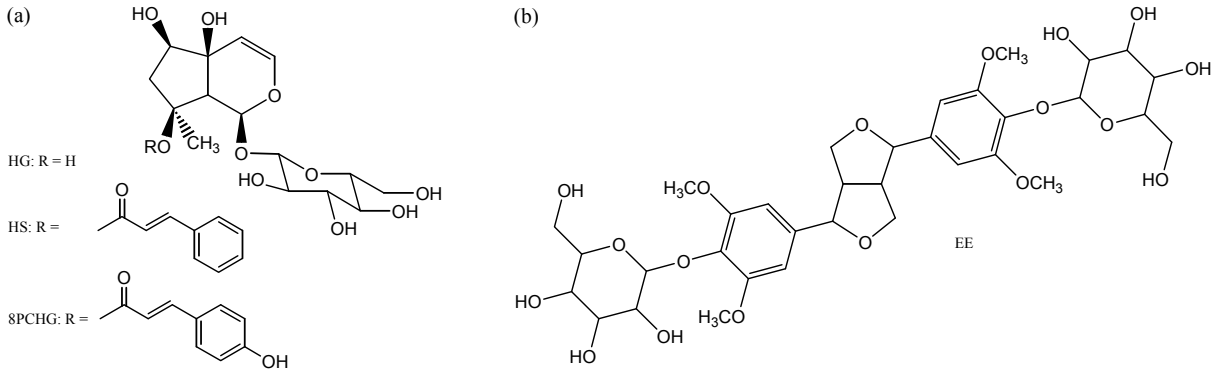


Figure AII-1. *(a) Chemical structures of harpagide (HG), harpagoside (HS) and 8-para-coumaroyl harpagide (8PCHG). (b) Chemical structure of eleutheroside E (EE).*

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Chemicals

HPLC-grade water was obtained by purifying water in a Milli-Q filtration system (Millipore, Bedford, MA, USA), HPLC-grade methanol, *n*-hexane, and acetonitrile were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy), isopropyl alcohol, formic acid, sodium chloride, sodium dihydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate from VWR (Paris, France), methylene chloride from JT Baker (Deventer, The Netherlands).

AbsElut Nexus (60 mg), BondElut PPL (200 mg) and BondElut C18 HF (500 mg) 3-mL cartridges for Solid-Phase Extraction (SPE) were purchased from Varian (Palo Alto, CA, USA).

Harpagoside (HS) was supplied by Extrasynthèse (Genay, France), harpagide (HG) and 8-*para*-coumaroyl harpagide (8PCHG) were purchased from Phytolab (Hamburg, Germany), eleutheroside E (EE) from LGC Promochem (Molsheim, France). Hydroxylidocaine (OHL), used as the internal standard for LC/MS quantitation, was synthesized in our laboratory.

3.2. Animal experiments

a. Harpagophytum

HS or related commercial products were administrated to four thoroughbred horses. A unique dose of HS (120 mg) or Harpadol (32 capsules equivalent to approximately 220 mg of HS) was given orally to 2 horses. Harpagophyt (2 doses/day, *i.e.* about 165 mg/day of HS) or Twydil Artridil (4 doses/day, *i.e.* 100 mg/day of HS) was given orally twice a day to 2 horses in a treatment during 10 days. For each horse 10 or 11 urine samples were collected from 2 hours to 5 days.

b. Eleutherosides

Two doses of Twydil Hippacan+C (*i.e.* 70 mg of EE) were given orally once a day to two thoroughbred horses for 5 days. For each horse, 6 or 7 urine samples were collected from 2 to 24 hours after the last administration and one urine sample was collected each day up to 5 days after administration.

3.3. Analysis of post-race negative urine routine samples

For harpagoside, 96 post-administration urine samples collected from 24 harness race horses, 24 thoroughbred race horses and 48 sport horses were tested. For eleutheroside E, 144 post-administration urine samples were collected from harness race

horses (n = 68), thoroughbred race horses (n = 49), sport horses (n = 16) and horses of unknown origins (n = 11) were tested.

3.4. Analytical methods

a. Urine sample preparation for HS, HG and 8PCHG

One mL of urine was diluted with 2.5 mL of 0.25 M phosphate buffer pH 7.7 and 6.5 mL of water and 2.5 ng of internal standard OHL were added. The pH was adjusted to 7.7. Then the sample was centrifuged 30 min at 3000 g before performing SPE. HS and 8PCHG were extracted with a Rapid Trace SPE workstation (Zymark, Hopkinton, MA, USA), using AbsElut Nexus cartridges successively rinsed with water, a 70:30 water/methanol mixture and *n*-hexane. Analytes were eluted with a 80:20 methylene chloride/isopropyl alcohol mixture.[7] HG was extracted in two steps: urine prepared as described above was extracted on a BondElut PPL cartridge. After rinsing with water, elution was made with a 50:50 acetonitrile/methanol mixture. The solution eluted from this cartridge was evaporated and then dissolved in 100 µL of methanol to which 3 mL of water had been added. This solution was extracted on a BondElut C18 HF cartridge, rinsed with *n*-hexane and a 70:30 water/methanol mixture, and eluted with a 50:50 water/methanol mixture.[8] After extraction, samples were evaporated to dryness at 48 °C with a TurboVap LV Evaporator (Zymark) for 15 to 20 minutes. The dry residue was dissolved in 25 µL of methanol and 175 µL of water before analysis by LC/MS^n.

b. Urine sample preparation for EE

The analytical procedure described before for HS has been applied for the extraction of eleutheroside E in urine. The only step which has been modified is the composition of the rinsing reagents which were water, then 95:5 water/methanol and finally *n*-hexane.

3.5. Instrumentation

The study has been performed on the LTQ except for the analysis of HS in routine samples which was carried out on the LCQ Deca XP Max.

a. LC/MS for HS, HG, 8PCHG and EE on LTQ

Analyses were performed using an Agilent 1100 Series binary pump, equipped with a standard autosampler, a vacuum degasser and a thermostated column compartment (Agilent, Palo Alto, CA, USA). The column used was a Zorbax Eclipse XDB-C18 Solvent Saver Plus (3.5 µm, 150 x 3.0 mm), equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 12.5 x 4.6 mm) analytical guard column (Agilent Technologies, Massy, France) and a 0.5 µm high pressure frit. A mobile phase consisting of 0.1 % formic acid in water (A solvent), and

methanol (B solvent) was generated as follows: 0-2 min 10 %B, 4 min 60 %B, 5 min 80 %B, and 100 %B from 10-15 min, with column re-equilibration from 16-20 min at 10 %B. Flow rate was 400 µL/min and 10 µL of sample was injected.

The LTQ was operated in the ESI positive mode (+4.5 kV). The flows of sheath and auxiliary gases were set at 40 and 5 arbitrary units, respectively. The capillary temperature was maintained at 350 °C. The q_z factor was set to 0.25 for all MS^n experiments. The product ions resulting from Collision-Induced Dissociation (CID) of $[M+Na]^+$ ions were monitored in the MS^2 or MS^3 modes with *m/z* scanning of product ions for analyte identification: *m/z* 387.1 → [200-390] for HG, *m/z* 517.1 → 369.1 → [200-380] for HS, *m/z* 533.1 → 369.1 → [200-380] for 8PCHG. The Consecutive Reaction Monitoring (CRM) mode was used for quantitation, using the following transitions: *m/z* 517.1 → 369.1 → 351.1 for HS, *m/z* 533.1 → 369.1 → 351.1 for 8PCHG. OHL was always detected in the Selected Reaction Monitoring (SRM) mode on the *m/z* 251.1 → 86.0 transition.

For EE, the product ions resulting from CID of $[M+Na]^+$ ions were monitored for screening and quantitation in the SRM mode using the following transition: *m/z* 765.2 → 603.2. For analyte identification, the LTQ was operated in the ESI negative mode and the products ions resulting from CID of $[M+HCO_2]^-$ ions were monitored in MS^2: 787.1 → [215-800].

b. LC/MS for HS on LCQ Deca XP Max

Liquid chromatography consisted of a Surveyor MS Pump equipped with a Surveyor autosampler (Thermo Electron, San Jose, CA, USA). The column, and precolumn were those described before. The flow rate was 300 µL/min. The LCQ Deca XP Max, was operated in the ESI positive mode. The flows of sheath and auxiliary gases were set at 20 arbitrary units for OHL and at 30 and 7 arbitrary units, respectively, for HS. The capillary temperature was maintained at 300 °C. The q_z factor was set to 0.25 for all MS^n experiments. The CID of $[M+Na]^+$ ions was operated in the MS^2 or MS^3 modes with *m/z* scanning of daughter ions, *m/z* 517.2 → [350-520] and *m/z* 517.2 → 369.1 → [200-380] for HS.

4. RESULTS

4.1. Harpagophytum study

The extraction method and mass spectrometry analysis has been previously optimized.[7-8] HS and 8PCHG have been extracted using AbsElut Nexus cartridges, with recoveries of 85 and 77 %, respectively (RSD between 7 and 19 % determined on 12 urine samples). The extraction of HG has involved the use of two cartridges: BondElut PPL and BondElut C18 HF. The mean value of recovery ratio was of 75 %, (RSD between 14 and 19 %).

The possibility offered by the different mass spectrometers available at LCH were tested; the LTQ mass spectrometer was the most efficient for qualitative and quantitative analysis, a large part of the study has been performed on this instrument.[7] For qualitative purpose, analysis was carried out in full scan MS^2 or MS^3 mode. Extracted ion mass chromatograms and the mass spectrum obtained from a solution of HS at 100 pg/µL are presented on *Figure AII-2*. Due to a strong matrix effect observed in urine, quantification of HS in post-administration samples was done by means of the standard addition method using the CRM mode as previously described.[8]

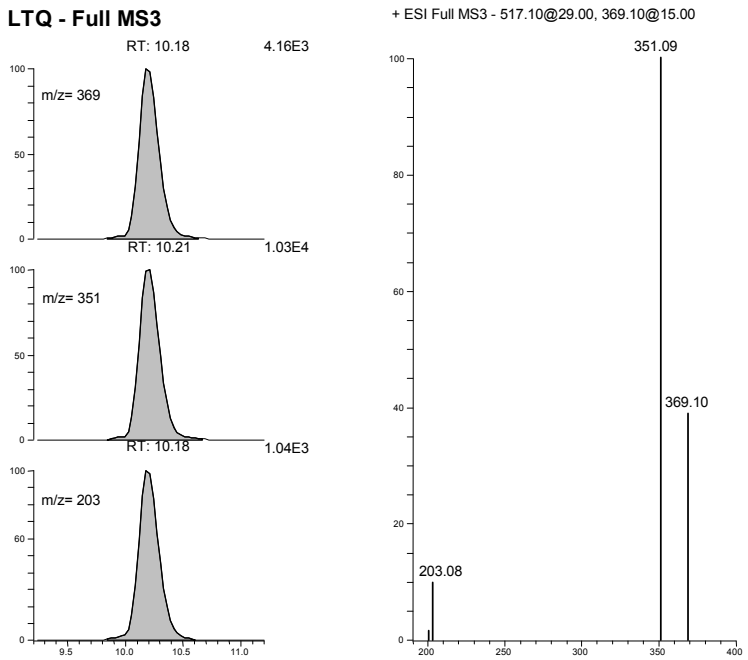


Figure AII-2. *Extracted ion mass chromatograms (left) and spectrum (right) of harpagoside at 100 pg/µL obtained on the LTQ in full scan MS^3 mode.*

a. Detection of HS, HG and 8PCHG in post-administration samples

HS was detected in post-administration samples collected from the four horses treated orally with HS (120 mg) or *Harpagophytum* at low concentrations (less than 40 ng/mL); the peak concentrations were observed at about 4 hours in the four different experiments (*Figure AII-3*). HG was not detected in HS post administration samples. In urine samples collected from 2 to 24 hours after administration of a higher dose of HS (600 mg), HG was not detected. In contrast, HG was detected in Harpadol and Harpagophyt in 3-hour post-administration samples, but not detectable at all 10 hours after administration. 8PCHG was detected in Harpadol and Harpagophyt post-administration samples from 3 hours up to 10 hours after administration.

These results indicate that HS is the main indicator of *Harpagophytum* administration and that HG can be detected in post-administration urine samples a few hours after the administration of *Harpagophytum* preparations.

Further experiments conducted in the *Data Dependant Scan* mode did not identify other metabolites. In addition, an *in vitro* experiment was conducted at the Hong-Kong Jockey Club laboratory on HS. This experiment was conducted in accordance to the usual *in vitro* procedure employed in this laboratory. HS was identified in microsomal mixtures but no metabolites were identified. HG was not identified. This confirms that HG seems not to be a metabolite of HS in the horse.

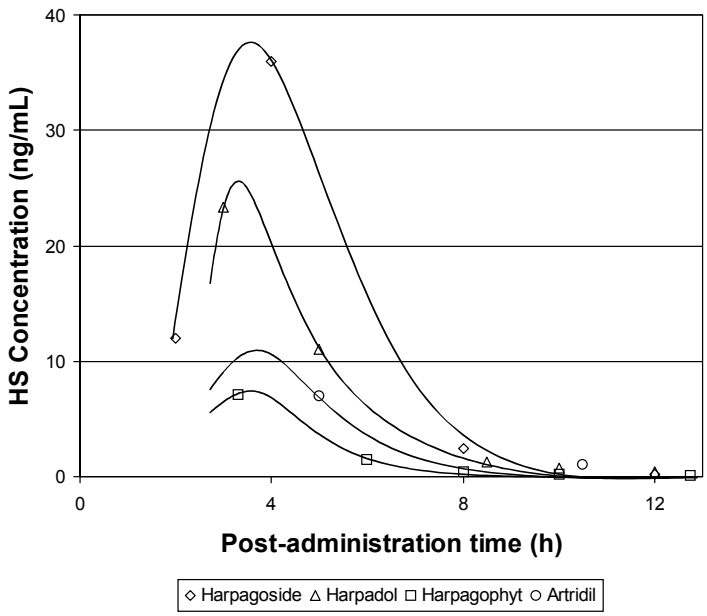


Figure AII-3. *Elimination profile of harpagoside after oral administration of different preparations of harpagoside.*

b. Detection of HS in post-race samples tested negative

Even though LTQ was considered as the most appropriate mass spectrometer instrument, the LCQ Deca XP Max was selected for HS routine analysis. Using the extraction method described above, two out of 96 horse samples were found to contain HS.

4.2. Application of the method to the detection of EE in urine samples.

Typical ion chromatograms obtained from a blank urine sample and a urine sample spiked at 1 ng/mL are shown on *Figure AII-4*. The EE extraction recovery has been evaluated on 8 urine samples at two concentrations: 2 and 20 ng/mL. Recovery was 85 % at 2 ng/mL (RSD 11 %) and 95 % at 20 ng/mL (RSD 7%).

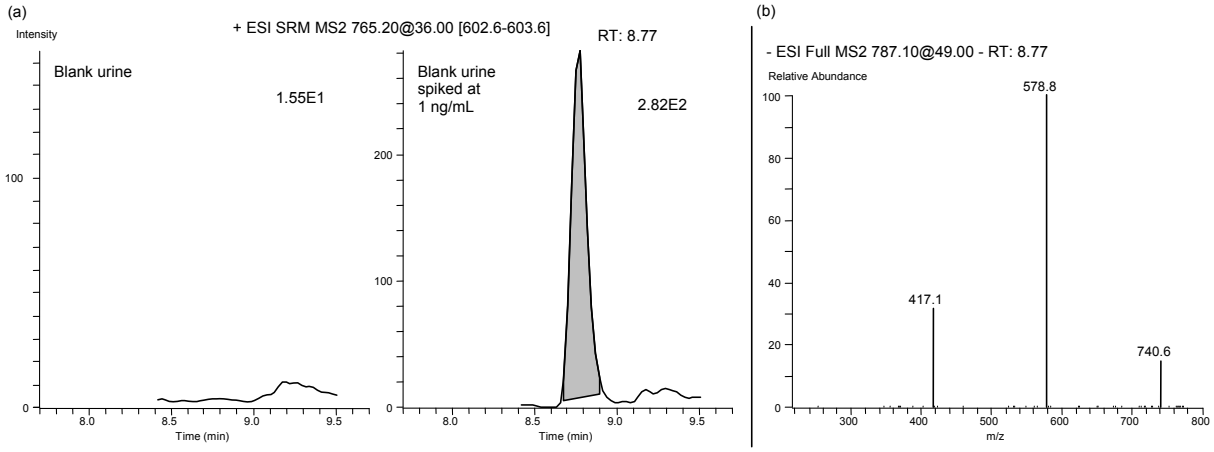


Figure AII-4. *(a) Extracted ion mass chromatogram obtained in the SRM mode (at m/z 765) in the ESI positive mode from a blank urine (left) and from a fortified urine at 1 ng/mL (right). (b) Full scan MS^2 mass spectrum of eleutheroside E obtained from m/z 787 in the negative ESI mode. Characteristic ions are m/z 741, m/z 579 and m/z 417 which correspond to the loss of formate and successive losses of two glucoses, respectively.*

a. Detection of EE in post-administration urine samples

Eleutheroside E has been detected in urine samples collected in the two different experiments (*Figure AII-5*). Urine concentrations were low and less than 5 ng/mL. Peak concentrations were observed about 5 hours after administration. Eleutheroside E was not detectable 24 hours after administration.

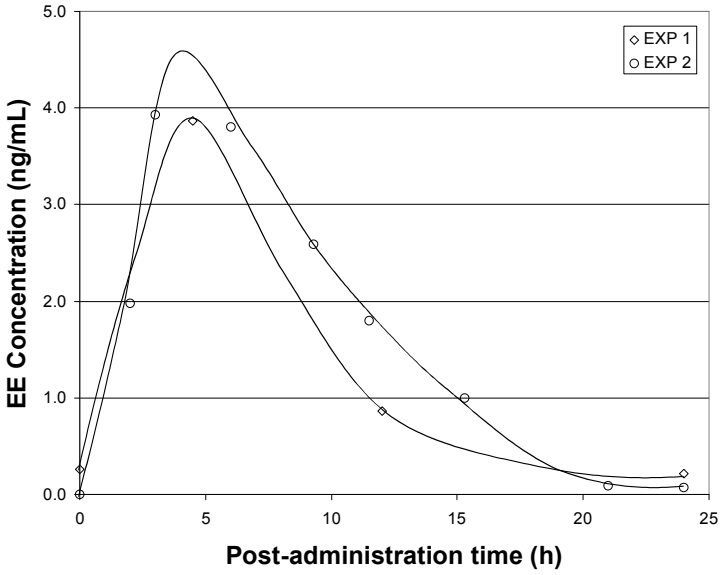


Figure AII-5. *Elimination profile of eleutheroside E in urine after administration of two doses of Twydil Hippacan+C for five days.*

b. Detection of EE in post-race routine urine samples

Tableau AII-1. *Detection of EE in post-race samples.*

	Total number	Detection of Eleuteroside E		
Horse origin	144	Not detected	Traces	≥ 1ng/mL
Sport horses	16	8	5	3
Thoroughbred race horses	49	38	8	3
Harness race horses	68	52	12	4
Unknown	11	9	2	-

EE concentrations were estimated with a 1 ng/mL EE spiked urine. Of the 144 post-competition samples tested, no EE was detected in 107, < 1 ng/mL was found in 27, and 10 samples had > 1 ng/mL.

5. CONCLUSION

Methods have been developped to qualitatively detect polar compounds such as HS and EE in urine samples. The methods here presented for HS extraction are usable on a large scale. Due to ionic suppression encountered in the ESI source, HS is not well detected using the method optimized for EE. However the HS findings in otherwise negative post-race routine samples indicate that feed supplements containing these compounds are currently used for horse competition. Our method offers a possibility for controlling urine routine samples for about 24 hours. These methods could be extended to other chemically related compounds. In addition, detection of these compounds in feed supplements has been also developed.

Acknowledgements

This work was funded by ANRT and by *Les Haras Nationaux*, the French Ministry of Agriculture, Food Trade, Fishing and Rural Business. The authors are indebted to Dr Garin and their staff for animal experiments. The authors also thank Twydil for donation of horse urine samples for this project. Thanks to the Hong-Kong Jockey Club, Dr Emmie Ho and Dr Terence Wan for carrying out the *in vitro* experiment test.

6. REFERENCES

1. **European Scientific Council on Phytotherapy.**
   Harpagophiti radix – Devil's claw root (2nd edn). Thieme, New York, E/S/C/O/P Monographs, **2003**, pp 233-240.

2. **Chrubasik S.**
   Osteoarthritis: pharmacology and clinical indications of selected botanicals. *The Pain Clinic*, **2004**, 16(1), pp. 1-16.

3. **Chrubasik S., Künzel O., Thanner J., Conradt C., Black A.**
   A 1-year follow-up after a pilot study with Doloteffin® for low back pain. *Phytomedicine*, **2005**, 12(1-2), pp. 1-9.

4. **Chantre P., Cappelaere A., Leblan D., Guedon D., Vandermander J., Fournie B.**
   Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, **2000**, 7(3), pp. 177-183.

5. **Seger C., Godejohann M., Tseng L.H.**
   LC-DAD-MS/SPE-NMR hyphenation – A tool for the analysis of pharmaceutically used plant extracts: identification of isobaric iridoid glycoside regioisomers from *Harpagophytum procumbens*. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77(3), pp. 878-885.

6. **Baranska M., Schulz H., Siuda R., Strehle M.A., Rosch P., Popp J., Joubert E., Manley M.**
   Quality control of *Harpagophytum procumbens* and its related phytopharmaceutical products by means of NIR-FT-Raman spectroscopy. *Biopolymers*, **2005**, 77(1), pp. 1-8.

7. **Colas C., Garcia P., Popot M.A., Bonnaire Y., Bouchonnet S.**
   Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of *Harpagophytum* in equine urine and plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20(22), pp. 3257-3266.

8. **Colas C., Garcia P., Popot M.A., Bonnaire Y., Bouchonnet S.**
   Optimization of solid-phase extraction for the liquid chromatography/mass spectrometry analysis of harpagoside, 8-*para*-coumaroyl harpagide and harpagide in equine plasma and urine. *Journal of Chromatographic Science*, **2006**, submitted for publication.

RÉSUMÉ

Ce mémoire, consacré au développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'*Harpagophytum* et l'*Eleutherococcus*, principes actifs utilisés en phytothérapie équine, est constitué de cinq chapitres. Le premier chapitre situe les enjeux des recherches entreprises ; il détaille le principe d'un contrôle de la méditation et le déroulement de celui-ci. Les propriétés, tant botaniques que pharmacologiques, des plantes étudiées, l'*Harpagophytum procumbens* et l'*Eleutherococcus senticosus* y sont également présentées. Dans le second chapitre, les différentes techniques expérimentales et les méthodes théoriques employées au cours de cette thèse sont détaillées. Cela concerne la préparation d'échantillon avec les différentes méthodes d'extraction, l'analyse par couplage chromatographie – spectrométrie de masse, et la modélisation moléculaire. Le troisième chapitre, dédié à l'étude de l'*Harpagophytum*, est présenté sur publications. L'extraction des principes actifs à partir des fluides biologiques équins, leur analyse par LC/MS, une approche théorique de la cationisation de l'harpagide par le sodium ainsi qu'une approche métabolique de l'harpagoside y sont développées. Une application directe de ces résultats à l'étude des éleutherocoques est présentée dans le chapitre 4, complétée par la recherche des principes actifs dans les compléments alimentaires. Le cinquième et dernier chapitre est un bilan des applications, des résultats et des perspectives qui découlent du travail effectué au cours de ces trois années.

ABSTRACT

This five-chaptered manuscript is devoted to the development of physico-chemical methods for the equine medical treatment control of *Harpagophytum* and *Eleutherococcus*, active principles used in herbal medicine. The first chapter deals with the objects of the study and presents the botanical and pharmacological properties of the plants of interest: *Harpagophytum procumbens* and *Eleutherococcus senticosus*. The second chapter details the experimental and theoretical techniques used: sample preparation, mass spectrometry coupled with liquid or gas chromatography and molecular modeling. The third chapter is presented on the basis of publications; extraction of active principles of *Harpagophytum* from equine biological samples, LC/MS analysis, as well as a theoretical approach of harpagide cationization by sodium ions and a metabolic approach of harpagoside are developed. A direct application of these results on eleutherosides B and E is shown in the fourth chapter, completed by a research of the active principles in feed supplements. The fifth and last chapter is the outcome of the applications, results and perspectives from the work performed during the last three years.