



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Chimie - Biologie - Santé

Présentée et soutenue par
Julie Vaysse-Dufaure

Le 12 décembre 2011

Titre :

Apport de la Résonance Magnétique Nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires

JURY

*Dr. Stéphane Viel
Pr. Nathalie Azaroual
Pr. José Martins
Pr. Françoise Nepveu
Dr. Richard Péna
Pr. Véronique Gilard*

*Université de Aix-Marseille III
Université de Lille II
Université de Ghent (Belgique)
Université de Toulouse III
Laboratoires Pierre Fabre
Université de Toulouse III*

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

SPCMIB

Directrices de Thèse :

*Pr. Véronique Gilard
Pr. Myriam Malet Martino*

Résumé

Apport de la Résonance Magnétique Nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires

Résumé :

L'objectif de ces travaux a été de montrer l'application de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à des problématiques analytiques dans le domaine de l'analyse pharmaceutique. Trois axes ont été abordés :

Le premier axe a porté sur l'analyse de contrefaçons de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires adultérés. La RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ^1H a été utilisée comme un outil analytique permettant d'avoir une information globale sur la formulation pharmaceutique. En plus des informations structurales, elle permet d'obtenir une séparation virtuelle des composés, ce qui facilite l'identification des adultérants dans les formulations.

Le deuxième axe a porté sur la caractérisation (stœchiométrie et taux d'encapsulation) par RMN ^1H DOSY et ROESY d'entités formées par encapsulation de principes actifs dans des cyclodextrines.

Le dernier axe a été orienté vers la phytopharmacie. Les extraits végétaux sont des milieux complexes à analyser. C'est la raison pour laquelle, dans cette partie, une approche métabolomique par RMN ^1H a été mise en œuvre pour le contrôle qualité d'extraits de *Magnolia officinalis*.

Mots clefs : RMN DOSY, médicaments, contrefaçons, adultérants, cyclodextrines, métabolomique

Nuclear Magnetic Resonance for quality control of conventional drugs, herbal medicines and dietary supplements.

Abstract :

The purpose of this research was the application of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in the pharmaceutical field. The studies were focused on three main research axes:

The first part dealt with the analysis of counterfeit drugs, adulterated phytopharmaceuticals and adulterated dietary supplements. DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ^1H NMR was the main analytical technique employed as it gives a comprehensive overview of the formulation. Besides structural information, it provides virtual separation of compounds and thus makes easier the identification of adulterants in various formulations.

The second part was devoted to the characterization of inclusion complexes of active pharmaceutical ingredients into cyclodextrines by ^1H DOSY and ROESY NMR.

The last part was about phytopharmaceuticals. The analysis of complex mixtures such as plant extracts is difficult. A metabolomics approach combining ^1H NMR and several statistical tools was thus developed for quality control of *Magnolia officinalis* extracts.

Key words: DOSY NMR, drugs, counterfeits, adulterants, cyclodextrins, metabolomics

Laboratoire d'accueil : Groupe de RMN Biomédicale,
Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB),
UMR CNRS 5068,
Université Paul Sabatier – 118, route de Narbonne
31062 TOULOUSE cedex 4

Remerciements

Les travaux décrits dans cette thèse ont pu être réalisés grâce à un co-financement des Laboratoires Pierre Fabre et de la région Midi-Pyrénées.

Ce travail a été réalisé au sein du groupe de RMN Biomédicale du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB, UMR 5068 CNRS-Université Paul Sabatier) en collaboration avec l'Institut de recherche Pierre Fabre.

Je tiens à remercier le docteur Michel Baltas, directeur du laboratoire SPCMIB pour m'avoir accueillie dans ces locaux.

Je souhaite également à exprimer ma gratitude à ma directrice de thèse, le professeur Véronique Gilard pour l'intérêt et la confiance qu'elle a su m'accorder tout au long de ma thèse. Au cours de ses trois ans, je n'aurais vu les limites ni de son aide ni de sa gentillesse. Véritable locomotive de ce projet, j'adresse mes profonds remerciements au professeur Myriam Malet Martino, co-directrice de cette thèse et responsable du groupe RMN Biomédicale. Sa rigueur et ses compétences m'ont permis d'avancer et de dépasser les obstacles. Je remercie également Stéphane Balayssac pour m'avoir formée au spectro et à la métabolomique par RMN ¹H. Je lui en suis grandement reconnaissante ainsi qu'au professeur Robert Martino pour l'aide qu'il m'a apporté tout au long de ces trois ans.

Je tiens également à remercier plusieurs personnes de l'Institut de recherche Pierre Fabre, notamment Christian Filaquier et Richard Pena pour m'avoir encadrée pendant ces trois ans. Mais mes remerciements vont également à Hubert Lochard, Christel Fiorini, Bruno David, Yong Jiang et Camille Larrouquet pour leur contribution lors de cette thèse.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de mon jury de thèse, dont particulièrement les professeurs Stéphane Viel et Nathalie Azaroual pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit.

Mes remerciements vont également aux équipes des différents laboratoires avec lesquels j'ai eu plaisir à collaborer : l'équipe de H. Rebière (Afssaps), de C. Barbas (université San Pablo de Madrid) et de P.Girard (Swissmedic).

Je tiens à saluer l'ensemble des personnes des services communs d'analyse : Catherine Claparols, Nathalie Martins et Valérie Bourdon (spectrométrie de masse), Chantal Zedde et

Isabelle Fabing (HPLC), Corinne Routaboul (spectrométrie IR) et tout particulièrement Marc Vedrenne et Pierre Lavedan (RMN). J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous.

J'ai également une pensée pour tous les stagiaires qui ont participé aux activités du groupe, et tout particulièrement William Tchen avec qui j'ai apprécié de partager un coin de paillasse et Thomas Cruz pour ses gâteaux exquis. Je leur souhaite bon courage pour la suite.

Enfin, qu'il me soit permis de dédier ce mémoire à mes amis (pour les moments craquages) et aux membres de ma famille, en particulier à mes parents, mes grands-parents, mes frangins et leur petite famille et à mon mari Benoit. L'attention et le soutien de tous les instants dont ils ont fait preuve à mon égard ont été pour moi un encouragement constant. Ils mériteraient des lignes, des chapitres, des livres entiers...

Sommaire

<i>Remerciements</i>	3
<i>Sommaire</i>	5
<i>Liste des abréviations</i>	9
<i>Introduction générale</i>	11
Partie I - RMN DOSY	13
I) Etat de l'art sur la RMN DOSY	15
I.1) La diffusion	15
I.1.1) Historique	15
I.1.2) Diffusion	16
I.2) Les séquences RMN	16
I.2.1) La première séquence.....	16
I.2.2) La relaxation	18
I.2.3) Courants de Foucault.....	19
I.2.4) L'optimisation d'une séquence	21
I.3) Le passage à la seconde dimension de l'expérience DOSY	23
I.4) Les traitements de spectre	24
I.4.1) Les techniques univariées.....	25
I.4.2) Les techniques multivariées	26
I.4.3) Choix de la méthode de traitement des spectres.....	27
I.5) Les domaines d'application	28
I.5.1) Détermination de la taille d'une molécule	28
I.5.2) Interaction	29
I.5.2.1) Etude de micelles.....	29
I.5.2.2) Etudes d'interaction protéines ligands.....	30
I.5.3) Etude de mélanges complexes.....	31
I.5.3.1) Des composés de masses différentes	31
I.5.3.2) Des composés de même masses	33
I.5.3.3) Suivi d'une réaction.....	34
II) La RMN DOSY ¹H, les médicaments et les compléments alimentaires	36
II.1) Les techniques analytiques pour la détection des contrefaçons de médicaments ou de compléments alimentaires adultérés	38
II.1.1) Les premières approches	38
II.1.2) Les méthodes chromatographiques	42
II.1.3) Les méthodes spectroscopiques	43

II.2) Etude de formulations amaigrissantes	47
II.2.1) Sibutral®.....	47
II.2.1.1) Matériels et méthodes	47
II.2.1.2) Résultats et discussions	50
II.2.2) Compléments alimentaires.....	53
II.3) Autres formulations.....	68
II.3.1) Matériels	68
II.3.2) Mode opératoire.....	69
II.3.3) Résultats et discussion	70
II.3.4) Formulation 3.....	85
II.4) Conclusion	95
III) La RMN DOSY ¹H et les cyclodextrines	97
III.1) Etat de l'art	97
III.1.1) Les cyclodextrines	97
III.1.1.1) La structure	97
III.1.1.2) Les propriétés complexantes.....	98
III.1.1.3) Les domaines d'application dans le milieu pharmaceutique.....	100
III.1.1.3.1) L'augmentation de la stabilité.....	100
III.1.1.3.2) Le masquage du goût et de l'odeur	101
III.1.1.3.3) L'augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité	101
III.1.1.3.4) La diminution des effets indésirables.....	101
III.1.1.3.5) Le ciblage moléculaire	102
III.1.2) Les complexes d'encapsulation par des cyclodextrines.....	102
III.1.2.1) Les techniques d'encapsulation	102
III.1.2.2) Les techniques d'analyses des complexes	104
III.1.2.2.1) A l'état liquide	105
III.1.2.2.1.1) La RMN	105
III.1.2.2.1.2) Le diagramme de solubilité	106
III.1.2.2.1.1) La spectroscopie UV	108
III.1.2.2.1.2) La spectrométrie de masse	109
III.1.2.2.1.3) La microcalorimétrie	109
III.1.2.2.1.4) La fluorimétrie.....	109
III.1.2.2.1.5) La solubilité différentielle	110
III.1.2.2.2) A l'état solide	111
III.1.2.2.2.1) La diffraction des rayons X	111
III.1.2.2.2.2) L'analyse thermique différentielle (DSC)	111
III.1.2.2.2.3) La microscopie	112
III.1.2.2.2.4) Les spectroscopies vibrationnelles: FT-IR et Raman	113
III.1.2.2.3) Caractéristiques d'un complexe	114
III.1.2.2.3.1) La méthode de Job.....	114

III.1.2.2.3.2) La technique de Benesis-Hildebrand.....	115
III.1.2.2.4) Etude des complexes par RMN DOSY ¹ H.....	116
III.1.2.2.4.1) Complexe de stœchiométrie 1 : 1	116
III.1.2.2.4.2) Complexes de stœchiométrie 1 : 2.....	118
III.1.2.3) Les agents ternaires.....	119
III.2) Analyse d'encapsulation de principe actif	120
III.2.1) Objectif.....	120
III.2.2) Mise au point expérimentale.....	122
III.2.2.1) Choix du solvant	122
III.2.2.2) Etude de la viscosité	127
III.2.2.2.1) Rhéométrie	128
III.2.2.2.2) RMN DOSY ¹ H	128
III.2.2.2.3) Conclusion	129
III.2.2.3) Vérification de la relation de proportionnalité entre la masse molaire du système étudié et le coefficient de diffusion	130
III.2.2.4) Mesure du taux d'encapsulation	135
III.2.3) Etude de l'ibuprofène	137
III.2.3.1) Etude des complexes IC, ICA et ICL.....	137
III.2.3.2) Comparaison des mélanges physiques et des complexes obtenus par CO ₂ supercritique.....	145
III.2.3.3) Etude de l'effet pH lors de l'ajout d'agents ternaires.....	146
III.2.4) Etude de la molécule X.....	151
III.2.5) Conclusion.....	152
III.3) Matériels et méthodes	153
III.3.1) Matières premières utilisées	153
III.3.1.1) Les principes actifs :	153
III.3.1.2) Les complexes :	153
III.3.1.3) Les mélanges :	153
III.3.1.4) Les cyclodextrines et les agents ternaires :	154
III.3.1.5) Autres produits :	154
III.3.2) Préparation des échantillons	154
III.3.3) Spectroscopie RMN.....	157
III.3.3.1) Spectres RMN ¹ H	157
III.3.3.2) RMN DOSY ¹ H	158
III.3.3.3) RMN ROESY ¹ H- ¹ H	158
III.3.3.4) Autres expériences RMN.....	159
III.3.4) Spectroscopie UV	160
III.3.5) Rhéomètre	161
Partie II - Analyse d'extraits de plantes par RMN métabolomique.....	163

I) Etat de l'art	165
I.1) Introduction	165
I.2) Quelques définitions	166
I.3) Préparation des échantillons.....	167
I.4) L'analyse RMN ¹H.....	169
I.5) Le traitement des données.....	172
I.6) Les domaines d'application.....	173
II) Evaluation de la qualité du Magnolia Officinalis cortex par une analyse RMN métabolomique.....	178
<i>Conclusion générale</i>	<i>189</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>191</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>199</i>
<i>Liste des tableaux.....</i>	<i>202</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>203</i>

Liste des abréviations

Résonance magnétique nucléaire :

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

COSY : COrrrelation SpectroscopY

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

DOSY : Diffusion Ordered SpectroscopY

LED : Longitudinal Eddy current Delay

STE : STimulated Echo

ROESY : Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY

TSP : sodium 3-(trimethylsilyl)tetradeuteriopropionate

DECRA : Direct Exponential Curve Resolution Algorithm

CORE : COmponent REsolved

MCR : Multivariate Curve Resolution

Autres techniques analytiques

MS : Spectrométrie de Masse

HLPC : Chromatographie Liquide Haute Performance

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

UV : Ultra-Violet

DAD : Diode Array Detector

ELSD : Evaporative Light Scattering Detector

FLD : Fluorescence Laser Detector

RID : Refractive Index Detector

DART : Direct Analysis in Real Time

ASAP : Atmospheric pressure Solid Analysis Probe

DESI : Desorption ElectroSpray Ionisation

Echantillons :

ICL : complexe Ibuprofène- β -Cyclodextrine-Lysine

ICA : complexe Ibuprofène- β -Cyclodextrine-Arginine

IC : complexe Ibuprofène- β -Cyclodextrine

Statistique :

ACP : Analyse en Composantes Principales

CP : Composantes Principales

PLS-DA : Partial Least Squares-Discriminant Analysis

OPLS-DA : Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis

Autres abréviations :

CMC : Concentration Micellaire Critique

PEG : PolyEthylène Glycol

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDE-5 : PhosphoDiEstérase-5

Introduction générale

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a été découverte en 1945 par deux groupes de physiciens américains indépendants dirigés par Purcell (Université de Harvard) et Bloch (Université de Stanford). Leurs travaux leur valurent conjointement le Prix Nobel de Physique en 1952. La RMN a initialement été une méthode physique d'investigation des propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Mais les chimistes ont rapidement été convaincus de l'importance de cette technique lorsque Proctor et Dickinson en 1950 ont découvert le phénomène de déplacement chimique. En 1951, Gutowsky et McCall et indépendamment Hahn et Maxwell mettent en évidence les interactions spin-spin. Ces découvertes ont montré la sensibilité de la fréquence de résonance à l'environnement électronique des noyaux et ont ainsi fait de la RMN un instrument majeur de la chimie structurale (Goldman, 2004). Depuis son invention, elle a connu de nombreuses avancées lui permettant désormais de trouver des applications dans le domaine de la chimie, de la biologie structurale et de la médecine.

Dans ce mémoire, nous nous attacherons à montrer que la spectroscopie RMN pourrait devenir un outil important pour le contrôle et l'analyse de formulations pharmaceutiques. En effet, les médicaments doivent être sûrs, efficaces et d'une qualité constante afin de produire l'effet thérapeutique attendu. La RMN, et celle du proton en particulier, permet d'obtenir l'empreinte spectrale complète d'un échantillon sans se limiter au principe actif et c'est la non-spécificité de cette méthode d'analyse qui en fait son intérêt. Les travaux présentés ici ont consisté à analyser la formulation brute après une simple mise en solution dans un solvant deutéré et donc sans réaliser de séparations chromatographiques préalables. Les spectres RMN ainsi obtenus peuvent être complexes et donc difficiles à interpréter. Cependant, pour faire ressortir une information pertinente, nous avons envisagé deux approches :

- la RMN Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) où chaque constituant peut être « virtuellement » séparé des autres du fait des différences de leurs coefficients de diffusion.
- l'approche métabolomique pour laquelle les spectres RMN sont traités par des outils d'analyses statistiques dans le but de mettre en évidence les différences entre une série d'échantillons de composition proche.

L'objectif de mes travaux de thèse a été de montrer la potentialité de la RMN pour traiter de problématiques analytiques pouvant intéresser l'industrie pharmaceutique. Trois axes, définis en concertation avec les laboratoires Pierre Fabre, ont été abordés :

Le premier thème porte sur l'analyse de médicaments contrefaits et de compléments alimentaires adultérés. La RMN DOSY a été utilisée comme un outil analytique permettant d'avoir une information globale sur le médicament (principes actifs et excipients) et obtenir ainsi une empreinte spectrale de l'échantillon.

Le second axe a trait à la caractérisation structurale par RMN DOSY d'entités formées par encapsulation de principes actifs dans des cyclodextrines.

Enfin, le dernier thème est orienté vers la Phytopharmacie. Les extraits végétaux sont constitués de molécules très diverses en terme de structure chimique. Compte tenu de la complexité de ces milieux, les spectres RMN sont particulièrement difficiles à interpréter. C'est la raison pour laquelle, dans cette partie, j'ai utilisé une approche métabolomique par RMN du proton.

Partie I - RMN DOSY

I) Etat de l'art sur la RMN DOSY

I.1) La diffusion

I.1.1) Historique

Le phénomène d'autodiffusion appelé aussi le mouvement brownien a été observé pour la première fois par Robert Brown, au XVIII^{ème} siècle. Ce botaniste écossais constate en observant au microscope le pollen d'une fleur, appelée *Clarkia pulchella*, la présence de petites particules bougeant de façon chaotique. Ce phénomène a été par la suite étudié par d'éminents physiciens. En 1877, Delsaux suggère que le mouvement brownien résulte de l'ensemble des chocs exercés par les molécules d'eau sur les particules. Albert Einstein en 1905 et indépendamment, Marian Smoluchowski en 1906, proposent une théorie complète et unifiée du mouvement brownien. Le mouvement brownien est dû aux innombrables collisions entre les particules et les molécules du fluide environnant. Il faudra attendre jusqu'à 1912 pour que Jean Perrin dessine la trajectoire d'une particule en suspension dans l'eau en l'observant au microscope. Il obtient une ligne chaotique sans direction dans l'espace privilégié (Figure 1) (Van Der Pas, 1866) (Rivet, et al., 1997).

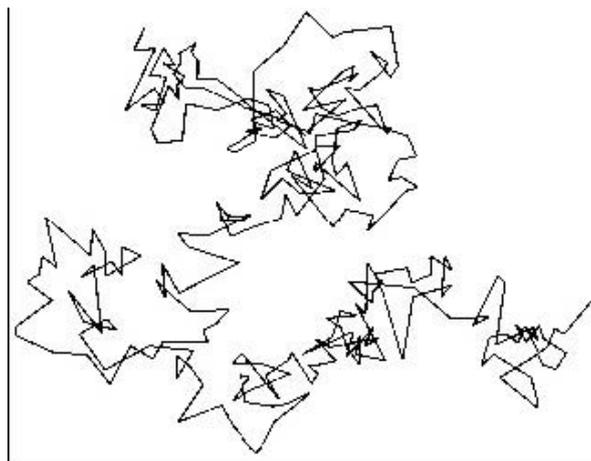


Figure 1. Mouvement brownien d'une particule microscopique en suspension dans l'eau. (D'après un dessin de Jean Perrin).

1.1.2) Diffusion

La diffusion, l'autodiffusion ou encore le mouvement brownien est donc le mouvement translationnel aléatoire des molécules ou des ions. Ce mouvement est conduit par l'énergie interne du système et dépend notamment de la taille du diffusant et de la température. Il peut être caractérisé par le coefficient de diffusion selon l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

Équation 1

D : Coefficient de diffusion

T : Température

η : Viscosité dynamique

R_H : Rayon hydrodynamique de la molécule considérée sphérique

k : Constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

1.2) Les séquences RMN

1.2.1) La première séquence

La possibilité d'utiliser la RMN pour mesurer la diffusion des molécules en solution a été initialement décrite en 1965 par Stejskal et Tanner sous la forme d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE, Pulse Field Gradient Spin Echo) illustrée Figure 2 (Stejskal, et al., 1965).

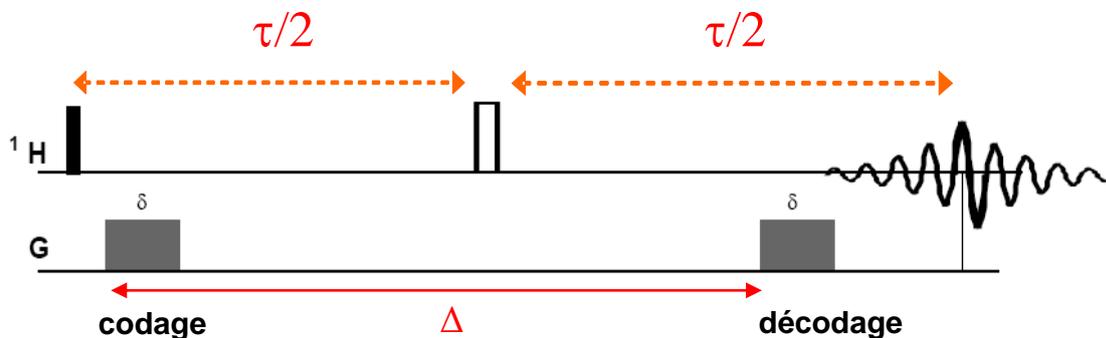


Figure 2. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE).

Dans cette séquence, après avoir basculée l'aimantation dans le plan transversal à l'aide d'une excitation de 90° , un gradient de champ magnétique pulsé (PFG) de durée δ est appliqué. En procédant ainsi, on obtient la dépendance spatiale du degré de déphasage. Une impulsion RF à 180° est ensuite appliquée afin de changer le signe du déphasage. Puis une seconde impulsion de gradient présentant les mêmes caractéristiques que la première est appliquée. Et enfin, il y a l'acquisition du signal.

Si les spins sont stationnaires durant le délai de diffusion qui sépare les deux PFG, alors le codage et le décodage spatial des phases se compensent comme c'est présenté dans la Figure 3. L'intensité du signal résultant est alors maximale avec une amplitude seulement gouvernée par la relaxation T_2 .

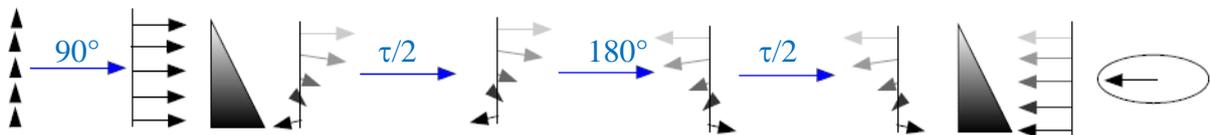


Figure 3. Représentation de l'aimantation lors d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE) avec une diffusion nulle.

Toutefois, les molécules en solution subissent des mouvements Browniens et la position des spins le long de l'axe de gradient change au cours de l'intervalle Δ , entraînant un décalage des phases codées et décodées par les deux PFG comme le montre la Figure 4. Ce décalage de phase est détecté et mesuré par l'atténuation de l'intensité de l'écho de spin résultant.

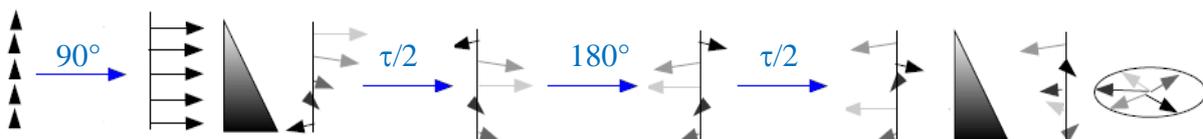


Figure 4. Représentation de l'aimantation lors d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE) avec une diffusion.

Dans le cas d'une diffusion isotrope dans des liquides, l'atténuation de l'intensité du signal est une fonction exponentielle du coefficient de diffusion. Elle est décrite par l'équation de Stejskal-Tanner :

$$I = I_1 e^{\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right)^*} e^{[-\gamma^2 g^2 D \delta^2 * (\Delta - \frac{\delta}{3})]}$$

Équation 2

$$I = I_0 e^{(-s D)}$$

Équation 3

Avec :

$$s = \gamma^2 g^2 \delta^2 * \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right)$$

Équation 4

I_1 : Intensité du signal immédiatement après l'impulsion d'excitation de 90°

2τ : Temps d'écho total

T_2 : Temps de relaxation spin-spin des molécules (s)

γ : Rapport gyromagnétique du noyau observé (rad.G⁻¹.s⁻¹)

g : Force du gradient (G.cm⁻¹)

D : Coefficient de diffusion moléculaire (cm².s⁻¹)

δ : Durée d'application du gradient (s)

Δ : Délai de diffusion (s), délai entre les deux PFG

I_0 : Intensité initiale du signal

1.2.2) La relaxation

Lors d'une impulsion, l'aimantation est basculée dans le plan xy perpendiculaire à B_0 puis elle revient progressivement à l'équilibre. On dit que les spins relaxent. Il existe deux types de relaxation : la relaxation transversale et la relaxation longitudinale. La relaxation longitudinale T_1 caractérise le temps nécessaire à la réapparition de l'aimantation sur l'axe z c'est-à-dire à son équilibre. La relaxation transversale T_2 caractérise le temps nécessaire à la disparition de l'aimantation dans le plan xy.

Lors de la première impulsion, l'aimantation est basculée dans le plan xy perpendiculaire à B_0 puis elle revient progressivement à l'équilibre avec un temps de relaxation T_2 (relaxation transversale). Ce temps de relaxation définit le temps de signal. Or T_2 est généralement court ce qui contraint l'expérimentateur à utiliser des délais de diffusion courts.

En 1970, Tanner a proposé d'utiliser la séquence d'écho de spin stimulé à la place de la simple séquence d'écho de spin pour pallier aux problèmes de relaxations. La séquence d'écho de spin stimulé à gradients de champs pulsés, aussi appelée PFG-STE (Pulsed Field

Gradient Stimulated Echo) est présentée dans la Figure 5.

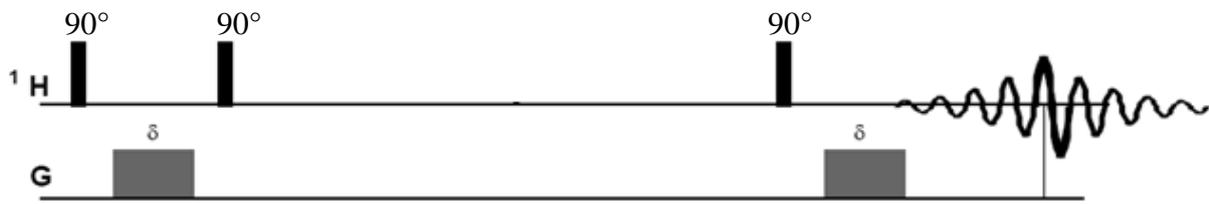


Figure 5. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé à gradients de champs pulsés (PFG-STE).

Dans cette séquence, l'impulsion 180° entre les deux gradients est remplacée par deux impulsions 90° , l'une peu après le premier gradient et l'autre peu avant le second gradient. Le principal avantage de cette séquence vient du fait que la seconde impulsion 90° bascule la magnétisation selon l'axe z . La relaxation des spins est alors longitudinale au lieu d'une relaxation transversale dans la séquence PFG-SE. Elle permet donc à l'utilisateur d'allonger le délai de diffusion (Δ) puisque les temps de relaxation transversale (T_2) sont dans la grande majorité des cas plus courts que les temps de relaxation longitudinale (T_1). De plus, la séquence d'écho stimulé permet également de s'affranchir de distorsions dans le spectre dues aux effets des couplages (Johnson, 1999).

1.2.3 Courants de Foucault (Johnson, 1999) (Wu, et al., 1995)

L'emploi des gradients de champs est responsable de l'apparition d'une force électromotrice à l'intérieur de la bobine. Cette force électromotrice induit des courants appelés courants de Foucault dans la masse conductrice. Ces courants créent un champ magnétique qui d'après la loi de Lenz, s'oppose à la cause de la variation du champ extérieur. Les courants de Foucault peuvent entraîner l'apparition d'artéfacts sur les spectres. De plus, ils provoquent également un échauffement par effet Joule. Une petite variation de température dans l'échantillon suffit à entraîner des phénomènes de convection. La Figure 6 schématise ce phénomène. Lorsqu'une molécule est chauffée (représentée sur le schéma par les sphères rouges), elle se dilate et devient moins dense. Sous l'effet de la poussée d'Archimède, elle se déplace verticalement. S'éloignant de la source de chaleur, elle se refroidit et redevient plus dense, elle retombe. Ces mouvements de convection deviennent alors le phénomène dynamique majoritaire dans le tube ce qui empêche la mesure de diffusion.

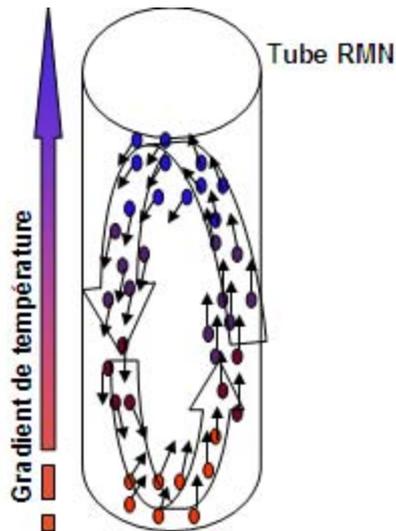


Figure 6. La convection dans un tube RMN

Deux méthodes ont été proposées principalement pour diminuer les courants de Foucault. La première méthode consiste à allonger le délai entre la dernière impulsion de gradient et l'enregistrement de l'écho du signal (Morris, et al., 1992). Pour cela, une quatrième impulsion à 90° est réalisée après le deuxième gradient de champ (Figure 7). Elle permet de conserver l'aimantation dans la direction longitudinale pendant que les courants de Foucault s'affaiblissent. Après un délai LED (Longitudinal Eddy current Delay), l'aimantation est basculée dans le plan transversal par l'intermédiaire d'une cinquième impulsion à 90° permettant l'acquisition du signal.



Figure 7. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé à gradients de champs pulsés avec un délai LED (LED-STE, longitudinal eddy current -Pulse Field Gradient Stimulated Echo).

La seconde méthode est représentée Figure 8. Elle consiste à utiliser des paires de gradients bipolaires. L'idée est de remplacer chaque impulsion de gradient par deux gradients d'intensité divisée par deux, de différentes polarités et séparés d'une impulsion RF 180° . En procédant ainsi, le gradient effectif reste identique mais cette série d'impulsions permet de minimiser les courants de Foucault.

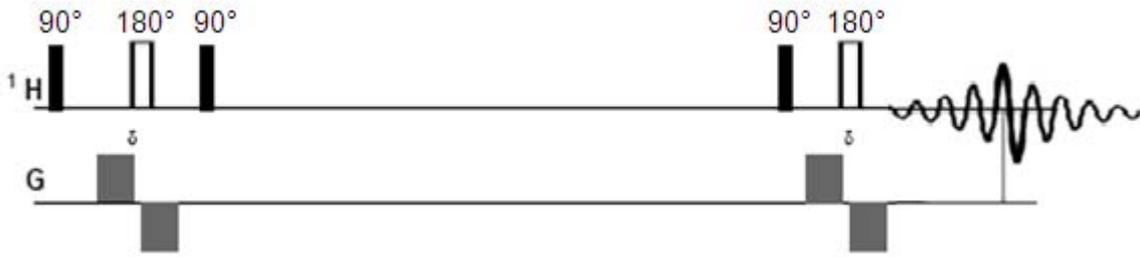


Figure 8. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé avec des gradients de champs pulsés bipolaires (STE-Bipolaire Gradient Pulses).

Il est à noter que lorsque cette dernière séquence est employée, l'équation de Stejskal-Tanner décrivant l'atténuation du signal est légèrement modifiée pour tenir compte du délai expérimental τ permettant de changer la polarité des gradients. Le facteur s de l'Équation 3 devient alors (Wu, et al., 1995):

$$s = \gamma^2 g^2 \delta^2 * \left(\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2} \right)$$

Équation 5

Pour mes travaux, j'ai utilisé majoritairement la séquence LED-STE-Bipolaire Gradient Pulse avec des gradients de purge pour éliminer d'éventuels artéfacts lorsque l'aimantation est sur l'axe z, comme présentée ci-dessous.

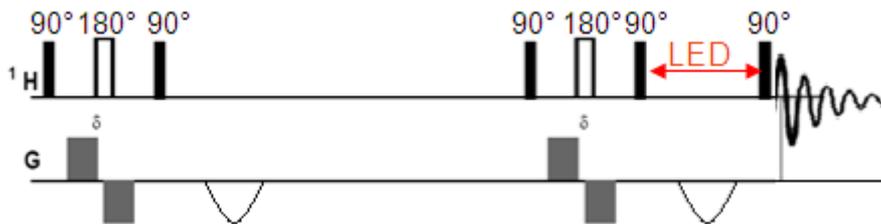


Figure 9. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé avec des gradients de champs pulsés bipolaires avec un délai LED (LED-STE-Bipolaire Gradient Pulses).

Pour des échantillons où le signal de l'eau est important, une pré-saturation de ce signal est ajoutée à la séquence.

1.2.4) L'optimisation d'une séquence

Afin de réaliser une mesure des coefficients de diffusion, il est nécessaire d'optimiser certains paramètres de la séquence, notamment le délai de diffusion Δ et la durée du gradient δ (Cobas, et al., 2005).

Trois cas sont alors possibles :

- ces paramètres sont trop faibles : figure A. Les molécules n'ont pas beaucoup diffusé ce qui entraîne une faible atténuation des signaux.
- ces paramètres sont trop élevés : figure B. Les molécules ont beaucoup diffusé ce qui entraîne une forte atténuation des signaux voire une totale disparition des signaux.
- ces paramètres sont bien optimisés : figure C.

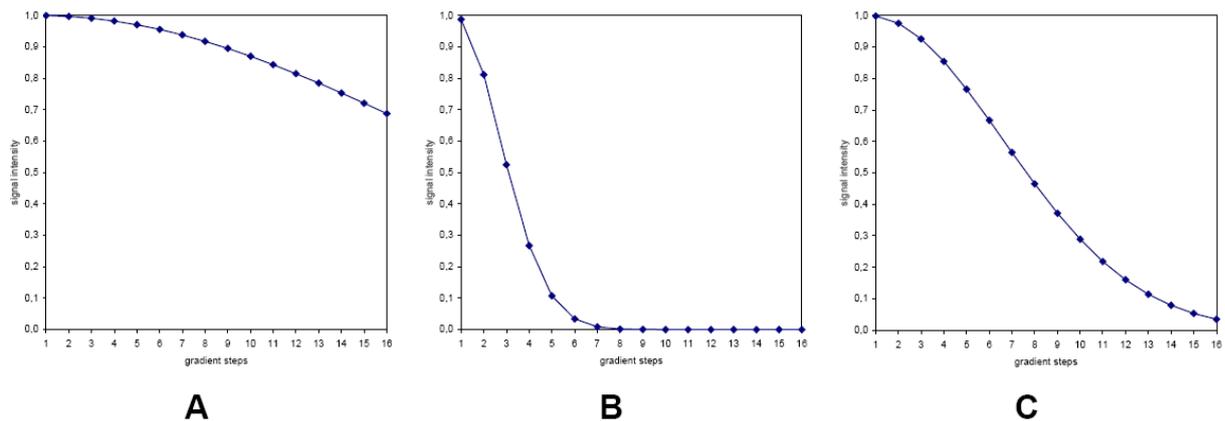


Figure 10. Simulation de l'atténuation du signal en fonction de l'intensité du gradient allant de 5 à 95 % avec différentes optimisations. Les valeurs du temps de diffusion et de la durée du gradient sont : A trop faibles, B trop élevées et C bien optimisées.

Pour les optimiser, il est nécessaire de faire quelques expériences 1D. La première expérience 1D est réalisée avec un gradient de 10 % d'amplitude. La seconde expérience est réalisée avec un gradient de 90 % d'amplitude. Le délai de diffusion Δ et la durée du gradient δ doivent être optimisés tel que le ratio des intensités des deux spectres soit égal à 50.

Pour les grosses molécules, ou dans les milieux visqueux, de faibles diffusions sont observées, il faudra donc augmenter les valeurs du délai de diffusion Δ et de la durée du gradient δ . Inversement, pour les petites molécules, ou dans des milieux peu visqueux, de fortes diffusions sont observées, il faudra donc diminuer les valeurs du délai de diffusion Δ et de la durée du gradient δ .

Cependant cette optimisation peut être plus délicate à faire pour des mélanges de composés ayant des coefficients de diffusion très différents. La figure ci-dessous représente la décroissance des signaux de trois molécules.

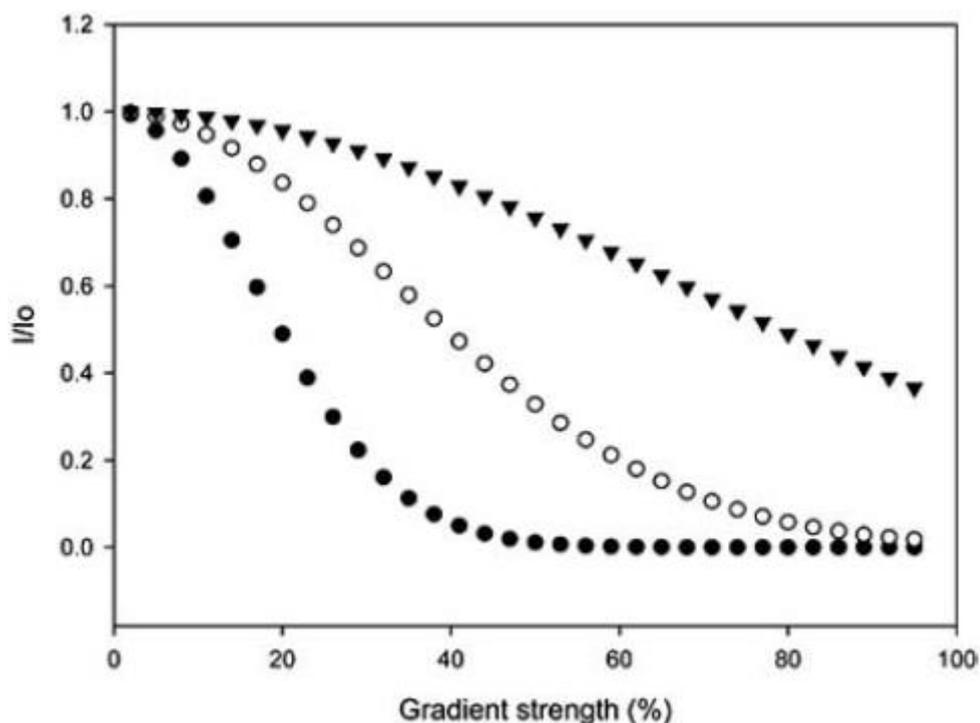


Figure 11. Courbe de l'atténuation de l'intensité relative de trois molécules (en cercles noirs : le solvant HOD 20 Da, en cercles vides : un monomère 200 Da, en triangle : un polymère 20 KDa) en fonction de l'intensité du gradient. (Cobas, et al., 2005)

La première courbe (●) correspond au signal du solvant HOD. Pour une intensité de gradient de 68 %, le signal du solvant est déjà atténué de plus de 99,9 %. Les valeurs du délai de diffusion Δ et de la durée du gradient δ sont ici trop élevées. La seconde courbe (○) représente la décroissance des signaux d'un monomère de 200 Da. La courbe a une belle décroissance, les valeurs du délai de diffusion Δ et de la durée du gradient δ sont bien optimisées. La dernière courbe (▲) caractérise l'atténuation des signaux d'un polymère de 200 Da. L'atténuation des signaux est faible (40 % pour une intensité de gradient de 68 %), les valeurs du délai de diffusion Δ et de la durée du gradient δ ne sont pas assez élevées. Il est alors important d'optimiser les paramètres sur les molécules que l'on souhaite observer.

I.3) Le passage à la seconde dimension de l'expérience DOSY

Généralement, l'acquisition d'une expérience DOSY ^1H consiste à collecter une série de spectres avec une des séquences présentées ci-dessus en augmentant linéairement l'amplitude des impulsions de gradient. L'intensité des signaux recueillie pour chaque espèce moléculaire diffusante de l'échantillon, est atténuée exponentiellement selon l'équation 3. Étant donné que le rapport gyromagnétique, le délai de diffusion entre les deux gradients, l'intensité et la durée d'application des gradients sont identiques pour tous les composants de

l'échantillon, le facteur s est une constante. L'atténuation des signaux ne dépend donc que du coefficient de diffusion D de chacune des espèces. Le coefficient de diffusion étant inversement proportionnel au rayon hydrodynamique des molécules considérées comme sphériques, une molécule de grosse taille aura une plus faible diffusion et donc une atténuation des signaux moins importante sera observée que pour une molécule de plus petite taille comme illustrée sur la Figure 12.

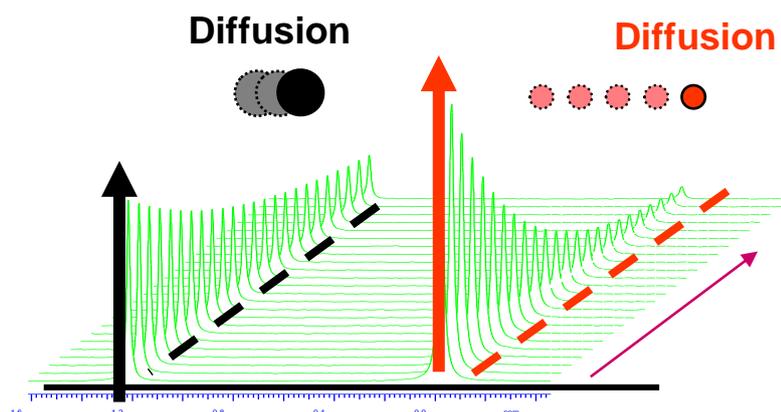


Figure 12. Atténuation des signaux avec l'augmentation du gradient.

Dès lors, une analyse de la décroissance exponentielle des signaux en fonction de s permet d'estimer le coefficient de diffusion des espèces moléculaires présentes.

En 1992, Morris et Johnson ont élargi le champ d'application de cette technique en proposant une nouvelle expérience bidimensionnelle pour la mesure de diffusion par RMN qu'ils nomment DOSY (pour Diffusion Ordered SpectroscopY). Les spectres obtenus ont donc deux dimensions ; une dimension présentant les déplacements chimiques et l'autre dimension comportant les coefficients de diffusion des espèces présentes en solution.

I.4) Les traitements de spectre

La RMN DOSY ^1H n'est pas une nouvelle technique d'analyse cependant cette technique a connu un essor sur la dernière décennie. L'évolution des systèmes informatiques permettent aujourd'hui de traiter rapidement un spectre RMN DOSY ^1H . L'approche plus simple pour traiter un spectre RMN DOSY ^1H consiste à ajuster les paramètres de la fonction de Stejskal-Tanner, Équation 3.

Cette approche peut se faire par la méthode non linéaire des moindres carrés à l'aide de l'algorithme de Levenberg-Marquadt. Simple et directe, elle est efficace pour des pics bien

résolus. Cependant, l'analyse par simple ajustement échoue quand les signaux de plusieurs composés ayant des coefficients de diffusion différents se superposent. Cette situation se produit souvent lors de l'analyse de mélanges. Ainsi l'approche la mieux adaptée à l'analyse de mélanges met en œuvre une analyse multiexponentielle. Il existe deux principales techniques pour traiter une analyse multiexponentielle :

- les techniques univariées
- les techniques multivariées

La première méthode traite les signaux indépendamment et permet d'obtenir un spectre à deux dimensions. Dans la première dimension, on retrouve le spectre 1D proton et dans la deuxième dimension, les coefficients de diffusion. La seconde méthode traite les signaux ou une partie des signaux simultanément et permet d'obtenir les spectres 1D extraits.

1.4.1) Les techniques univariées

Lors d'une décroissance multiexponentielle, l'équation de Stejskal-Tanner devient (Cobas, et al., 2005) :

$$I(s) = \int_0^{\infty} I_0(D) e^{(-Ds)} dD$$

Équation 6

Cette équation correspond à la transformée de Laplace. En principe, la transformée inverse de Laplace permet d'obtenir les coefficients de diffusion. Malheureusement, mathématiquement, la transformée inverse de Laplace possède une infinité de solutions. Il existe quelques stratégies pour restreindre le nombre de solutions telles que les méthodes DISCRETE, SPLMOD (two single channel methods), NLREG et le programme (CONTINUous diffusion coefficient) CONTIN. L'inconvénient de ces techniques est la résolution des spectres obtenus.

Une autre approche pour résoudre la transformée inverse de Laplace est basée sur la méthode d'entropie maximale (Delsuc, et al., 1998). Dans cette approche, la transformée inverse de Laplace est implémentée par un algorithme itératif initialisé à partir d'une estimation du profil de diffusion (habituellement un spectre plat), et qui converge vers la solution par des modifications successives de l'estimation courante. Ainsi, la transformée de Laplace du profil de diffusion (en D) estimée, permet de calculer une décroissance théorique qui est comparée aux données expérimentales. C'est en fait la dérivée première de la distance

mathématique entre la décroissance mesurée et théorique qui fournit le gradient d'erreur utilisé pour générer l'estimation suivante du profil de diffusion. L'algorithme réitère cette procédure jusqu'à ce que la différence entre les décroissances théorique et mesurée soit, par exemple, inférieure ou égale à la valeur de bruit mesurée. Cet algorithme permet donc d'explorer l'ensemble des solutions possibles de la transformée inverse de Laplace. La solution finale présentée par l'algorithme correspond au profil de diffusion le plus simple. C'est cette recherche de la simplicité (ou l'entropie maximum) qui assure à cette approche une grande robustesse face aux artéfacts de mesure ou aux forts niveaux de bruit. Pour finir, on peut remarquer que cette approche n'impose aucun modèle particulier aux données mesurées (mono exponentielle, somme d'exponentielles, distribution gaussienne, etc.) ni aucune contrainte sur les valeurs de gradient utilisées ; limitations que l'on trouve dans les autres méthodes d'analyse basées sur un ajustement.

1.4.2) Les techniques multivariées

La base des analyses multivariées est de représenter les données expérimentales DOSY $X(f,g)$ comme une fonction de la fréquence et de l'intensité du gradient g .

$$I(f, g) = \sum_{i=1}^M S_0^i(f) C^i(g)$$

Équation 7

Cette fonction est construite pour M composés $S_0^i(f)$ et pour des atténuations $C^i(g)$ qui varient continuellement afin de minimiser l'écart entre $I(f,g)$ et $X(f,g)$. Cette équation peut être représentée de manière matricielle :

$$X = CS^T + E$$

Équation 8

C : Atténuation, matrice de dimension $ng*nc$

S : Composantes du spectre, matrice de dimension $nc*nf$

E : Bruit, matrice de dimension $ng*nf$

X : Données, matrice de dimension $ng*nf$

ng : Nombre des différentes intensités de gradient

nf : Nombre de points dans le spectre RMN

nc : Nombre de composés

Il existe un grand nombre de solutions possibles à cette équation et la simple méthode des moindres carrées devient impossible à utiliser dans ce cas. On utilise alors des méthodes indirectes appelées méthodes multivariées (Cobas, et al., 2005) (Huo, et al., 2007) (Nilsson, et al., 2006) (Nilsson, et al., 2007) (Nilsson, et al., 2008) (Nilsson, 2009). Il existe plusieurs méthodes multivariées :

- DECRA = Direct Exponential Curve Resolution Algorithm
- CORE = COmponent REsolved
- MCR = Multivariate Curve Resolution

Elles possèdent chacune des avantages et des inconvénients. Par exemple, DECRA est une technique de traitement de spectre très rapide mais elle nécessite une atténuation de l'intensité des signaux strictement exponentielle. Or il est impossible de construire des bobines avec des gradients spatialement uniformes ce qui entraîne une déformation de la décroissance des signaux. De plus, les échantillons polydisperses n'ont pas un coefficient de diffusion discret mais une distribution continue et par conséquent l'atténuation des signaux n'est plus exponentielle. Le CORE demande en amont la forme de l'atténuation des signaux. Il est alors possible de l'adapter pour des échantillons polydisperses ou d'appliquer des coefficients correctifs à l'équation de Stejskal-Tanner. Cependant, le temps de traitement est relativement long et ce même avec un ordinateur performant. Le MCR permet également de traiter les échantillons dont l'atténuation du signal n'est pas strictement exponentielle mais il s'agit d'une méthode difficile à mettre en place. Un autre inconvénient inhérent à toutes les méthodes multivariées est qu'elles nécessitent des données d'entrées telles que le nombre de composés présents dans l'échantillon ce qui est parfois difficile à estimer en amont et est impossible à préciser si la composition du mélange est inconnue.

1.4.3) Choix de la méthode de traitement des spectres

Pour mes travaux, j'ai choisi d'utiliser un traitement par entropie maximale proposé dans les logiciels Gifa® et NMRnotebook®. Comme nous l'avons vu ci-dessus, il s'agit d'une méthode robuste et applicable à un grand nombre d'échantillons différents car cette

approche n'impose aucun modèle particulier aux données mesurées (mono exponentielle, somme d'exponentielles, distribution gaussienne, etc.) ni aucune contrainte sur les valeurs de gradient utilisées. De plus, elle ne nécessite aucune connaissance préalable de l'échantillon.

1.5) Les domaines d'application

En plus de l'obtention des données classiques de la RMN telles que les déplacements chimiques et les constantes de couplage, la RMN DOSY ^1H est une méthode élégante pour mesurer les coefficients de diffusion des espèces en solution. Elle permet ainsi d'obtenir des informations structurales de par sa dimension RMN conventionnelle mais également des informations physico-chimiques telles que la taille de la molécule ou encore la formation d'agrégats, de polymères, de complexes... Ainsi la RMN DOSY ^1H possède de nombreux domaines d'applications.

1.5.1) Détermination de la taille d'une molécule

D'après l'équation de Stokes-Einstein, la diffusion est proportionnelle au rayon hydrodynamique de la molécule considérée comme sphérique. Connaissant le coefficient de diffusion, la taille de la molécule peut donc être estimée. Cependant, cette équation n'est valable que pour les molécules sphériques. Une autre approche consiste à utiliser une loi empirique pour les polymères en solution très diluée. Cette loi relie le coefficient de diffusion à la masse molaire moyenne en masse selon l'équation suivante :

$$D = K M_w^{-\alpha}$$

Équation 9

D : Coefficient de diffusion

M_w : Masse molaire moyenne en masse

K : Constante dépendante de la nature du polymère

α : Coefficient dépendant de la forme du polymère

Les valeurs de K et α étant dépendantes du polymère, cette équation doit être calibrée pour chaque famille de polymères. De plus, le coefficient de diffusion est sensible à la température et à la viscosité. La courbe de calibration permettant de relier D à M_w se fait donc pour une gamme de concentrations, à une température et un solvant donnés. Cette technique a été utilisée pour caractériser, par exemple, les asphaltènes issus du pétrole brut (Durand, et al.,

2008), des polysaccharides (Viel, et al., 2003), des polyéthylènes (Xu, et al., 2010), des nanoparticules (Canzi, et al., 2011).

1.5.2) Interaction

Lorsque qu'une molécule interagit avec un système de taille plus importante celle-ci voit son coefficient de diffusion fortement diminuer. L'interaction peut se faire par des liaisons covalentes ou non covalentes. La RMN DOSY ^1H permet alors d'observer des phénomènes de micellisations, d'agréations, d'encapsulations de molécules ou encore des interactions ligand-protéines (Smejkalova, et al., 2008). Si le système est dynamique, le coefficient de diffusion observé par RMN DOSY ^1H est une moyenne entre le coefficient de diffusion de la molécule à l'état libre et le coefficient de diffusion de la molécule à l'état lié selon l'équation suivante (Yang, et al., 2010) (Lin, et al., 1995) :

$$D_{\text{obs}} = f_{\text{libre}}D_{\text{libre}} + f_{\text{lié}}D_{\text{lié}}$$

Équation 10

D_{obs} : Coefficient de diffusion observé

f_{libre} : Fraction molaire des molécules sous formes libres

D_{libre} : Coefficient de diffusion des molécules sous formes libres

$f_{\text{lié}}$: Fraction molaire des molécules sous formes liées

$D_{\text{lié}}$: Coefficient de diffusion des molécules sous formes liées

Une autre application de la RMN DOSY ^1H est la caractérisation de complexes d'encapsulations avec des cyclodextrines. Cette partie sera davantage détaillée dans le chapitre III.

1.5.2.1) Etude de micelles

Un paramètre important lors d'une étude de micellisation est la concentration à laquelle les monomères s'auto-organisent pour former des micelles, c'est la concentration micellaire critique (cmc). Cette cmc peut être mesurée en traçant le coefficient de diffusion observé en fonction de la variation de la concentration totale en tensio-actif. La courbe théorique est présentée Figure 13, elle est composée de deux portions de droite.

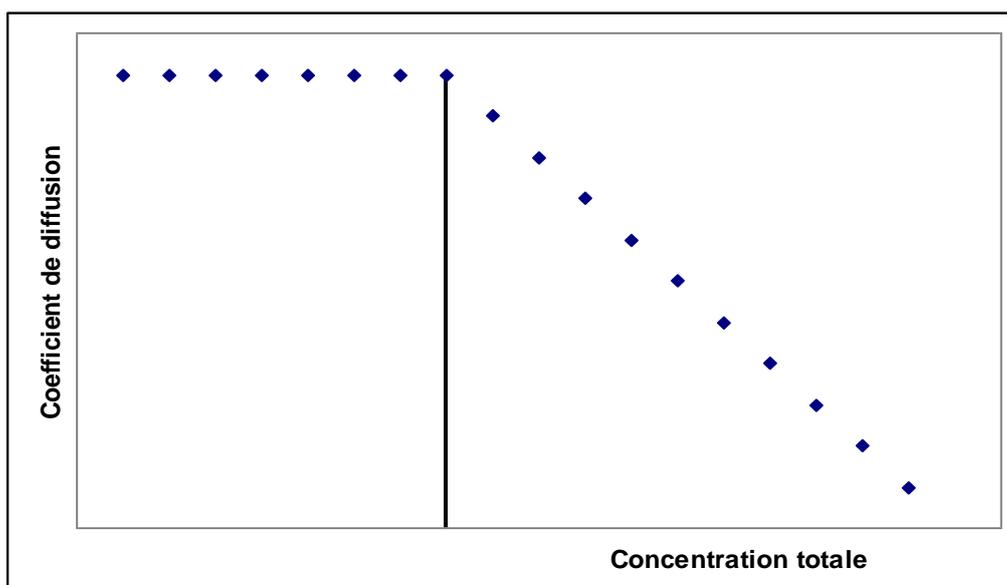


Figure 13. Tracé théorique de la courbe de l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration totale en tensio-actif.

Pour une concentration inférieure à la cmc, le coefficient de diffusion observé est égal au coefficient de diffusion des surfactants à l'état libre : $D_{\text{obs}} = D_{\text{libre}}$. C'est le premier plateau de la courbe.

Pour une concentration supérieure à la cmc, le coefficient de diffusion observé décroît avec l'augmentation de la concentration totale en surfactant (C_{tot}) selon l'équation suivante (Denkova, et al., 2008) :

$$D_{\text{obs}} = D_{\text{lié}} + \left(\frac{\text{cmc}}{C_{\text{tot}}}\right) (D_{\text{libre}} - D_{\text{lié}})$$

Équation 11

1.5.2.2) Etudes d'interaction protéines ligands (Lucas, et al., 2004)

Les interactions de type ligand-protéine contrôlent la majeure partie des phénomènes biologiques (transport des médicaments, inhibition ou augmentation du passage membranaire, déclenchement d'un effet thérapeutique ou secondaire). De ce fait, leur caractérisation est une tâche primordiale. Ces interactions sont réversibles et elles peuvent être décrites quantitativement par une constante appelée constante de dissociation (K_d).

Pour des ligands avec des échanges lents, la constante de dissociation K_d de complexe de stœchiométrie 1 : 1 peut être mesurée par RMN ^1H selon l'Équation 12.

$$K_d = \frac{[L][P]}{[LP]} = I_{\text{libre}} * \frac{[P_{\text{tot}}] - [L_{\text{tot}}] * \frac{I_{\text{lié}}}{I_{\text{libre}} + I_{\text{lié}}}}{I_{\text{lié}}}$$

Équation 12

I_{libre} : Intégration des protons du ligand à l'état libre

$I_{\text{lié}}$: Intégration des protons du ligand à l'état lié

$[P_{\text{tot}}]$: Concentration totale de protéine

$[L_{\text{tot}}]$: Concentration totale de ligand

Cependant, l'échange entre les ligands libres et liés est souvent rapide, ce qui rend impossible la détermination des intégrales. Dans ce cas, la mesure de diffusion par RMN peut être utilisée pour calculer la constante de dissociation de complexe de stœchiométrie 1 : 1 selon l'équation suivante :

$$K_d = [P_{\text{tot}}] * \left(\frac{D_{\text{lié}} - D_{\text{obs}}}{D_{\text{obs}} - D_{\text{libre}}} \right) + [L_{\text{tot}}] * \left(\frac{D_{\text{obs}} - D_{\text{lié}}}{D_{\text{lié}} - D_{\text{libre}}} \right)$$

Équation 13

1.5.3) Etude de mélanges complexes

La deuxième dimension obtenue par RMN DOSY ^1H permet de séparer virtuellement les composés d'un échantillon selon leur coefficient de diffusion. Ainsi on obtient une chromatographie virtuelle des composés sans aucune séparation physique ni dégradation de la formulation.

1.5.3.1) Des composés de masses différentes

Dans de nombreux domaines, l'échantillon à analyser est un mélange de plusieurs composés. Par exemple, les formulations pharmaceutiques sont composées d'un ou plusieurs principes actifs et des différents excipients ; les huiles essentielles sont constituées de centaines de composants, la plupart appartenant à la famille des terpènes ; dans l'agro-alimentaire les agents de saveurs sont mélangés avec des agents de textures comme par exemple les gélifiants, le plasma humain est constitué de nombreux métabolites... Dans tous ces cas, il peut être intéressant d'obtenir une séparation virtuelle de ces composés, en une seule analyse, pour obtenir un éclatement des signaux sur la dimension diffusion facilitant l'identification des différents signaux. Par exemple, la Figure 14 représente le spectre DOSY

^1H d'un échantillon de plasma humain (Balayssac, et al., 2009). La superposition des signaux sur le spectre ^1H rend difficile l'identification des métabolites. Le spectre DOSY ^1H permet alors une séparation virtuelle des petits métabolites tels que l'arginine ou la valine, des différentes protéines de masse plus élevée. L'identification des composés est alors simplifiée.

De plus, les spectres protons des composés virtuellement purifiés peuvent être extraits ce qui amène une plus grande clarté au spectre et facilite l'identification des composés.

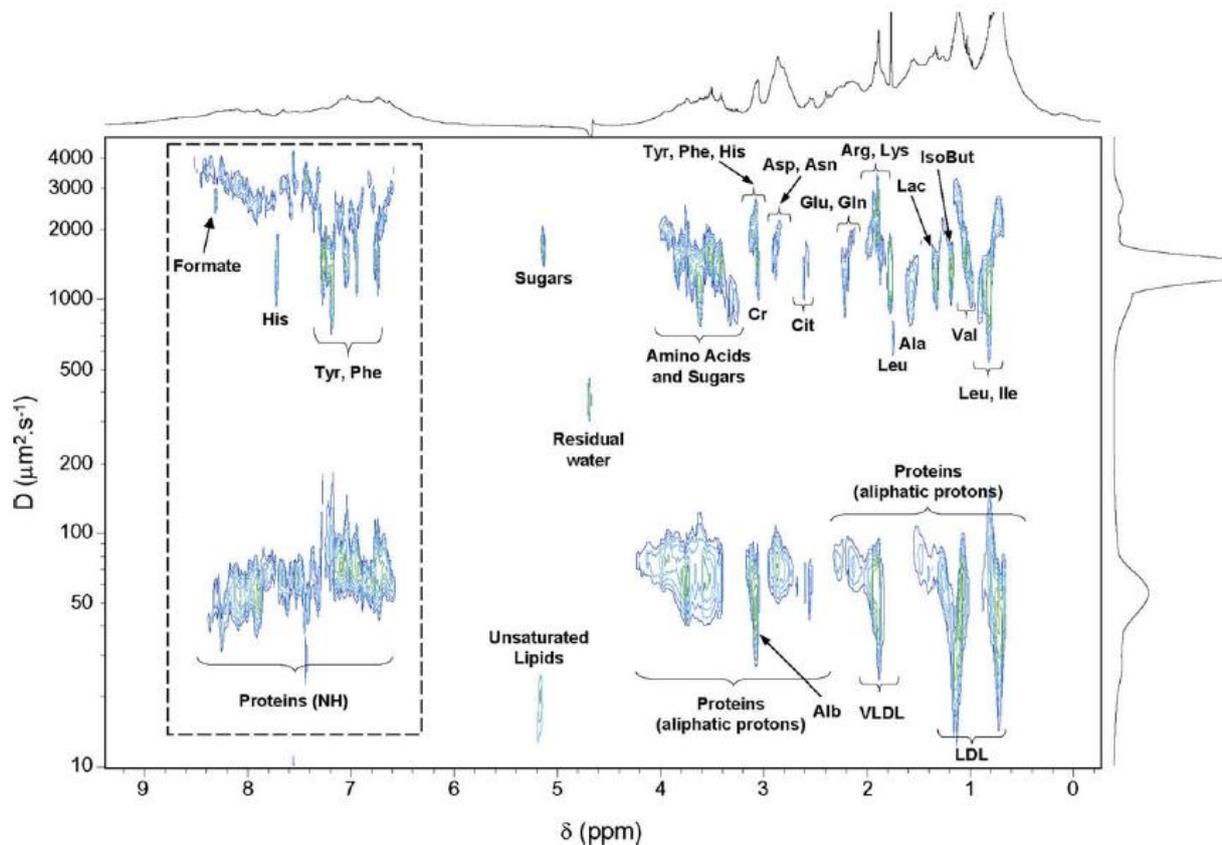


Figure 14. Spectre RMN DOSY ^1H d'un échantillon de plasma humain. Isobutyrate (IsoBut), Créatine (Cr), Citrate (Cit), Albumine (Alb), lipoprotéine (LDL et VLDL). (Balayssac, et al., 2009)

Lors de l'analyse de produits pharmaceutiques, la RMN DOSY ^1H fournit une empreinte spectrale des formulations analysées. Cette empreinte peut être ensuite utilisée afin de comparer différents échantillons. La figure ci-dessous montre une formulation de Viagra® Pfizer et une contrefaçon en provenance de Syrie. Sur la photo, il est montré que les emballages et les médicaments semblent identiques. Cependant, les spectres DOSY sont visiblement différents. La formulation en provenance de Syrie ne contient pas de triacétine ni de lactose mais du polyéthylène glycol (PEG) (Trefi, et al., 2009).

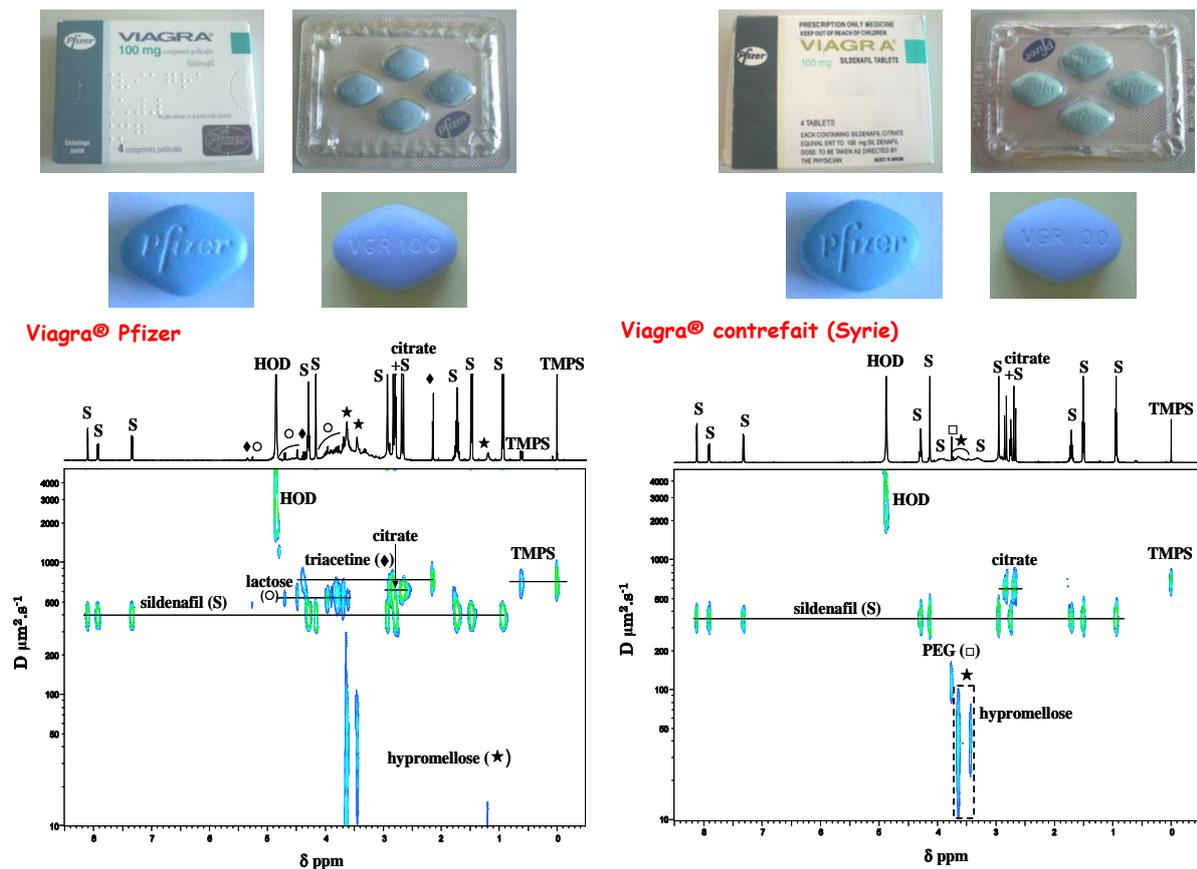


Figure 15. Spectre RMN DOSY ^1H d'un comprimé de Viagra® Pfizer (à gauche) et d'une contrefaçon (à droite) (Trefi, et al., 2009).

Toutefois la RMN DOSY, comme toutes les techniques analytiques possède également ses limites. Quand les masses des composés sont trop proches, la RMN DOSY ne permet pas de les séparer. Lorsqu'il y a des superpositions de signaux de composés de masses différentes, le coefficient de diffusion sera une valeur intermédiaire entre les valeurs réelles des coefficients de diffusion des différents composés.

1.5.3.2) Des composés de même masses

L'analyse par RMN DOSY ^1H est une puissante technique d'analyse de mélanges de composés de taille différente qui ne parait donc pas être adaptée pour des isomères. Néanmoins, dans la littérature, on trouve certains exemples d'utilisation de la RMN DOSY ^1H pour leur analyse. Les auteurs ont alors recours à des co-solvants à base de surfactants (Evans, et al., 2009) (Tormena, et al., 2010) ou de cyclodextrines (Lin, et al., 1995).

Robert Evans montre l'intérêt d'utiliser des micelles pour étudier par RMN DOSY ^1H des isomères (Evans, et al., 2009) (Tormena, et al., 2010). La Figure 16 montre les spectres DOSY ^1H de trois hydroxybenzènes (pyrocathécol, résorcine, hydroquinone). Le spectre de

gauche est le résultat de l'analyse du mélange de ces trois composés en l'absence de micelle. On constate que les coefficients de diffusion ne permettent pas d'obtenir une séparation des trois composés. Le spectre de droite est le résultat de l'analyse du mélange de ces trois composés avec des micelles. L'affinité pour ces micelles étant différente selon les molécules, l'équilibre qui se forme permet alors d'obtenir trois coefficients de diffusion différents. L'identification et l'attribution des signaux de ces trois composés sont alors immédiates.

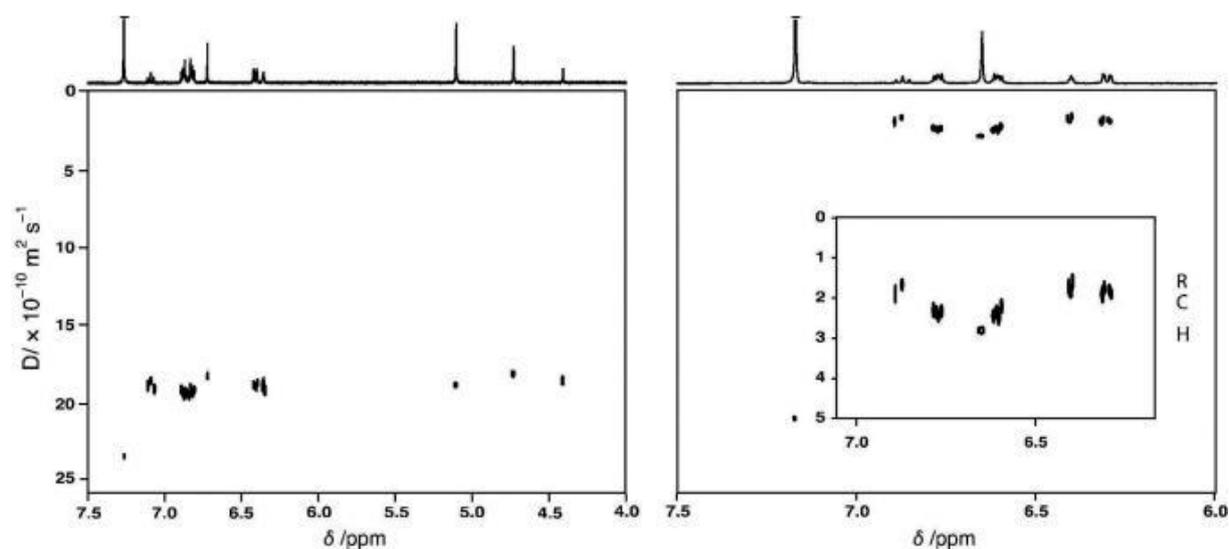


Figure 16. Spectre RMN DOSY ^1H obtenu pour le mélange de trois hydroxybenzènes (pyrocathécol (C), résorcine (R), hydroquinone (H)) avec un milieu micellaire (à droite) et sans milieu micellaire (à gauche). (Evans, et al., 2009)

1.5.3.3) Suivi d'une réaction

La RMN DOSY peut également être utilisée pour contrôler une réaction entre des composés de tailles différentes. Par exemple, Socha et al l'utilisent pour suivre la conversion de triacylglycérols de différentes huiles en biodiesel par une réaction de transestérification (Socha, et al., 2010).

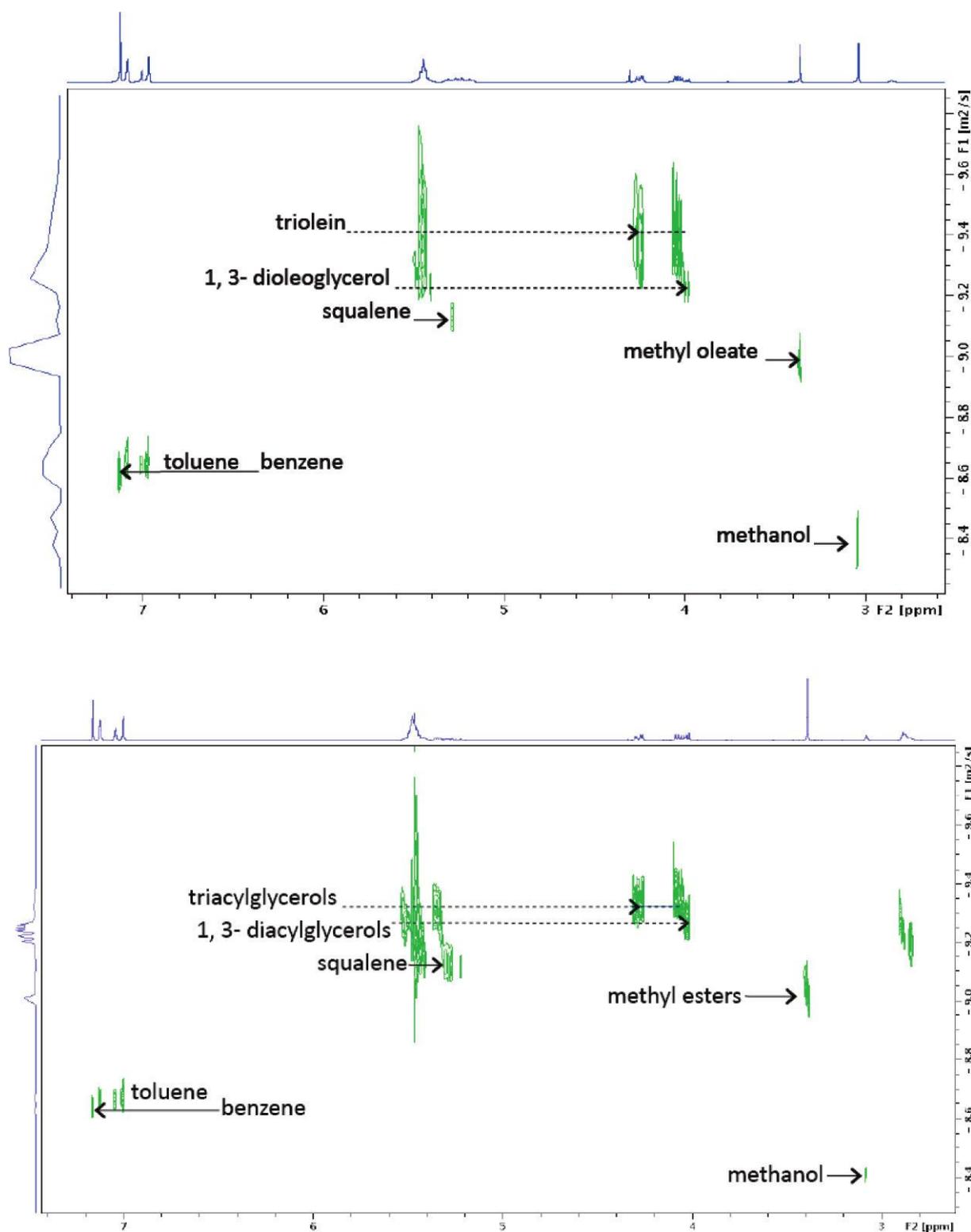


Figure 17. Spectres RMN DOSY ¹H d'un mélange après une réaction de transestérification d'huile végétale (en haut) et d'huile utilisée en cuisine (en bas) (Socha, et al., 2010)

Le spectre DOSY ¹H obtenu pour chaque huile permet d'observer la présence de résidu des produits de départ (les triglycérides et le méthanol), intermédiaires (mono- and diglycérols) et les produits finis (les esters de méthyle) (Figure 17).

II) La RMN DOSY ^1H , les médicaments et les compléments alimentaires

Selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), un médicament contrefait est défini ainsi :

« Un médicament contrefait est un produit qui est délibérément et frauduleusement mal étiqueté avec le respect d'identité et/ou de sa source. La contrefaçon peut s'appliquer aux produits de marques comme aux produits génériques et peut être constituée d'ingrédients corrects ou différents, sans principe actif ou en quantité insuffisante ou encore avoir un faux conditionnement. »

La prise de médicaments contrefaits peut donc être inefficace si le médicament en question ne contient pas le principe actif ou s'il est sous dosé. Mais elle peut être également dangereuse si le médicament contient des analogues ou plusieurs composés dont la synergie n'a pas été testée. 10 % des médicaments dans le monde seraient contrefaits. Bien entendu, le nombre varie selon les pays. La plupart des enquêtes semblent indiquer que dans les pays développés, les médicaments contrefaits avoisinent les 1 % alors que dans les pays en voie de développement le taux de contrefaçons atteint les 10 à 30 % (Fernandez, et al., 2008). En France, les autorités sanitaires contrôlent l'intégralité de la chaîne qui va de la fabrication du médicament à la vente en pharmacie selon la directive 92/25/CEE du 31 mars 1992. La qualité et la sécurité des médicaments vendus dans les officines, seuls établissements autorisés à la vente de médicaments, sont donc garanties par l'Afssaps membre du Comité National de Sécurité Sanitaire. Cependant il existe un autre marché, interdit en France, celui de la vente par internet. Cet autre mode d'achat peut paraître attrayant pour plusieurs raisons. La première est le prix de vente. En effet, la production, les frais de recherche et de développement, les frais administratifs pour la demande d'autorisation de mise sur le marché et les contrôles qualités ont un coût qui est souvent plus élevé que le prix d'une contrefaçon. La seconde raison est que l'acheteur peut ainsi acquérir un produit dont la vente n'est pas autorisée en France. D'un autre côté rien ne garantit la qualité et l'authenticité du médicament acheté via internet. Selon l'OMS, 50 % des médicaments vendus sur internet seraient contrefaits.

Parallèlement à l'élaboration et la vente de médicaments conventionnels, la phytothérapie s'est particulièrement développée ces dernières années. La phytothérapie est

une médecine qui utilise seulement des médicaments dont le ou les principes actifs sont des extraits naturels (plantes, baies, racines, feuilles, écorces, fleurs...). Ces médicaments sont également désignés par le terme anglais « herbals ». Récemment, l'OMS estime que 80 % des personnes dans le monde s'appuient sur les médicaments à base de plantes pour certains aspects de leurs soins de santé primaire (stress, insomnie, surpoids, troubles digestifs...). Cet engouement vient de l'insatisfaction du public due au coût des médicaments sur ordonnance (surtout dans des pays sans sécurité sociale) combiné à un intérêt pour un retour à des remèdes naturels qui sont parfois à tort considérés comme inoffensifs. Il ne faut pas oublier que les plantes contiennent des principes actifs qui selon les espèces, l'origine de la plante, la cueillette... peuvent être extrêmement puissants et même toxiques. Il est donc important d'être attentifs aux dosages et aux possibles interactions avec d'autres médicaments. Une définition précise des « herbals » a été faite par l'OMS. Les phytomédicaments sont des produits médicinaux finis qui contiennent comme principes actifs exclusivement des plantes (partie aérienne ou souterraine), d'autres matières végétales ou des associations de plantes, à l'état brut ou sous forme de préparation. Par plante, ils considèrent les matières végétales telles que la feuille, la fleur, le fruit, la graine, le tronc, le bois, l'écorce, la racine, le rhizome et autres parties, entières, fragmentées ou en poudre.

Le concept de complément alimentaire est relativement récent. Il a été défini par la directive 2002/46/CE du Parlement européen, transposée par le décret du 20 mars 2006 : « On entend par compléments alimentaires les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisées sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules, et autres formes similaires... ». Les compléments alimentaires peuvent être composés de différents éléments tels que des vitamines, des sels minéraux, des oligo-éléments, des antioxydants, des acides gras essentiels, des fibres et diverses plantes ou extraits végétaux. Contrairement aux médicaments, la commercialisation des compléments alimentaires ne nécessite pas d'autorisation individuelle de mise sur le marché fondée sur l'évaluation d'un dossier industriel par une instance d'expertise. L'industriel est responsable de la conformité des mises sur le marché avec les normes en vigueur, de la sécurité et de la non-tromperie du consommateur. Dépendant du code de la consommation, les compléments alimentaires font l'objet de déclaration auprès de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) qui examine leur composition

et réalise des contrôles. Pour la très grande majorité de la population, une alimentation équilibrée suffirait à apporter tous les nutriments nécessaires à la santé. Cependant, pour des raisons de mode de vie et de régimes alimentaires fréquents, depuis quelques années on constate une augmentation de la consommation de compléments alimentaires.

Des molécules de synthèse sont parfois frauduleusement ajoutées pour accroître l'effet thérapeutique des phytomédicaments ou des compléments alimentaires. Ces produits deviennent alors dangereux pour le patient qui prend à son insu, des principes actifs de synthèse, parfois interdits à la vente.

Nous avons donc décidé de réaliser diverses études sur des médicaments conventionnels, des phytomédicaments et des compléments alimentaires achetés sur internet ainsi que des médicaments achetés dans des pays où la réglementation est plus souple ou peu respectée.

II.1) Les techniques analytiques pour la détection des contrefaçons de médicaments ou de compléments alimentaires adultérés

Les laboratoires pharmaceutiques utilisent des formes de gélule, des conditionnements et des hologrammes particuliers afin de se protéger des contrefaçons. Un premier filtrage peut donc être effectué par une simple inspection visuelle des formulations et de leur emballage. Cependant, les contrefaçons deviennent de plus en plus sophistiquées et difficiles à identifier d'un simple coup d'œil. Un contrôle qualité des médicaments, des phytomédicaments et des compléments alimentaires est donc nécessaire. Les techniques de détection de contrefaçons varient selon le coût par échantillon, la sensibilité nécessaire, la sélectivité, le nombre d'échantillons, la clarté des informations et la facilité de mise en œuvre.

II.1.1) Les premières approches

Nous avons vu que le phénomène de contrefaçon de médicament s'observe avant tout dans les pays en voie de développement dont les structures institutionnelles concernant les règlements, l'inspection et l'application des lois sont déficientes et où les fonds nécessaires à un contrôle régulier de la qualité des médicaments sont insuffisants. Plusieurs laboratoires ont alors développé le concept du laboratoire compact mobile permettant de détecter rapidement et à moindre coût toute falsification de médicaments. Par exemple le mini-laboratoire FCIS (Fast Chemical Identification System) a été développé en Chine pour détecter les contrefaçons

d'antibiotiques macrolides. Il est composé de deux tests de colorimétrie et de deux analyses chromatographiques sur couche mince (CCM). L'analyse se fait en trois étapes (Figure 18). Une réaction avec l'acide sulfurique permet de détecter la présence des macrolides, puis une réaction avec le permanganate de potassium permet de classer les macrolides selon le nombre de carbone dans leur macrocycle. Deux techniques de CCM permettent ensuite d'identifier les macrolides (Sherma, 2007) (Hu, et al., 2006).

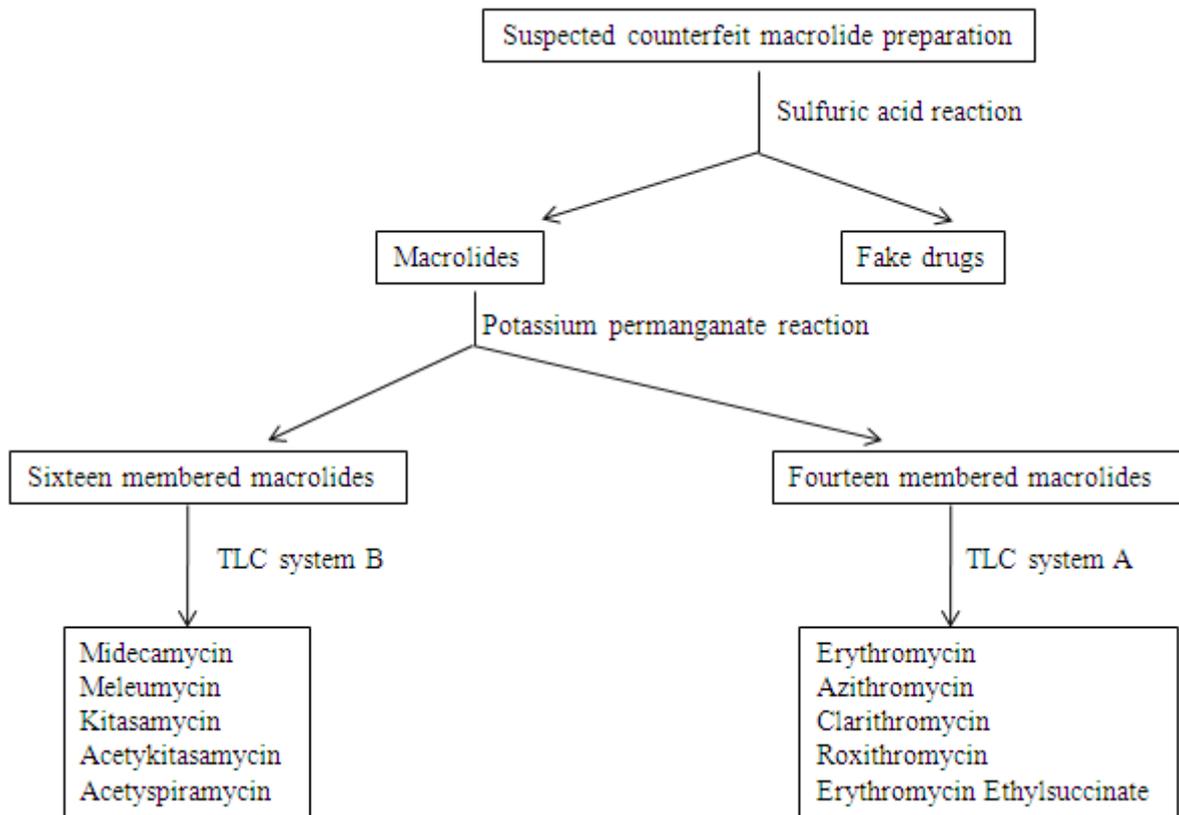


Figure 18. Procédé du mini-laboratoire FCIS (Hu, et al., 2006).

Mais le principal mini-laboratoire utilisé aujourd'hui est le GPHF-Minilab® développé en Allemagne par GPHF (German Pharma Health Fund renommé ensuite en Global Pharma Health Fund) (Jahnke, et al., 2001). Il permet de tester 57 principes actifs listés sur leur site internet <http://www.gphf.org/web/en/minilab/wirkstoffe.htm>. Le protocole se réalise en quatre temps (Fernandez, et al., 2008):

- Une inspection visuelle des emballages, des imprimés, de la forme et de la taille des gélules
- Un test de dissolution/désintégration. Par exemple, les gélules pyrazinamide à libération rapide doivent se dissoudre dans 100 mL d'eau à 37°C en trente minutes.
- Un test de colorimétrie pour identifier la présence ou non de principes actifs

- Une analyse CCM semi-quantitative pour vérifier les dosages.

À ce jour, plus de 350 mini-laboratoires ont déjà été envoyés dans 70 pays dont le Laos, Cambodge, Madagascar, Nigéria et la Tanzanie.

Dernièrement, une autre technique utilisée comme première approche lors d'investigation de formulations suspectes a été développée par Rodomonte et al. L'idée est d'analyser l'emballage et la plaquette des médicaments à l'aide d'un colorimètre, Figure 19.

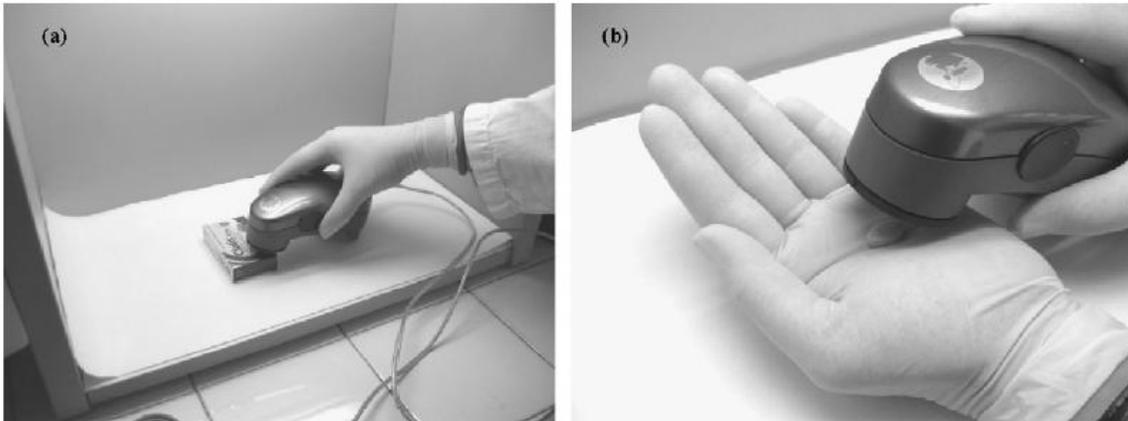


Figure 19. Analyse de l'emballage secondaire et d'un cachet de Cialis®. (Rodomonte, et al., 2010)

L'objet est scanné en quelques secondes et à l'aide d'un logiciel, la réflectance est tracée en fonction des longueurs d'ondes. Il suffit alors de comparer les courbes obtenues avec celles de la formulation authentique. Simple d'utilisation cette technique ne requiert pas un personnel spécifique.

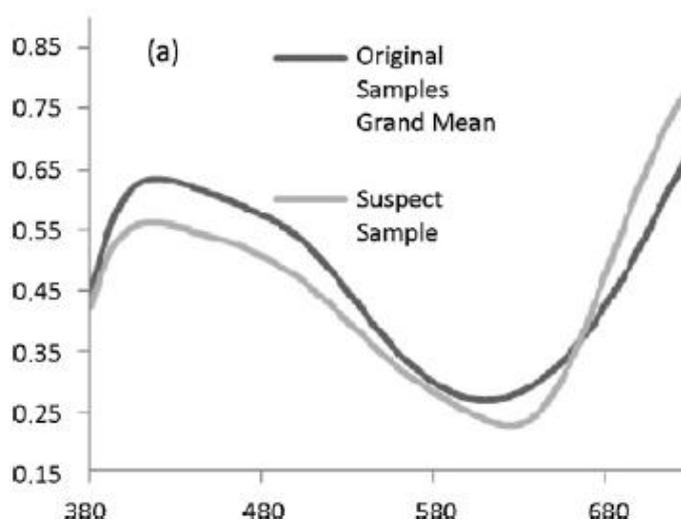
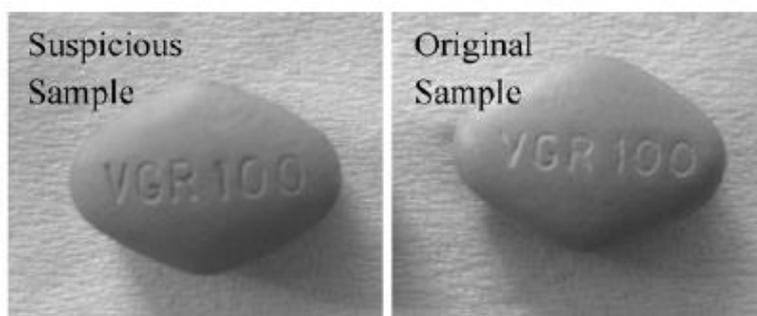


Figure 20. Courbes de réflectance en fonction des longueurs d'ondes en nm obtenues pour une formulation suspecte de viagra pour une formulation de Viagra® authentique (Rodomonte, et al., 2010).

L'inspection visuelle est souvent réalisée par des yeux humains qui ne voient pas forcément les différences mineures entre les formulations. La Figure 20 montre deux formulations de Viagra® qui semblent identiques, pourtant l'analyse révèle une contrefaçon. De plus, une inspection visuelle par une personne est subjective alors qu'une inspection instrumentale assure une meilleure reproductibilité et surtout elle fournit une banque de données numériques. Il s'agit d'une méthode très rapide et peu coûteuse. L'appareil est petit et peut être connecté à n'importe quel ordinateur par un port USB, ce qui le rend facilement transportable. L'étape la plus longue est bien sûr de constituer une librairie de formulations originales. Mais une fois la librairie en place, l'analyse est très rapide. (Rodomonte, et al., 2010)

II.1.2) Les méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont largement utilisées pour la détection de contrefaçons. La chromatographie en phase gazeuse est un outil remarquable pour détecter les solvants résiduels et impuretés volatiles organiques. Etant très sensible, plusieurs auteurs l'utilisent couplée avec la spectrométrie de masse. Par exemple, Tseng et al ont ainsi identifié et quantifié plusieurs adultérants (mazindol, clobenzorex, caféine, diazépam et phentermine) dans des médicaments traditionnels chinois ayant des propriétés amaigrissantes (Tseng, et al., 2000). La GC-MS a également permis de détecter la présence d'amphétamine, de caféine et d'autres substances mais aussi l'absence du principe actif annoncé, le fénéthylline, dans des lots de Captagon® (Sherma, 2007).

Parmi les méthodes séparatives, l'HPLC reste la plus populaire. Le large choix des phases mobiles, des phases stationnaires et des différents détecteurs (UV, DAD (barrettes de diodes, Diode Array Detector), ELSD (détecteur à diffusion de lumière, Evaporative Light Scattering Detector), FLD (fluorescence, Fluorescence Laser Detector), RID (réfractométrie, Refractive Index Detector), MS, RMN...) permet une grande polyvalence.

Les détecteurs UV et DAD, peu coûteux, sont fréquemment utilisés. Par exemple Liu et al ont détecté 35 adultérations parmi 41 phytomédicaments par HPLC couplée avec un détecteur DAD (Liu, et al., 2001). Cependant ces détecteurs présentent quelques inconvénients. Le spectre d'absorbance UV peut dépendre des caractéristiques physiques et chimiques du solvant dans lequel est dissous le composé. Dans le cas d'une analyse HPLC-DAD, ce spectre dépend donc de la phase mobile utilisée. Il est alors nécessaire de se constituer une librairie dans les mêmes conditions d'analyse que les médicaments. Certains composés utilisés dans les compléments alimentaires, comme par exemple la phentermine, la fenfluramine ou le diethylpropion ont une faible absorption UV et leurs spectres UV sont assez similaires (Tseng, et al., 2000). De plus, la matrice des médicaments peut interférer dans l'analyse et fausser les valeurs des temps de rétention. Ainsi des formulations contrefaites peuvent être validées par erreur et de vraies formulations être déclarées fausses. Liang propose alors de coupler l'HPLC avec un détecteur MS-MS (Liang, et al., 2004).

L'HPLC couplée avec la MS-MS est utilisée par de nombreux auteurs. Elle permet non seulement de détecter les adultérants mais également de les identifier. Lau l'utilise pour détecter la caféine, phénylbutazone et l'oxyphenbutazone présents en tant qu'adultérants dans des formulations à base de plantes d'Indonésie (Lau, et al., 2003). Bogusz et al ont également

testé cette méthode sur un grand nombre de molécules (analgésiques, antibiotiques, antiépileptiques, aphrodisiaques, hormones, amaigrissants, anaboliques, psychotropiques). Les limites de détection et quantification obtenues sont excellentes, respectivement de l'ordre de quelques pg à quelques ng et de quelques ng à une dizaine de ng (Bogusz, et al., 2006). Cependant, le coût de l'analyse est plus élevé avec un détecteur MS-MS qu'avec un détecteur DAD.

L'HPLC est une méthode grande consommatrice de solvant. Certains auteurs ont développé l'électrophorèse capillaire qui nécessite moins de solvant pour l'analyse de contrefaçons (Jiang, et al., 2010) (Liang, et al., 2004) (Cianchino, et al., 2008). Mais elle reste peu utilisée en comparaison de l'HPLC.

Les méthodes séparatives sont souvent utilisées pour analyser sélectivement les principes actifs des échantillons. La présence des principes actifs est une condition nécessaire mais pas suffisante pour classer un médicament comme étant authentique. Un médicament est une combinaison complexe d'un ou plusieurs principe(s) actif(s) et d'excipients. La sélectivité des méthodes séparatives peut être alors problématique (Rodionova, et al., 2010). L'autre inconvénient des méthodes séparatives est le temps nécessaire pour l'optimisation et l'analyse.

II.1.3) Les méthodes spectroscopiques

Depuis les cinq dernières années, la spectrométrie de masse s'est développée en particulier avec la mise au point de techniques d'ionisation directe à pression atmosphérique appelées également « ionisation ambiante ». L'analyse est réalisée directement sur la formulation. Elle ne nécessite donc pas de préparation d'échantillon. L'élimination de la séparation par chromatographie permet de réduire le temps d'analyse à quelques secondes et donc d'augmenter le débit d'échantillons. Différentes techniques d'ionisation directe ont été développées pour la recherche de contrefaçons : DART (Direct Analysis in Real Time), ASAP (Atmospheric pressure Solid Analysis Probe) et DESI (Desorption ElectroSpray Ionisation).

La technique DESI-MS utilise un électrospray qui est envoyé sur l'échantillon. Il se crée alors un film microscopique liquide à la surface de l'échantillon. Une rapide extraction liquide-solide se réalise entraînant la formation de gouttelettes. Les ions sont formés par désolvatation des gouttelettes puis analysés par spectrométrie de masse (Martino, et al., 2010)

(Salter, et al., 2011) (Galhena, et al., 2010). L'analyse DART consiste à placer l'échantillon dans un plasma généré par la réaction d'un gaz d'hélium ou d'azote métastable avec de l'eau atmosphérique. La désorption et l'ionisation de l'échantillon se font dans le plasma via un mécanisme de transfert de protons en phase gazeuse (Twohig, et al., 2010) (Martino, et al., 2010) (Steiner, et al., 2009). L'ASAP a été inventé par Mc Ewen. Cette technique est plutôt utilisée sur des composés volatiles. L'échantillon est déposé dans un capillaire en verre à son point de fusion puis placé dans des vapeurs de gaz chauffées ce qui permet la vaporisation de l'échantillon. L'ionisation est ensuite réalisée par une décharge électrique (Twohig, et al., 2010). L'ASAP couplé avec un détecteur TOF-MS a permis d'identifier des adultérants (sildénafil, thiohomosildénafil et tadalafil) dans des compléments alimentaires utilisés pour des problèmes érectiles et annoncés 100 % naturels (Twohig, et al., 2010). Nyadong utilise le DESI-MS et DART-MS pour caractériser la composition chimique de contrefaçons de médicaments anti-malaria. Ainsi parmi 16 échantillons, 10 contrefaçons ont été détectées et leurs adultérants ont été identifiés. De plus, l'analyse DESI-MS réalisée en mode imagerie fournit alors des informations sur la distribution spatiale et l'homogénéité des composés dans l'échantillon (Nyadong, et al., 2009). L'acquisition des spectres est très rapide tout en gardant une bonne sensibilité. Cependant tous les excipients ne sont pas détectés et l'analyse quantitative est plus délicate à faire car elle nécessite une dispersion homogène des composés dans l'échantillon. La spectrométrie de masse peut être considérée comme étant sélective de par l'ionisation utilisée (Van Der Kooy, et al., 2009).

Faciles à utiliser, rapides et non destructives, les techniques spectroscopiques en proche infrarouge (PIR ou Near Infrared NIR) et Raman se développent de plus en plus pour la recherche de contrefaçons de médicaments tels que Combiron® (sulfate de fer), Aldomet® (methyldopa), Floxacine (normfloxacine) et Tylenol® (acétaminophène), Viagra® (sildénafil), anti-malaria (artésunate) (Ricci, et al., 2007) (Deisingh, 2004)... De plus, il existe des spectromètres portables de NIR et de Raman à des prix abordables pouvant être utilisés pour la détection de contrefaçons sur le terrain. Ces spectromètres permettent d'obtenir des empreintes spectrales rapidement souvent par analyse directe ou sans de lourdes préparations d'échantillons. De plus, ils détectent principes actifs et excipients. La Figure 21 montre les spectres Raman obtenus pour différentes formulations de Viagra® (De Veij, et al., 2008). La formulation 1 est une formulation identique au Viagra®.

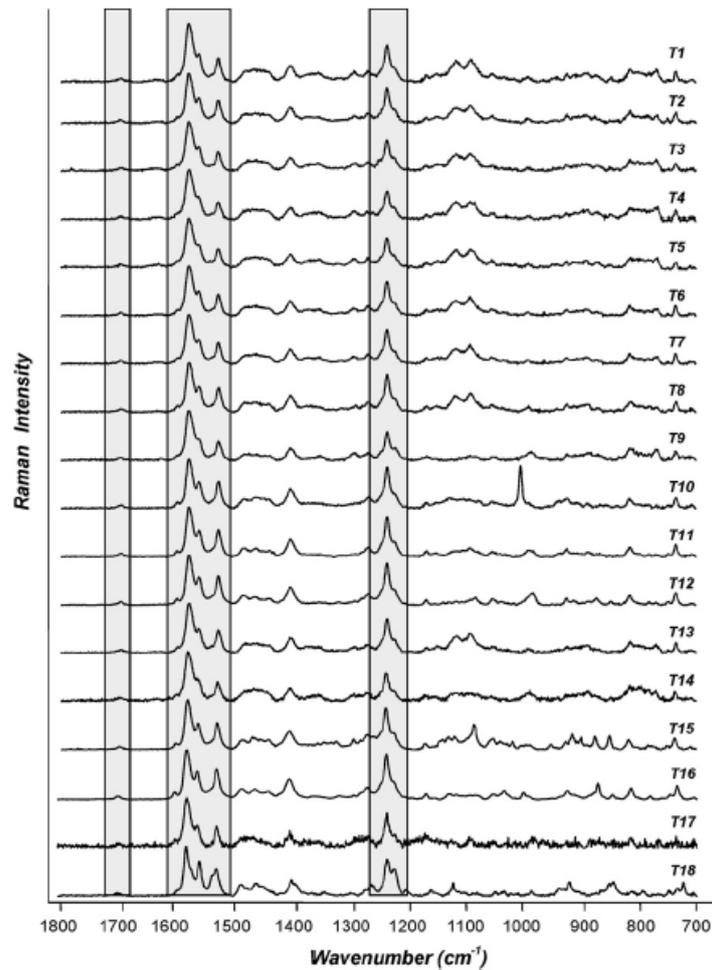


Figure 21. Spectres Raman 18 formulations de Viagra® (De Veij, et al., 2008).

Les signaux surlignés en gris correspondent au principe actif, le sildénafil. L'ensemble des formulations contiennent du sildénafil. Les formulations 1 à 8 et 13 ont les mêmes spectres : ils contiennent les mêmes excipients que le Viagra®. Par contre, les autres formulations (9 à 12 et 14 à 18) ont des spectres différents, elles contiennent donc des excipients différents, ce sont des contrefaçons. Cet exemple montre la nécessité d'avoir une méthode d'analyse globale.

Mais les spectres obtenus par spectrométrie NIR ou Raman sont parfois très ressemblants. L'identification des contrefaçons est alors basée sur la comparaison des spectres des différents échantillons avec un spectre de référence du médicament authentique en utilisant des algorithmes de classification ou des analyses multivariées telles que l'analyse par composante principale (ACP). Il est alors nécessaire de traiter les données statistiquement à l'aide de logiciels parfois coûteux (Sacre, et al., 2010) (Rodionova, et al., 2010).

La spectroscopie RMN est un outil remarquable pour la détermination structurale de composés. Elle ne nécessite pas de grandes quantités d'échantillons et grâce à sa nature non destructive, l'échantillon peut être éventuellement réutilisé pour d'autres analyses. Les solvants utilisés en RMN doivent être deutérés, ce qui augmente leur prix, cependant l'analyse ne requiert pas de grand volume de solvant. Reproductibles et robustes, les analyses par RMN sont également quantitatives. Depuis quelques années, elle est utilisée également pour caractériser des milieux complexes grâce à l'introduction de nouvelles méthodes comme l'approche statistique de traitements des spectres appelée la métabolomique, de l'HPLC-RMN et de la RMN DOSY. Je ne développerai pas davantage ces techniques dans ce paragraphe car nous avons déjà abordé les techniques HPLC couplées à différents détecteurs ainsi que la RMN DOSY dans les paragraphes précédents. La métabolomique sera présentée dans la seconde partie de cette thèse.

La diffraction des rayons X permet également de détecter des contrefaçons. Par exemple, Maurin et al l'utilisent pour l'analyse de contrefaçons de Viagra® (Maurin, et al., 2007). La Figure 22 montre les spectres obtenus lors d'une analyse de Viagra® authentique (en gris) et lors d'analyses de contrefaçons de Viagra® (en rouge et en bleu). Une simple comparaison des spectres permet de discriminer les contrefaçons des originaux.

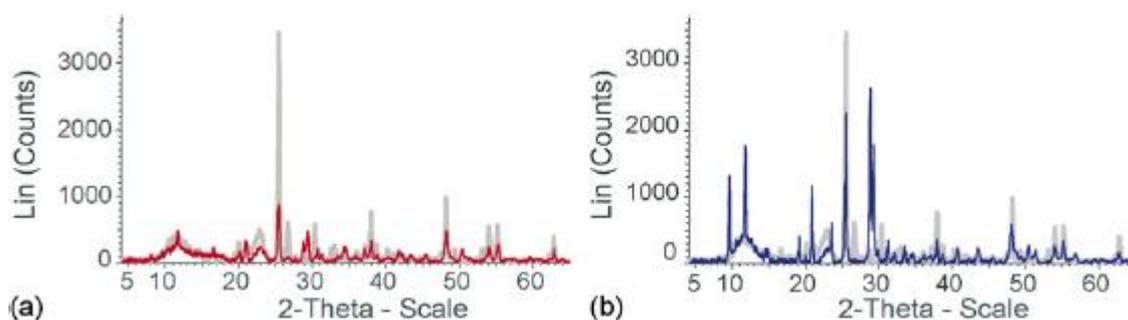


Figure 22. Spectres de diffraction des rayons X d'une formulation de Viagra® authentique (gris) et de contrefaçons de Viagra® (rouge et bleu) (Maurin, et al., 2007).

Cependant cette technique est encore peu répandue pour l'analyse des contrefaçons de médicaments.

II.2) Etude de formulations amaigrissantes

II.2.1) Sibutral®

L'obésité et le surpoids affectent plus de 1,5 milliards d'individus dans le monde selon l'OMS (WHO, 2011). L'obésité entraîne une incidence plus élevée de maladies chroniques dont le diabète, les maladies cardio-vasculaires et le cancer.

Notre étude a donc porté sur des médicaments amaigrissants à base de sibutramine. La sibutramine fut commercialisée en France en juin 2001 par les laboratoires Abbot sous le nom de Sibutral®. Elle agit en inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline entraînant ainsi une diminution de l'appétit et une sensation de satiété. C'est un traitement d'appoint contre l'obésité nutritionnelle.

Lors de cette étude, la législation sur la vente de la sibutramine a évolué. En effet, suite aux signalements d'effets cardiovasculaires indésirables, l'agence européenne des médicaments a mis en place l'étude SCOUT (Sibutramine Cardiovasculaire OUTcomes trials) afin d'évaluer à long terme les effets de la sibutramine. Durant la période de l'étude, l'Afssaps a restreint les conditions de délivrance de la sibutramine. Le médicament ne pouvait être prescrit que par un spécialiste et la durée du traitement ne pouvait pas excéder un an, période durant laquelle le patient était surveillé par un médecin (James, 2005).

En 2010, les résultats de cette étude ont montré une augmentation du risque de complications cardiovasculaires chez les patients traités par la sibutramine par rapport aux patients traités par un placebo. De plus, la perte de poids sous sibutramine s'est révélée faible. L'autorisation de mise sur le marché des médicaments à base de sibutramine a donc été retirée en janvier 2010 en France et en octobre 2010 aux Etats-Unis (Afssaps, 2010).

II.2.1.1) Matériels et méthodes

Neuf formulations à base de sibutramine ont été achetées via Internet sur différents sites et en provenance de différents pays ou directement dans le pays de commercialisation. Ces formulations sont répertoriées dans le Tableau 1.

N° de formulation	Nom de la formulation	Numéro de lot	Date de péremption	Laboratoire	Pays
1	newregima	7	Mai 2009	delta for medicaments/ ashrafield &Co	Syrie
2	obestat-5	lic:130/2006	-	cipla	Syrie
3	redact	4180	Juin 2010	Asia pharmaceutical industries	Syrie
4	sibustat-10	B6336M11/7E1 0/10	-	Meridia	Inde
5	sibutramine tablets	23506	Octobre 2008	Meridia	Inde
6	obestat-10	*70243	Février 2010	cipla	Inde
7	-	88070037	Mars 2010	taiji qumei	Chine
8	okin	70103	Janvier 2010	C&O	Chine
9	-	88070077	Novembre 2011	taiji qumei	Chine

Tableau 1. Liste des formulations contenant de la sibutramine analysées.

▪ *Mise au point expérimentale*

Pour une analyse en solution, le choix du solvant est une étape importante. Le solvant doit permettre d'extraire le principe actif ainsi que le maximum d'excipients présents dans le médicament. De plus pour l'enregistrement de spectres DOSY, il est préférable d'utiliser des solvants relativement visqueux comme par exemple D₂O ou le DMSO. Dans D₂O, la sibutramine est soluble mais pas forcément les autres adjuvants possibles, ni tous les excipients comme par exemple le stéarate. Par contre la sibutramine est, comme la plupart des principes actifs, plus soluble dans le méthanol que dans l'eau. Mais le méthanol est peu visqueux et solubilise peu d'excipients, ce sera par contre un bon solvant pour effectuer une quantification absolue du principe actif. Nous avons observé que le mélange CD₃CN/D₂O avec un ratio 80/20 est un bon compromis. Il permet d'extraire la plupart des principes actifs et le maximum d'excipients. Sa viscosité permet d'obtenir un spectre DOSY très exploitable avec une bonne séparation des différentes tâches des divers composants.

Une gélule de Sibutral® et le principe actif de sibutramine ont été préparés dans le mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 80/20 et analysés par RMN ^1H , 1D DOSY, spectres RMN 2D (COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$, HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$), spectre RMN ^{13}C Jmodulé pour attribuer les signaux de la sibutramine.

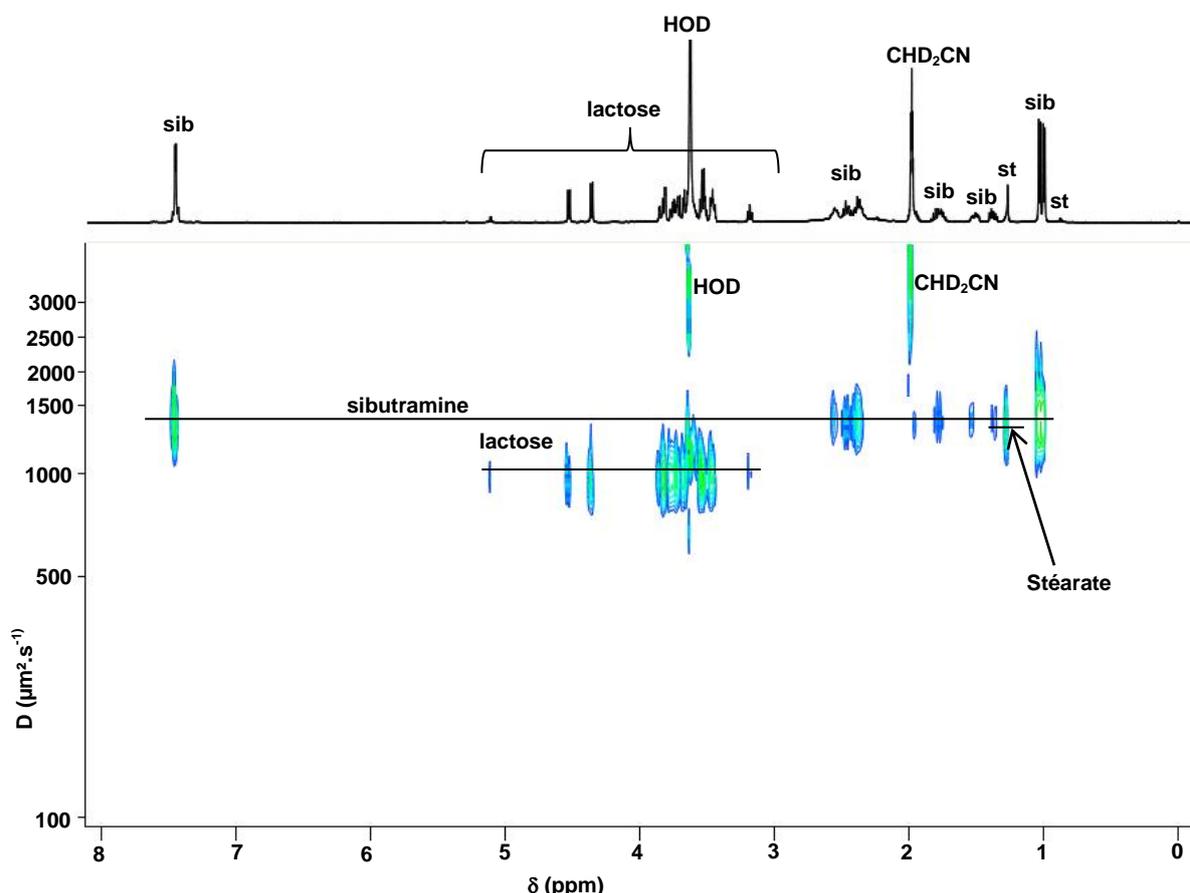


Figure 23. Spectre RMN DOSY ^1H du Sibutral® dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$. (sib : sibutramine, st : stéarate)

Le mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ permet d'observer la sibutramine mais également les excipients. Le spectre DOSY ^1H , présenté Figure 23, montre une bonne séparation entre le principe actif et les excipients. Pour la suite de ce chapitre, les analyses seront donc faites dans un mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ avec un ratio 80/20. L'attribution des signaux RMN de la sibutramine est donnée dans la publication « Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY ^1H -NMR » page 50.

▪ *Protocole*

Les formulations sont analysées et quantifiées par RMN ^1H selon le protocole analogue à celui décrit dans la publication « Analysis of adulterated herbal medicines and

dietary supplements marketed for weight loss by DOSY $^1\text{H-NMR}$ » page 50 avant la date de péremption indiquée sur la notice.

Pour vérifier la validité de la quantification, nous avons analysé un comprimé du princeps Sibutral®, contenant 10 mg de sibutramine, acheté dans une pharmacie française. L'analyse, réalisée trois fois, révèle un dosage de $9,50 \pm 0,56$ mg de sibutramine par gélule. Nous avons donc utilisé cette méthodologie pour quantifier la sibutramine dans les différentes formulations.

II.2.1.2) Résultats et discussions

Toutes les formulations et le Sibutral® servant de référence ont été analysés par RMN DOSY ^1H . Les spectres des formulations 3, 9 et du Sibutral® sont présentés Figure 24.

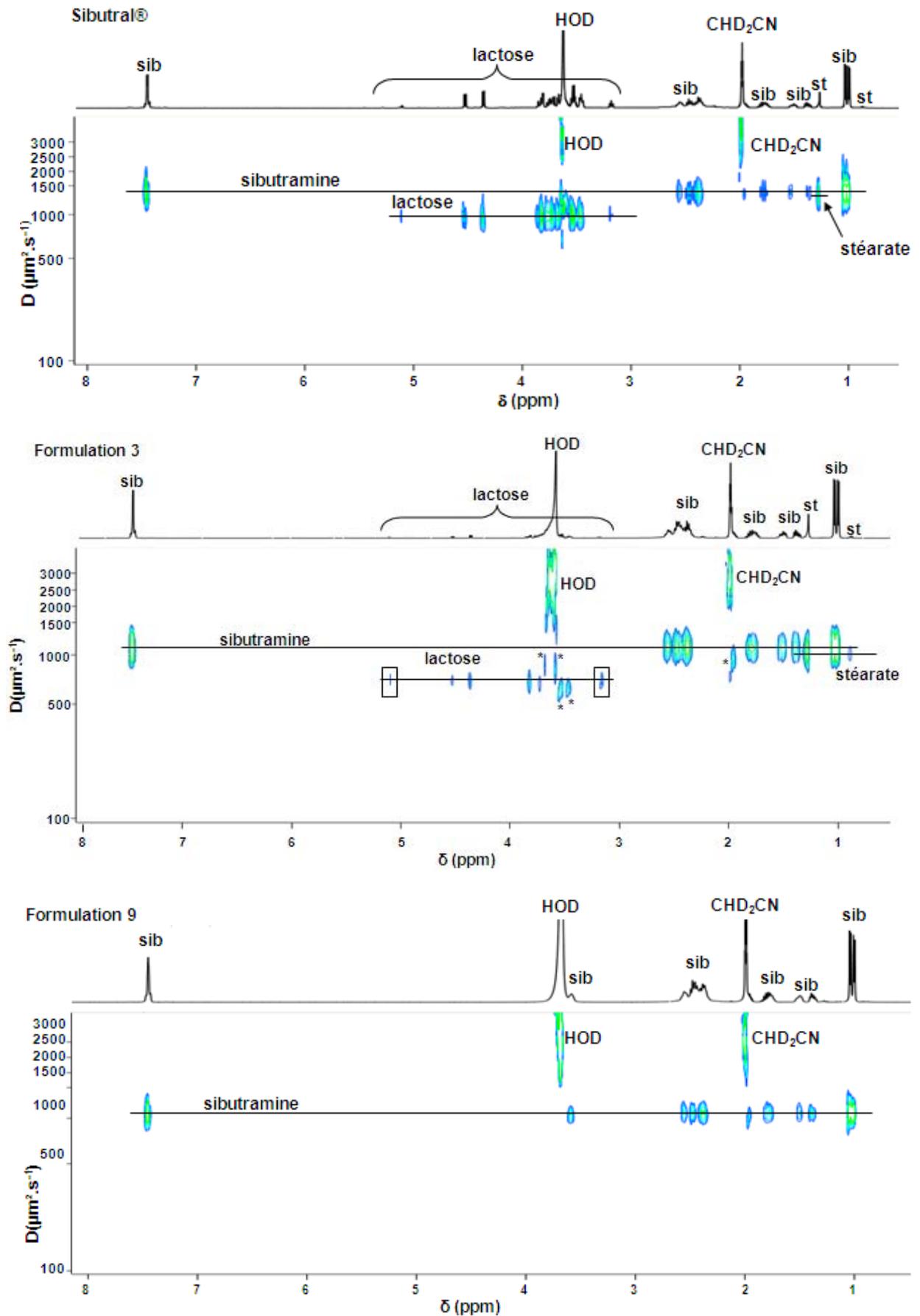


Figure 24. Spectres RMN DOSY ^1H du Sibutral®, de la formulation 3 et de la formulation 9 enregistrés dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$. (sib : sibutramine, st : stéarate)

Ces deux formulations contiennent de la sibutramine. La formulation 3 possède également les mêmes excipients que le Sibutral® mais dans des proportions différentes comme on peut le voir sur la Figure 24. En effet, elle contient peu de lactose. Les signaux marqués d'une étoile ne sont pas alignés avec les autres signaux de la molécule. Cet artefact vient de la superposition de signaux peu intenses avec le solvant. De ce fait, l'atténuation des signaux lors de l'analyse DOSY n'est plus strictement exponentielle mais biexponentielle ce qui entraîne une erreur sur la valeur des coefficients de diffusion. Quant à la formulation 9, elle ne contient pas d'excipients détectables mais uniquement le principe actif.

Le tableau 2 présente les composés détectés par RMN DOSY ^1H sur l'ensemble des formulations. Les neuf formulations contiennent bien le principe actif, la sibutramine. Parmi elles, cinq contiennent les mêmes excipients que le Sibutral® mais dans des proportions différentes comme nous pouvons le voir sur les spectres DOSY ^1H (Figure 24). La formulation 8 contient un seul excipient, du stéarate. Et les trois dernières formulations ne contiennent pas d'excipients. Le principe actif est présent dans toutes les formulations, aucun analogue n'a été détecté.

Les dosages ont été vérifiés par des analyses RMN ^1H dans du méthanol. Les résultats des quantifications sont donnés dans le Tableau 2. Aucun surdosage ou sous dosage n'a été détecté et les doses sont en accord avec les valeurs indiquées sur les notices.

Numéro de formulation	Sibutramine (mg/comprimé)	Excipients
1	$10,39 \pm 0,50$	stéarate, lactose
2	$5,19 \pm 0,42$	stéarate, lactose
3	$9,38 \pm 0,76$	stéarate, lactose
4	$10,19 \pm 0,24$	-
5	$9,34 \pm 0,35$	stéarate, lactose
6	$10,13 \pm 0,39$	stéarate, lactose
7	$10,73 \pm 0,11$	-
8	$5,16 \pm 0,26$	stéarate
9	$10,90 \pm 0,43$	-

Tableau 2. Liste des excipients détectés et quantité de sibutramine pour chaque formulation (n = 3).

II.2.2) Compléments alimentaires

Comme nous l'avons vu, l'obésité touche de plus en plus de monde. De plus, un idéal de la minceur est entretenu et amplifié depuis une trentaine d'années par les médias, les magazines féminins et le cinéma (Simon, 2007). Dans l'ensemble de l'Union Européenne, 45 % des individus se déclarent insatisfaits de leur poids (De Saint Pol, 2009). Le marché de la minceur est donc devenu un marché en pleine expansion où compléments alimentaires et herbals amaigrissants se sont démocratisés. Parallèlement au développement de ce marché, la fraude par l'ajout d'adultérant afin d'augmenter les effets thérapeutiques s'est également développée.

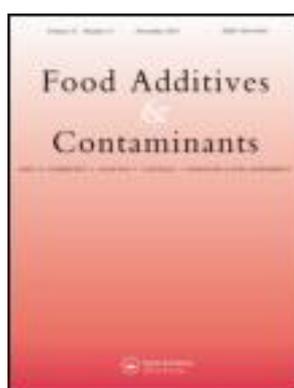
Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés à l'analyse de produits commercialisés comme amaigrissants et annoncés comme 100 % naturels. Nous avons analysé 20 herbals ou compléments alimentaires par RMN DOSY ^1H . Parmi ces formulations, deux étaient strictement à base de plantes, quatre avaient une composition conforme à celle annoncée sur la notice et les autres étaient adultérées. Les adultérants détectés sont la sibutramine, la phénolphthaléine, la synéphrine et méthylsynéphrine.

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication :

Publication 1 :

Analysis of adulterated herbal drugs marketed for weight loss by DOSY ^1H NMR

Publication parue dans le journal Food Additives and Contaminants, 27, 903-16 (2010).



Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY ¹H-NMR

J. Vaysse, S. Balayssac, V. Gilard, D. Desoubdzanne, M. Malet-Martino* and R. Martino

Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB),
Groupe de RMN Biomédicale, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse cedex 9, France

(Received 21 October 2009; final version received 16 February 2010)

Twenty herbal medicines or dietary supplements marketed as natural slimming products were analysed by diffusion ordered spectroscopy (DOSY) ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) and DOSY-COSY ¹H-NMR. The method allows analysis of the whole sample with the detection of both active and inactive ingredients in these complex matrices. Among the 20 formulations analysed, two were strictly herbal and four had a composition corresponding to declared ingredients on the packaging or the leaflet. The others were all adulterated. Eight formulations contain sibutramine alone at doses ranging from 4.4 to 30.5 mg/capsule. Five formulations contain sibutramine (from 5.0 to 19.6 mg/capsule or tablet) in combination with phenolphthalein (from 4.4 to 66.1 mg/capsule), and the last formulation was adulterated with synephrine (19.5 mg/capsule). Quantification of the actives was carried out with ¹H-NMR. Several other compounds were also characterized including methylsynephrine, vitaberin, sugars, vitamins, etc. DOSY NMR is thus proposed as a useful tool for detection of unexpected adulteration.

Keywords: Analysis – nuclear magnetic resonance (NMR); additives general; nutritional supplements; DOSY

Introduction

According to the World Health Organization (WHO) (see <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>), approximately 1.6 billion adults were overweight and at least 400 million were obese in 2005. The WHO further projects that by 2015, approximately 2.3 billion adults will be overweight and more than 700 million will be obese. Overweight and obesity are associated with premature mortality, chronic morbidity, diabetes, heart disease, osteoarthritis and cancer. Given (1) the medical and social impact of being overweight or obese, (2) the few drugs marketed for these indications, and (3) the safety concerns of these medications, more and more patients turn to weight-loss natural herbal medicines (HM) or dietary supplements (DS). Indeed, in contrast to conventional pharmaceuticals, these products are regarded by many as being harmless because of their natural origin for HM or of their safe composition (vitamins, minerals, herbs or other botanicals, amino acids, and substances such as enzymes, organ tissues, glandular, and metabolites) for DS.

The WHO's definition indicates that medicines containing plant material combined with chemically defined active substances, including chemically defined, isolated constituents of plants, are not considered

to be HM (see <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/index.html>). Moreover, the US Food and Drug Administration (USFDA) regulations require that a complete list of ingredients and the net contents of the product appear on DS labels (see <http://www.fda.gov/food/DietarySupplements/default.htm>). Despite these clear definitions and regulations, and as it is very easy for consumers to purchase these formulations over the Internet, common problems affecting the safety of these preparations include fraudulent adulteration with synthetic actives used in conventional pharmaceutical drugs, which can lead to severe side-effects.

Reported methods for screening illegal adulterations in HM or DS are mainly HPLC-DAD, GC-MS and LC/MS/MS (Liu et al. 2001; Lau et al. 2003; Bogusz et al. 2006; Liang et al. 2006; Chen et al. 2009). Recently, Zhu et al. (2009) developed an algorithm, termed local straight-line screening (LSLS), to resolve complex IR spectra of possibly adulterated HM. The analytical methods reported concerning more specifically the adulteration of herbal formulations marketed for weight loss are chromatographic methods coupled with various detectors (Tseng et al. 2000; Jung et al. 2006; Yuen et al. 2007; Zou et al. 2007;

*Corresponding author. Email: martino@chimie.ups-tlse.fr

Date et al. 2008; Huang et al. 2008; Wang et al. 2008), capillary electrophoresis (CE) (Cianchino et al. 2008) and IR-LSLS (Lu et al. 2007). None of these methods is ideal as HM often contain mixture of herbs and other natural products, and the formulas of those products are very complex. Chromatographic methods do not provide global information as they are mainly targeted screening methods and thus sometimes too selective. Moreover, false-positive results might occur with both chromatographic and IR-LSLS methods because it is in fact an analogue of a known active compound with a very close chemical structure which is detected instead of the target compound.

In this study, we show an application of 2D diffusion ordered spectroscopy ^1H -nuclear magnetic resonance (2D DOSY ^1H -NMR) spectroscopy as an untargeted screening method for the detection and unequivocal identification of adulterants in 'herbal' slimming products. The main advantage of NMR is to provide global information as it allows for considering the drug preparation as a whole. Moreover, the method is non-selective and requires no prior knowledge of the structures of the various components present in the mixture, which is a major advantage for screening of adulteration.

Materials and methods

Samples

Twenty commercial formulations of HM or DS marketed for weight loss were analysed. Formulations 1, 5, and 7 were bought in China, formulations 16–18 in Syria. Other formulations were purchased over the Internet. Table 1 lists the tablets or capsules analysed. All samples, as received, were stored in the dark at ambient temperature and humidity. They were all analysed within their expiration dates (when indicated).

^1H - and 2D DOSY ^1H -NMR

The ^1H -NMR experiments were performed on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm cryoprobe at 298 K. Typical acquisition parameters were as follows: acquisition time 2.72 s, spectral width 6000 Hz, pulse width 3.0 μs (flip angle $\approx 35^\circ$), 32 K data points, relaxation delay 1 s, and number of scans, 16. All chemical shifts (δ) were referred to an internal δ and quantification sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate (TSP) reference. Authentic standards (sibutramine, phenolphthalein, synephrine, vitaberine, caffeine, carnitine, linoleate, stearate, citrate, vitamin C, dehydroascorbic acid, vitamins B1, B2, B3, B5, B6, and E, lipoic acid, glucose, fructose and sucrose) were added into the samples to assign resonances in the ^1H -NMR spectra. Moreover, 1D ^1H -NMR spectra extracted from the

2D DOSY ^1H -NMR spectrum also helped to substantiate compound identification.

Relaxation delay was lengthened to 3 s, and 128 scans were recorded for the quantitative analysis of sibutramine, phenolphthalein, synephrine, methylsynephrine, caffeine and vitaberine. The concentrations of adulterant compounds were measured by comparing the expanded areas of their respective NMR signals with that of the internal standard for quantification TSP. The areas were determined by manual integration using TopSpin software. Each data is the mean of at least five integrations. In order to check that the NMR conditions used allowed an accurate quantitation of adulterants, a longer interval between pulses (10 s) was used in some experiments. The same concentration values were obtained, thus demonstrating that a pulse interval of 3 s for a flip angle of 35° is sufficient to record the spectra under conditions of full T_1 relaxation. Sibutramine was assayed from the singlet at 7.47 ppm, phenolphthalein from the two doublets at 7.17 and 6.84 ppm, synephrine from the two doublets at 7.23 and 6.83 ppm, methylsynephrine from the two doublets at 7.20 and 6.83 ppm, caffeine from the singlet at 7.77 ppm in formulation 12 and from the two singlets at 3.93 and 3.50 ppm in formulation 19, and vitaberine from the triplet at 4.04 ppm. The limit of quantification of the NMR assay in the recording conditions used in this study is 5 μM .

Stimulated echo bipolar gradient pulse experiments were used for 2D DOSY ^1H -NMR with a pulse field gradient length between 1.4 and 1.8 ms, a delay of 3 ms after each gradient and a diffusion delay between 50 and 100 ms. Sequence parameters were optimized in order to have the intensity of the main signals of the spectrum in the aromatic region strongly decreased (at least divided by 50) at 95% of the full gradient strength. The longitudinal eddy current delay was 20 ms, spoiler gradients were 1 ms long with a field strength of -7.92 and -6.09 G cm^{-1} and other acquisition parameters were the same as those reported above for 1D ^1H -NMR except for the relaxation delay fixed to 2 s. Forty experiments were recorded with gradient intensity linearly sampled from 5% to 95%. The gradient system had been calibrated to 46.25 G cm^{-1} at maximum intensity.

All data were processed using the Gifa 5.2 software with the inverse Laplace transform method using the Maximum Entropy (MaxEnt) algorithm. The processing parameters were 2048 points along the Laplace spectrum diffusion axis and 20,000 MaxEnt iterations. The inverse Laplace transform was computed only on the columns presenting a signal 32 times greater than the noise level of the experiment. DOSY spectra are presented with chemical shifts on the horizontal axis and diffusion coefficients expressed in $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ on the vertical axis.

Table 1. Herbal commercial formulations analysed in this study.

	Formulation	Batch number	Expiration date	Manufacturer	Country of manufacturing	Product form	Colour
1	Perfect slim cherry	2007070183	07/2009	Chun Tian	Japan	Capsule	Pink
2	9 rapide 9	Q/CL5-2004n0487	05/2009	Zhengda health food	China	Capsule	Red
3	Unknown ^a	Unknown	Unknown	Unknown	China	Capsule	Red and white
4	Unknown ^a	Unknown	Unknown	Menova	China	Capsule	Blue
5	Perfect slim grape	2007080601	08/2009	Chun Tian	Japan	Capsule	Green and white
6	Honey life	20080302	03/2010	B&H (USA)	China	Capsule	Mauve and white
7	Cider vinegar dieting	20080216	02/2010	Qinghai Oifield	China	Tablet	Yellow (with green spots)
8	Botanical slimming soft gel	20081006	10/2010	Meizitang	China	Capsule with gel	Green
9	Botanical slimming Herbs	0991-8280809	08/2010	Meizitang	China	Capsule	Orange and brown
10	2 Day Diet; Japan Lingzhi slimming formula	Unknown	12/2012	Unknown	Japan	Capsule	Purple
11	Lipro diet pills	20081020	10/2010	China Karyhen International Co.	China	Capsule	Green
12	Lida	20080924	09/2010	Kunming Dali Industry and Trade Co.	China	Capsule	Green
13	Onting quianweisu slimming herbs ^a	Unknown	03/2010	Menova	China	Capsule	Blue
14	Meekeyes ^a	9582108	Unknown	Marlian	China	Capsule	Green and white
15	Perfect slim ^a	Unknown	Unknown	Unknown	China	Capsule	Pink
16	Garslim	22	05/2011	Balsam	Syria	Tablet	Beige
17	Alattar psyllium	4	06/2009	Alattar Medical Co.	Syria	Capsule	Green
18	Alattar slimming mixture	255161M2	06/2009	Alattar Medical Co.	Syria	Powder	-
19	Hyper drive 3.0 +	110802	10/2013	ALR industries	USA	Capsule	Red
20	Elan-Sil	9.026.6	01/2001	Vitaline Ltd	UK	Capsule	White

Note: ^aThis formulation was seized by French Customs.

The 3D DQF-COSY iDOSY experiment was recorded on formulation 7. In the diffusion dimension, 28 gradient steps were used with 50 ms for the diffusion delay, 1.9 ms for the gradient pulse length and 3 ms for the recovery delay. In the COSY dimension, 8192×104 data points were used, corresponding to 0.74 s for acquisition time and 8.6 ms for the other dimension, with a spectral window of 12 ppm. The sine-shaped gradients for DQF selection, of 4.62 and 9.25 G cm^{-1} strength, were applied for 1 ms. The relaxation delay was 1.3 s and the number of scans was 8 (half-day experiment). The spectrum was processed using the NPK software (Tramesel et al. 2007) with Fourier transform in magnitude mode in the COSY dimension and with the inverse Laplace Transform method (MaxEnt algorithm) in the DOSY dimension. The processing parameters were 192 points along the diffusion axis and 20,000 MaxEnt iterations. The algorithm was computed only on the columns with a signal-to-noise ratio above 32. The corresponding 2D COSY and DOSY experiments were acquired with the 3D DQF-COSY iDOSY parameters. These experiments were analysed with the NMRnotebook package (Nmrnotebook software 2007, NMRtec; see <http://www.NMRnotebook.com>).

MS-MS analysis

An Applied System QTRAP triple-quadrupole mass spectrometer, equipped with a Turbo Ion Spray (TIS) interface and controlled by the Agilent Analyst software (version 1.4), was used for analysis. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode. Nitrogen served both as auxiliary, collision gas and nebulizer gas. The operating conditions for TIS interface were as follows: (1) in MS mode: mass range 100–600 u (1 s), step size 0.1 u; Q1 TIS MS spectra were recorded in profile mode, IS 5000 V, DP 40 V; and (2) in MS–MS mode: precursor mass 280 u; mass range 30–300 u; step size 0.1 u; MS–MS spectra were recorded in profile mode, IS 5000 V, DP 40 V, CE 20 V. All samples were dissolved in MeOH and analysed after direct introduction.

Preparation of samples for NMR analysis

The tablets were powdered (or capsule emptied) and dissolved in 5 ml of $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ 80:20 v/v (CD_3CN for formulation 8 and D_2O for formulation 16) under magnetic stirring during 10 min and then sonicated for 10 min. The suspension was then centrifuged (5 min, 3000 rpm) and the supernatant (550 μl) analysed.

For the quantitative analysis of sibutramine, phenolphthalein, synephrine, methylsynephrine, vitaberine and caffeine found in some formulations, the tablet was powdered (or capsule emptied), and

10% of the powder was dissolved in 10 ml of methanol under magnetic stirring during 15 min and then sonicated for 10 min. An aliquot of 1 ml was evaporated to dryness and the residue dissolved in 1 ml of MeOH-d_4 . TSP was added at a final concentration of 0.2 mM before the NMR analysis. The experiments were done in triplicate.

Results

Conventional $^1\text{H-NMR}$ and 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ analyses

All formulations were analysed with 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$. 2D DOSY spectra of formulations 3, 12 and 19 along with their corresponding 1D spectrum are presented in Figure 1. All the peaks of a same compound are lined up. The peaks at 3.62 and 1.99 ppm correspond to the signals of residual HOD in D_2O and CHD_2CN in acetonitrile- d_3 , respectively. As shown in Figure 1, the separation according to diffusion coefficients (D) in the diffusion dimension allows an easier identification of the components of a mixture. Indeed, in formulation 3 (Figure 1A), the active pharmaceutical ingredient (API) adulterant is sibutramine ($D = 1107 \pm 9 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) citrate ($D = 959 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) and low amounts of natural compounds including glucose, sucrose, and fatty acids ($D = 931 \pm 29$, 1006 ± 29 , and 872 ± 29 , respectively) are also detected. In formulation 12 (Figure 1B), the main signals are those of caffeine ($D = 1156 \pm 39 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) and synephrine ($D = 734 \pm 20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), whereas formulation 19 (Figure 1C) contains caffeine, methylsynephrine, vitaberine (thiamine-*O*-isobutyryl disulphide) and stearate with diffusion coefficients of 1288 ± 93 , 851 ± 41 , 624 ± 9 and $918 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, respectively.

All the ingredients detected in the herbal drugs studied are reported in Table 2, which shows the comparison between the indications provided by the manufacturer and the compounds found in each formulation. Several unexpected actives, sibutramine (formulations 1–5, 7–11, 13–15), phenolphthalein (formulations 1, 5, 7, 9, 15) synephrine and caffeine (formulation 12), were found. The unambiguous identification of the components in the herbal formulations analysed was achieved by comparison of 1D $^1\text{H-NMR}$ data of standards, addition of authentic standards, and comparison of 1D NMR spectra extracted from the 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ spectrum with those of authentic standards (Figure 1D).

The NMR spectral data of sibutramine measured in $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) are reported in Table 3. The $^1\text{H-NMR}$ resonances were assigned by 2D NMR (gCOSY, gHSQC, gHMBC, gNOESY) and 1D selective NOE experiments. The chemical shifts and coupling constants of all the other ingredients are reported in Table 4.

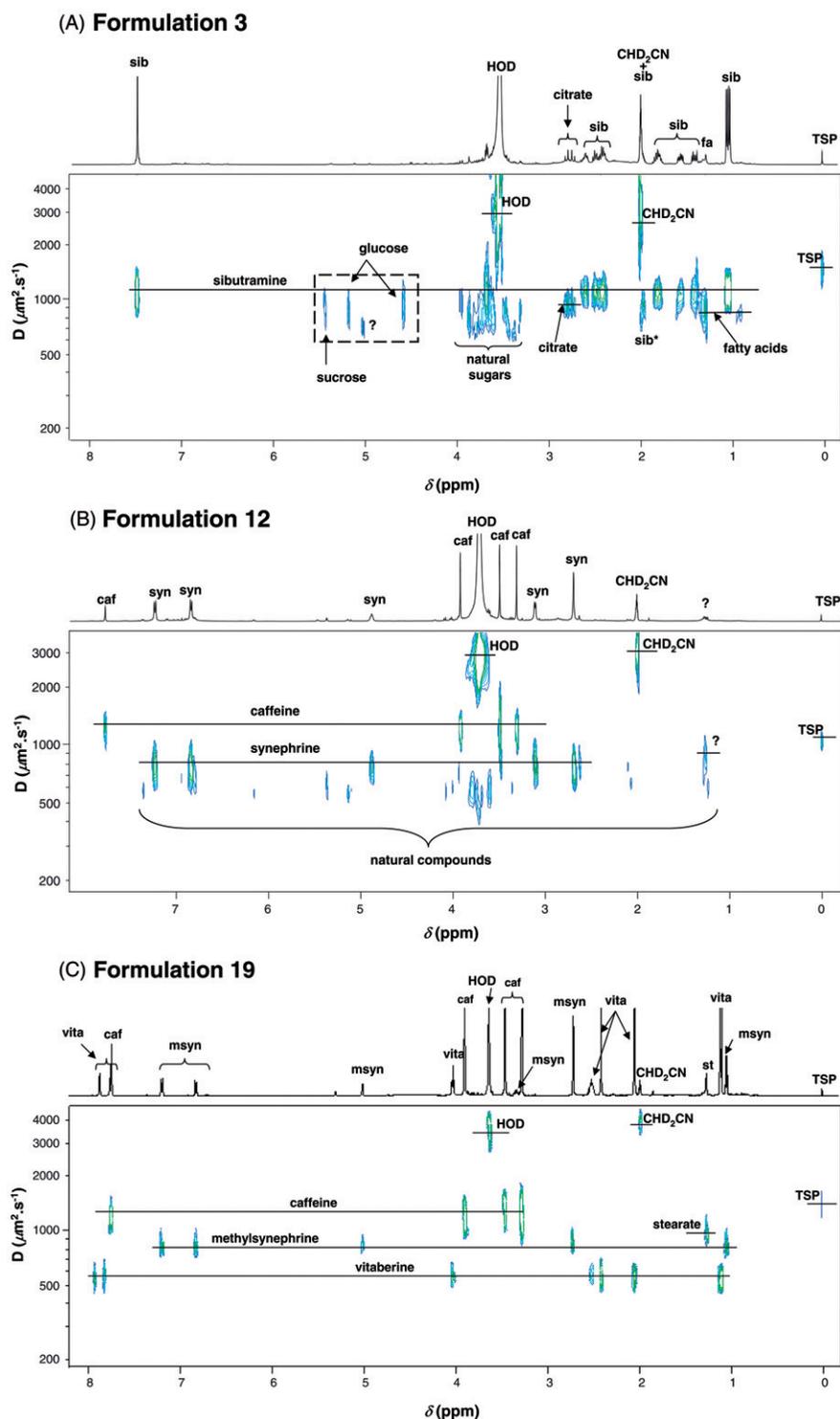


Figure 1. 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ spectra recorded in $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80/20) of formulations 3 (A), 12 (B) and 19 (C). (D) Comparison of 1D $^1\text{H-NMR}$ spectra of caffeine (D1) and vitaberine (D2) extracted from the 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ spectrum of formulation 19 with those of authentic standards. sib, Sibutramine; caf, caffeine; syn, synephrine; msyn, methysynephrine; vita: vitaberine; fa, fatty acids; st, stearate; TSP, sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate (internal standard); ?, unknown; sib* means that the diffusion coefficient of this sibutramine signal is lower due to its superimposition with CHD_2CN , which affects DOSY processing. A deeper section of some signals is shown in box with dotted lines.

Even if sensitivity is not an issue with respect to adulteration, we determined that in the experimental conditions used in this study (1 h of recording), 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ allows an accurate determination

of diffusion coefficients for compounds at a concentration of $50\ \mu\text{M}$. The limit of detection corresponds to $10\ \mu\text{M}$ with only CH_2 and CH_3 signals being detected.

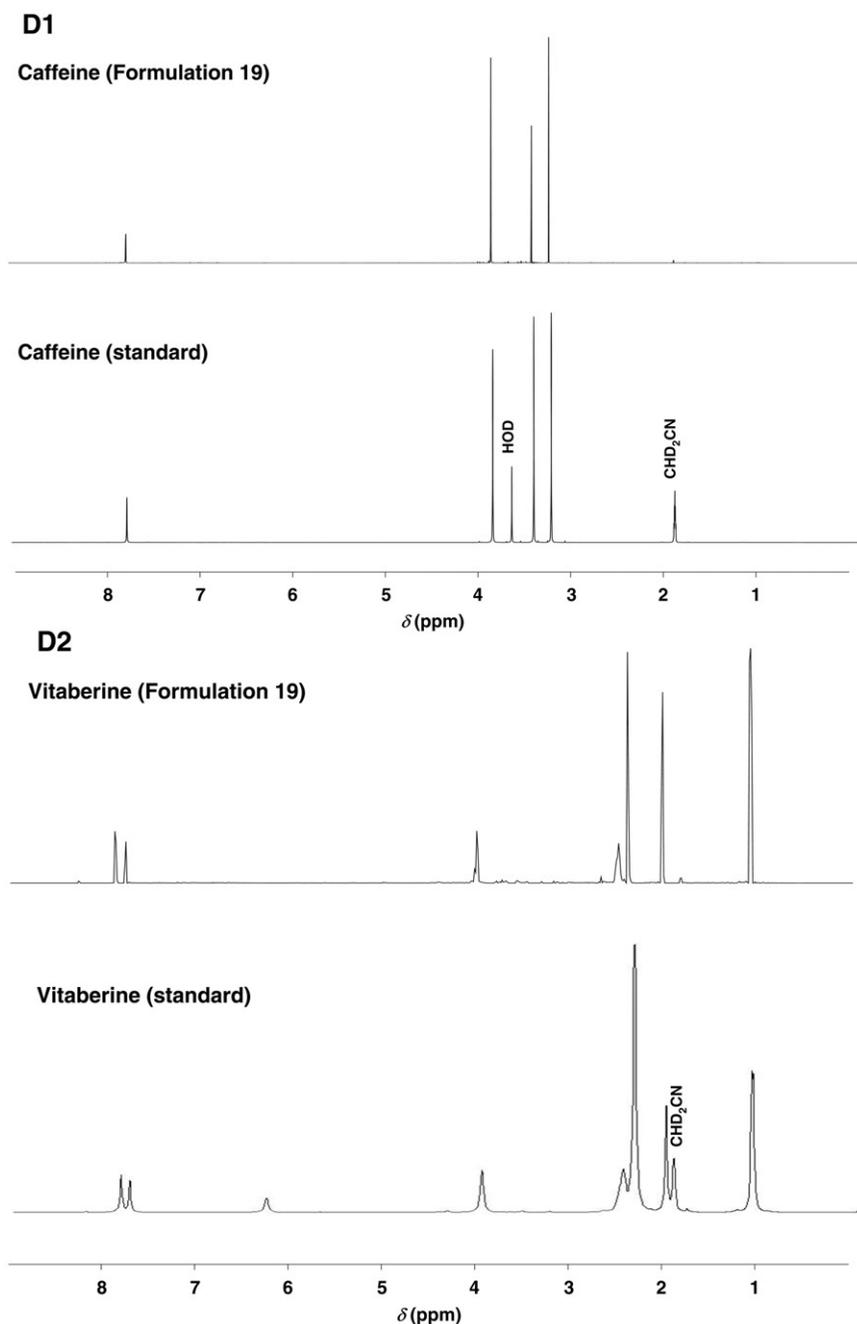


Figure 1. Continued.

3D DOSY-COSY $^1\text{H-NMR}$ analysis

Figure 2 illustrates the different NMR spectra obtained in the 3D DOSY-COSY $^1\text{H-NMR}$ experiment applied to formulation 7. First, the classical 2D DOSY (Figure 2A) and COSY-DQF (Figure 2B) spectra are shown. In the COSY spectrum, diagonal signals and off-diagonal cross peaks of sibutramine, phenolphthalein, glucose and sucrose are observed. Other spectra (Figures 2C and 2D) are those of the projections from the 3D DOSY-COSY experiment.

The main interest of this 3D experiment is to extract the COSY spectrum of each component of the mixture from a selected line in the DOSY spectrum. For example, Figure 2C shows the COSY projection of phenolphthalein at $D = 990 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$; typical cross peaks of aromatic signals are detected for this compound while the on-diagonal signal from aromatic protons of sibutramine has disappeared. The COSY projection corresponding to $D = 711 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Figure 2D) shows exclusively the signals of sucrose without any signal from phenolphthalein or anomeric protons

Table 2. Comparison of formulation composition with indications provided by the manufacturer.

Formulation	Indications provided by the manufacturer	Compounds found
1 Perfect slim cherry	Only natural compounds	Sibutramine Phenolphthaleine Vitamin C ^a Very low amounts of natural compounds including glucose, fructose, fatty acids
2 9 rapide 9	Only natural compounds	Sibutramine Very low amounts of natural compounds including fatty acids
3 Unknown	No indication ^b	Sibutramine citrate Low amounts of natural compounds including glucose, fructose, fatty acids
4 Unknown	No indication ^b	Sibutramine Low amounts of natural compounds including glucose, fructose, fatty acids
5 Perfect slim grape	Only natural compounds	Sibutramine Phenolphthaleine Very low amounts of natural compounds including glucose, fructose, fatty acids
6 Honey life	L-carnitine L-tartrate Natural compounds (Konjac flour, Cassia seed)	Carnitine tartrate Low amounts of natural compounds including sugars, fatty acids and vitamin B3
7 Cider vinegar dieting	Carnitine Flavone glycoside Oligosaccharide	Sibutramine Phenolphthaleine Stearate Sucrose Very low amounts of natural sugars
8 Botanical slimming soft gel	Only natural compounds	Sibutramine Soybean oil
9 Botanical slimming herbs	Only natural compounds	Sibutramine Phenolphthaleine Very low amounts of natural compounds including glucose, sucrose, fatty acids
10 2 Day Diet; Japan Lingzhi slimming formula	Only natural compounds	Sibutramine Very low amounts of natural compounds including glucose, fatty acids
11 Lipro diet pills	Only natural compounds (Chinese herbs)	Sibutramine Stearate Very low amounts of natural sugars including glucose
12 Lida	Only natural compounds (Yunnan herbs)	Caffeine Synephrine Low amount of natural compounds

(continued)

Identical to formulation 15

Identical to formulation 13

Very similar to formulation 1 except that it contains no vitamin C

No carnitine

Soybean oil is used to prepare the gel

Table 2. Continued.

Formulation	Indications provided by the manufacturer	Compounds found
13 Onting quianweisu slimming herbs	No indication ^b	Sibutramine Low amounts of natural compounds including glucose, fructose, fatty acids
14 Meekeyes	No indication ^b	Sibutramine Sucrose Fatty acid High amount of sinapine and very low amounts of other natural compounds
15 Perfect slim	No indication ^b	Sibutramine Phenolphthaleine Vitamin C ^a Very low amounts of natural compounds including glucose, fructose, fatty acids Hydroxycitric acid Citric acid
16 Garslim	Fruit extracts with 50% hydroxycitric acid and citric acid	
17 Alattar psyllium	Mucilages, fatty oil, iridoide monoterpenes	Fatty acids including stearic and linoleic acids
18 Alattar slimming mixture	Only natural compounds	Only natural compounds including caffeine, polyphenols, sugars, fatty acids
19 Hyper drive 3.0	Methylsynephrine Xanthines Vitaberine Lipoic acid Tyrosine ethyl ester Propionylcarnitine ethyl ester ^c	Methylsynephrine Caffeine Vitaberine Stearate Very low amounts of natural compounds
20 Elan-Sil	Natural compounds L-carnitine L-tartrate Vitamin C Vitamin E acetate Vitamin B1 Vitamin B2 Vitamin B3 Vitamin B5 (Ca pantothenate) Vitamin B6 Vitamin B7 Vitamin B9 Vitamin B12 Mg salts of fatty acids	Carnitine Vitamin C ^a Vitamin E acetate Vitamin B1 Vitamin B3 Vitamin B5 Vitamin B6 Stearate

Notes: ^aVitamin C is slightly unstable in the extraction conditions used. It was thus detected as a mixture of ascorbic and dehydroascorbic acids.

^bThis formulation was provided by French Customs with no packaging.

^cIncorrect chemical nomenclature as propionylcarnitine is the propionic ester of carnitine.

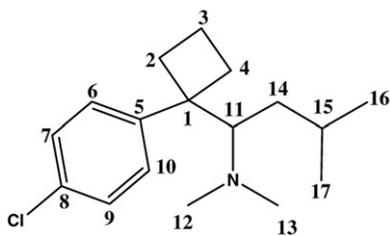
The amounts of lipoic acid and tyrosine ethyl ester are probably too low to be detected. Both compounds were undetected with ¹H-NMR or MS

Tartrate was not detected.

The amounts of vitamins B2, B7, B9 and B12 are too low to be detected

Table 3. NMR characteristics of sibutramine detected in the herbal formulations analysed. Spectra were recorded in CD₃CN:D₂O (80:20).

Sibutramine



Atom number	δ ¹ H (ppm) ^a	Multiplicity ^b (<i>J</i> in Hz)	δ ¹³ C (ppm)
1			49.2
2 or 4	2.60 (1H syn aromatic ring)	m	32.5
	2.49 (1H anti aromatic ring)	m	
3	1.98 (1H)	m	15.5
	1.78 (1H)	m	
4 or 2	2.37 (1H syn aromatic ring)	m	33.7
	2.41 (1H anti aromatic ring)	m	
5		–	140.2
6,10	7.47	s	128.7
7,9			129.9
8			132.9
11	3.67	t (6.3)	71.7
12 or 13	2.19	broad s	39.6 ^c
13 or 12	2.81	broad s	47.0 ^c
14	1.53 (1H)	m	33.5
	1.39 (1H)	m	
15	1.78	m	25.4
16 or 17	1.01	d (6.5)	22.0
17 or 16	1.04	d (6.5)	21.2

Notes: ^aThe value given is the chemical shift of the centre of the signal.

^bs, Singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet.

^cThe chemical shift of this carbon was measured in a spectrum recorded in CD₃CN.

from α - or β -glucose. These spectra highlight the interest of 3D experiment as virtual separation provided by DOSY acquisition can lead to structural determination by extraction of COSY spectra.

Quantitative analysis

The contents of sibutramine and phenolphthalein in the herbal drugs analysed were measured by NMR (Table 5). Eight formulations (2, 3, 4, 8, 10, 11, 13, 14) contain sibutramine alone at doses ranging from 4.4 to 30.5 mg/capsule. Five formulations (1, 5, 7, 9, 15) contain sibutramine (from 5.0 to 19.6 mg/capsule or tablet) and phenolphthalein (from 4.4 to 66.1 mg/capsule). Formulation 12 contains 19.5 ± 0.5 and 10.0 ± 0.5 mg/capsule of synephrine and caffeine, respectively. Formulation 19 contains 38.3 ± 0.9 , 184.9 ± 5.6 and 75.4 ± 1.6 mg/capsule of methylsynephrine, caffeine and vitaberine, respectively.

Mass spectrometry

The aim of mass spectrometry experiments was to cross-validate NMR data. MS/MS mass spectrometry with ESI ionization was carried out in order to confirm the presence of sibutramine and to investigate the presence of its previously described mono- or di-desmethylated analogues (Wang et al. 2008). Molecular $[M + H]^+$ ions corresponding to sibutramine, *N*-mono-desmethylsibutramine and *N*-di-desmethylsibutramine were searched at m/z 280, 266 and 252, respectively (Wang et al. 2008). Only sibutramine was found. MS/MS was then carried out on the m/z 280 ion giving characteristic fragments at m/z 153, 139, and 125. The presence of sibutramine was thus confirmed by MS/MS in 13 formulations (1–5, 7–11, and 13–15). MS was also used to confirm the presence of methylsynephrine, vitaberine and caffeine ($[MH]^+$ ions at m/z 182, 703, and 195 respectively) in formulation 19 and synephrine ($[MH]^+$ ion at m/z 168) in formulation 12.

Table 4. $^1\text{H-NMR}$ characteristics of the main signals of ingredients found in herbal formulations (except sibutramine given in Table 3).

Compound	$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm) ^a and multiplicity ^b (J , Hz)
Phenolphthalein	7.93 d (7.5; H8), 7.79 t (7.5; H6), 7.63 t (7.0; H7), 7.63 d (7.5; H6), 7.17 d (8.5; 4 H11), 6.84 d (8.5; 4 H12)
Synephrine	7.23 d (8.5; Ar), 6.83 d (8.5; Ar), 4.70 dd (4.3, 8.8; CHOH), 2.70 ABd system (12.3, 8.8, 4.3; CH_2), 2.36 s (CH_3)
Methylsynephrine ^c	7.20 d (8.5; Ar), 6.83 d (8.5; Ar), 5.00 d (3.1; CHOH), 3.34 qd (3.1, 6.7; CHNH), 2.71 s (CH_3NH), 1.04 d (6.7; CH_2CH)
Vitaberine (sulbutiamine)	7.86 s (H pyrim), 7.77 s (CHO), 4.45 centre of a very broad s (CH_2N), 4.04 t (6.3; CH_2O), 2.55 sept (7.0; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.52 broad t (6.3; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.39 s (CH_3 pyrim), 2.05 s ($\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 1.12 d (7.0; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)
Riboflavin	8.00 s (Ar), 7.99 s (Ar), 4.93 m (CH_2N), 4.37 m (CHOH), 3.87 m (CHOH), 3.79 m (CH_2OH), 3.66 m (CHOH), 2.58 s ($\text{CH}_3\text{-Ar}$), 2.48 s ($\text{CH}_3\text{-Ar}$)
Caffeine	7.77 s (H), 3.93 s (CH_3), 3.50 s (CH_3), 3.32 s (CH_3)
Carnitine	4.56 app q (7.0; CHOH), 3.45–3.31 m (CH_2N^+), 3.19 s ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$), 2.62–2.53 m (CH_2COOH)
Lipoic acid	3.62 m (H3), 3.20 m (H5 α), 3.13 m (H5 β), 2.46 sext (6.2; H4 α), 2.30 t (7.4; H9), 1.91 sext (6.7; H4 β), 1.72 m (H6 α), 1.61 m (H6 β , H8), 1.44 m (H7)
Stearate	2.21 t (7.5; CH_2CO), 1.53 quin (6.9; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.27 broad s (14 CH_2), 0.98 t (6.9; CH_3)
Linoleic acid	5.36 m (4 = CH), 2.78 t (6.6; = $\text{CH-CH}_2\text{-CH=}$), 2.26 t (7.5; = $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 2.06 q (6.8; 2 - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=}$), 1.55 quin (6.9; = $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), 1.32 m (7 CH_2), 0.89 t (6.9; CH_3)
Sinapine ^d	7.65 d (15.9; Ar- CH=), 6.96 s (Ar), 6.48 d (15.9; = CH-COO-), 4.57 m (O- CH_2), 3.87 s (O CH_3), 3.68 m (- $\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3^+$), 3.17 s ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$)
Citrate	2.75 AB system (17.3; CH_2)
Vitamin C	4.78 d (2.0; CH-O-), 3.89 td (X part of the ABX system) (2.0, 6.7; CHOH), AB part of the ABX system: $\delta_A = 3.62$, $\delta_B = 3.60$ ($J_{AB} = 11.2$, $J_{AX} = J_{BX} = 6.7$; CH_2OH)
Dehydroascorbic acid	4.58 s (CHO), 4.43 dd (5.6, 3.1; CHOH), 4.21 dd (5.6, 10.2; 1H of CH_2OH), 4.05 dd (3.1, 10.2; 1H of CH_2OH)
Vitamin B1 (thiamine)	9.56 s (H thiazole ring), 7.97 s (H pyrimidine ring), 5.47 s (CH_2N^+), 3.82 t (5.6; CH_2OH), 3.13 t (5.6; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.61 s (CH_3), 2.50 s (CH_3)
Vitamin B3 (niacin)	8.98 d (2.1; H2), 8.70 dd (4.9, 1.7; H6), 8.23 td (8.0, 1.7; H4), 7.52 dd (4.9, 8.0; H5)
Vitamin B5 (pantothenic acid)	3.90 s (CHOH), 3.46–3.34 m (CH_2OH and CH_2NHCO), 2.33 t (6.7; CH_2COOH), 0.89 s (CH_3), 0.88 s (CH_3)
Vitamin B6 (pyridoxine)	8.08 s (H), 5.04 s (CH_2OH), 4.67 s (CH_2OH), 2.59 s (CH_3)
Vitamin E (tocopherol acetate)	2.62 t (6.8; = C-CH_2), 2.31 s ($\text{CH}_3\text{-COO-}$), 2.08 s ($\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.99 s ($\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.82 m (O- C-CH_2), 1.53 m (HC-CH_3), 1.41 m (HC-CH_3), 1.27 m (CH_2), 1.25 s ($\text{CH}_3\text{-C-O}$), 1.16 m (CH_2), 1.09 m (CH_2), 0.88 d (6.6; HC-CH_3), 0.86 d (6.6; HC-CH_3)
α/β -Glucose	5.14 d (3.5; H1 α), 4.53 d (8.0; H1 β), 3.84–3.71 m, 3.71–3.60 m, 3.45–3.28 m, 3.15 t (8.0; H2 β)
Fructose	4.06–3.99 m, 3.99–3.85 m, 3.85–3.68 m, 3.67–3.42 m
Sucrose ^e	5.36 d (3.5; g1), 4.10 d (8.5; f3), 4.00 t (8.5; f4), 3.83–3.67 m (f5, g5, f6, g6, g3), 3.61 AB system (12.5; f1), 3.48 dd (3.5, 10.0; g2), 3.38 t (9.5; g4)

Notes: ^aSpectral data were measured from authentic standards in $\text{CD}_3\text{CN:D}_2\text{O}$ (80:20).

^bs, Singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; td, doublet of triplet; q, quadruplet; quin, quintuplet; sext, sextuplet; sept, septuplet; m, multiplet; app, apparent.

^cChemical shifts were measured in the spectrum of formulation 19.

^dThe structure of sinapine (choline ester of sinapic acid) was determined with 1D and 2D ^1H and $^{13}\text{C-NMR}$ experiments on formulation 14 and confirmed by MS ($[\text{M}^+]$ 310).

^eg, Glucose; f, fructose.

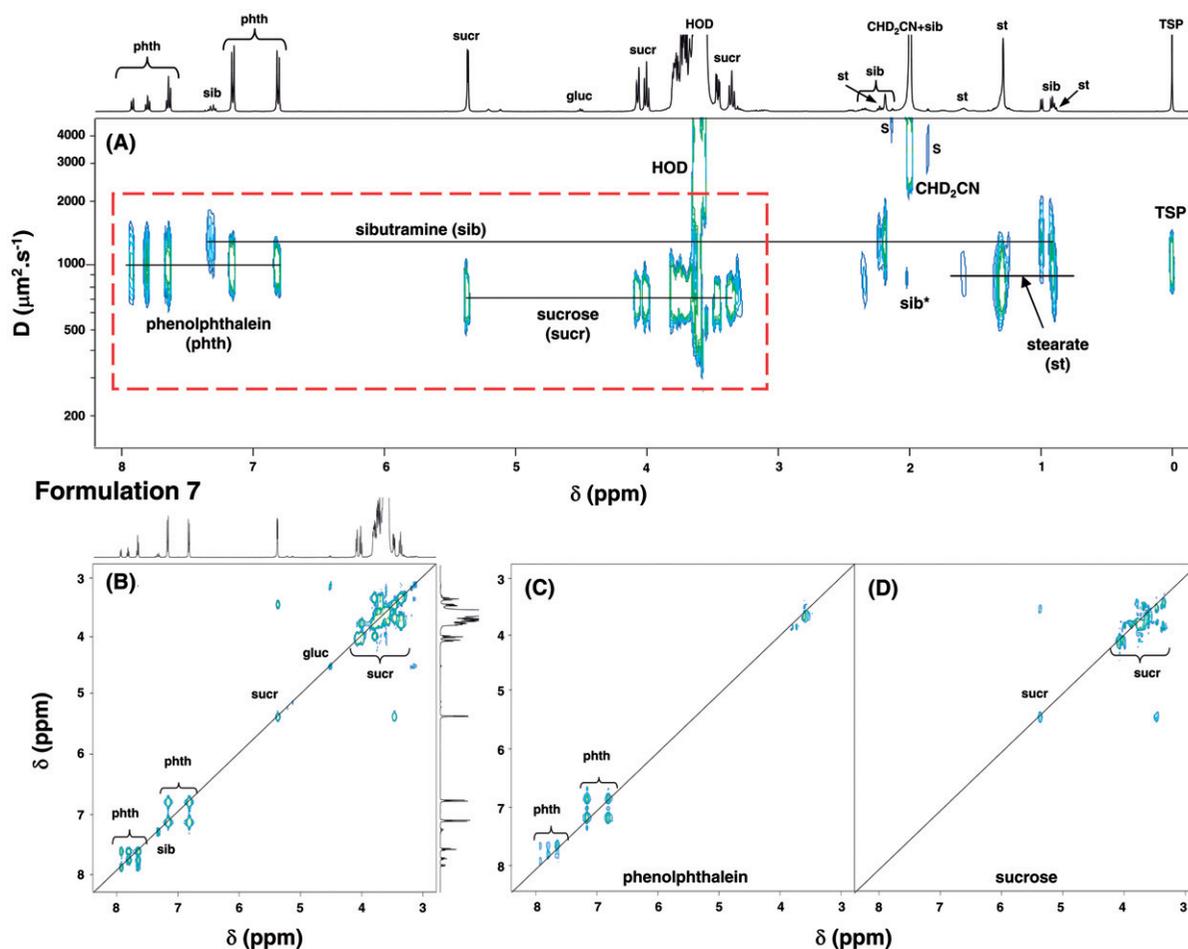


Figure 2. NMR spectra of formulation 7 in $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80/20). (A) 2D DOSY ^1H spectrum; (B) COSY-DQF spectrum; COSY extractions from 3D DOSY-COSY experiment at (C) $D = 990 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, (D) $D = 711 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. sib, Sibutramine; phth, phenolphthalein; sucrose, sucrose; gluc, glucose; st, stearate; S, satellite signals from CHD_2CN ; TSP, sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate (internal standard); sib* means that the diffusion coefficient of this sibutramine signal is lower due to its superimposition with CHD_2CN , which affects DOSY processing.

Table 5. Amounts of adulterant sibutramine and phenolphthalein found in claimed herbal medicines analysed in this study.

Formulation number	Sibutramine mg/capsule or tablet, mean \pm SD ($n = 3$)	Phenolphthalein mg/capsule or tablet, mean \pm SD ($n = 3$)
1	13.1 \pm 0.3	47.0 \pm 3.0
2	4.4 \pm 0.3	–
3	23.3 \pm 0.1	–
4	15.6 \pm 0.5	–
5	19.6 \pm 0.5	66.1 \pm 1.4
7	5.0 \pm 0.1	36.2 \pm 0.5
8	12.7 \pm 0.2	–
9	12.0 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2
10	10.6 \pm 0.3	–
11	30.5 \pm 0.1	–
13	15.1 \pm 0.3	–
14	14.0 \pm 0.7	–
15	13.7 \pm 0.6	40.8 \pm 1.3

Note: SD, standard deviation.

Discussion

To date, identification of synthetic drugs adulterating HM to inhibit appetite and achieve weight loss using NMR and more specifically 2D DOSY ^1H -NMR has not been reported. The objective of this study was to apply this method to analyse the content of 20 different HM or DS.

Chromatographic methods are preferred by most analysts for mixture analysis as they are very common, easy to handle, quantitative, sensitive, relatively cheap and do not require highly trained personnel. Nevertheless, NMR has also several advantages; it is non-selective, quantitative, highly powerful for structural elucidation and it requires no prior knowledge of the structures of the various components present in a mixture. 2D DOSY ^1H -NMR allows the virtual separation of several components of a mixture in a single run based on the difference in their translational self-diffusion coefficients (Figure 1). Moreover, DOSY experiments do not need complicated set-up

Table 6. Adulterants found in herbal products or dietary supplements marketed as slimming products reported in literature.

Reference	Analytical methods for detection	Number of formulations analysed	Active pharmaceutical ingredients detected	Other compounds detected
Tseng et al. (2000)	GC-MS	4	Mazindol Clobenzorex Diazepam Phentermine Caffeine Sibutramine	
Jung et al. (2006)	GC-MS HPLC-DAD	1	Sibutramine	
Blachut et al. (2007) Sein Anand and Chodorowski (2007)	GC-MS GC-MS	1 (Lida) 1 (Meizitanc)	<i>N</i> -desmethylsibutramine Sibutramine	
Bogusz et al. (2006)	LC-ESI-MS/MS	1	Fenfluramine Phentermine Caffeine Sibutramine <i>N</i> -desmethylsibutramine <i>N</i> -didesmethylsibutramine Homosibutramine	
Zou et al. (2007)	LC-MS/MS LC-TOF-MS	1	Phenolphthalein Sibutramine Mazindol Sennosides A and B Bisacodyl Hydrochlorothiazide	
Date et al. (2008)	LC-ESI-MS/MS	10	Sibutramine <i>N</i> -didesmethylsibutramine Sibutramine Phenolphthalein <i>N</i> -desmethylsibutramine	
Huang et al. (2008)	LC-ESI-MS	15	Fenfluramine Sibutramine	
Wang et al. (2008)	LC-ESI-MS	6	Sibutramine Phenolphthalein <i>N</i> -desmethylsibutramine	
Chen et al. (2009)	QTRAP LC-MS/MS	18	Fenfluramine Sibutramine Phenolphthalein	
Cianchino et al. (2008)	CE	4	Ephedrine Norephedrine Furosemide Caffeine	
Present study	¹ H-NMR and 2D DOSY ¹ H-NMR	20	Sibutramine Phenolphthalein Synephrine Methylsynephrine Vitaberin Caffeine	Carnitine Vitamin C Dehydroascorbic acid Vitamins B1, B3, B5, B6, E Glucose Fructose Sucrose Stearate Linoleate Citrate Hydroxycitrate Tartrate Sinapine

procedures or separation steps and the method can be used routinely. This technique has been used successfully for analysing several kinds of counterfeit drugs (Trefi et al. 2008; Nyadong et al. 2009). Table 6 shows a comparison on information obtained with various analytical methods on slimming herbal drug composition and highlights the interest of DOSY NMR for a global analysis of these formulations.

Among the 20 formulations analysed, 2 were strictly herbal (formulations 17 and 18), and 4 had a composition corresponding to declared ingredients on the packaging or the leaflet (formulations 6, 16, 19, 20). The others were all adulterated. Thirteen formulations (1–5, 7–11, 13–15) contained sibutramine alone or in combination with phenolphthalein (1, 5, 7, 9, and 15). The two metabolites of sibutramine, *N*-mono- and

N-di-desmethylsibutramine, previously described by some authors (Blachut et al. 2007; Lai et al. 2007; Yuen et al. 2007; Huang et al. 2008) as possible adulterants in slimming dietary supplements were not detected in our samples neither with NMR nor with MS and MS/MS analyses. The amount of sibutramine found in adulterated formulations ranged from 4.4 (formulation 2) to 30.5 mg/capsule (formulation 11). The recommended daily dose is 5 to 15 mg, 15 mg being the maximum daily dose (de Simone and D'Addeo 2008). Three formulations (3, 5 and 11) were thus overdosed, which poses a serious health risk to consumers and particularly a cardiovascular risk as an increase in systolic blood pressure has been noticed in patients receiving sibutramine at the non recommended doses of 20 or 30 mg (Narkiewicz 2002). Several cases of mild to severe poisoning due to herbal slimming medicines adulterated with sibutramine (Lida; Jung et al. 2006; Müller et al. 2009), Ever Youth and unknown (Yuen et al. 2007), Meizitanc (Sein Anand and Chodorowski 2007)) have been recently reported. It is interesting to point out that during the reviewing process of this article, the European Medicines Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use has concluded that the benefits of sibutramine do not outweigh its risks, and that all marketing authorizations for medicines containing sibutramine should be suspended throughout Europe (see <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/referral/sibutramine/3940810en.pdf>).

Other actives found may also cause serious adverse effects. Phenolphthalein is a laxative that was withdrawn as a medicine several years ago after concerns about carcinogenicity (Anon 1999). Moreover, interaction profiles are unknown for the combination sibutramine/phenolphthalein. After the ban on ephedrine in 2004, manufacturers changed to using the weaker stimulant synephrine that has purported thermogenic and lipolytic properties due to its α -adrenergic agonist property (Haaz et al. 2006). The safety of synephrine is controversial but it could pose cardiovascular health risks (Haaz et al. 2006), especially in combination with caffeine (Haller et al. 2005). Formulation 12, claimed as purely herbal, contains both compounds and formulation 19 contains methylsynephrine (*para*-hydroxyephedrine) in combination with a high dose of caffeine, a potentially hazardous combination.

Conclusion

This study presents a new application of 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ for the analysis of herbal medicines (HM) and dietary supplements (DS), which are undeniable complex mixtures. Among the 20 formulations marketed for weight loss studied, 13 were adulterated with

sibutramine alone or with a combination of sibutramine and phenolphthalein. Adulteration of 'natural herbal medicines' with undeclared synthetic drugs is a common and dangerous phenomenon and all the analytical methods that ensure the quality and safety of these products have thus to be developed. In this context, 2D DOSY $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy is a powerful method for providing a multivariate fingerprint of a very complex mixture especially in situations where the identity of the components is not known beforehand as it permits to consider the drug preparation as a whole. The technique should be now considered as a useful and complementary tool among a standard 2D NMR analytical package. Moreover, its evolution towards 3D DOSY-COSY experiments noticeably increases its interest as structural data are easily obtained.

Acknowledgements

The authors wish to thank Marie-José Parent and Dr Saleh Trefi for helpful discussion on herbal drug adulteration; and Catherine Claparols for mass spectrometry experiments.

References

- Anon. 1999. Laxative drug products for over-the-counter human use. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. Fed Regist. 64:4535–4540.
- Blachut D, Siwinska-Ziolkowska A, Szukalski B, Wojtasiewicz K, Czarnocki Z, Kobylecka A, Bykas-Strekowska M. 2007. Identification of *N*-desmethylsibutramine as a new ingredient in Chinese herbal dietary supplements. *Probl Forensic Sci.* 70:225–235.
- Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. 2006. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *J Pharm Biomed Anal.* 41:554–564.
- Chen Y, Zhao L, Lu F, Yu Y, Chai Y, Wu Y. 2009. Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. *Food Addit Contam.* 26:595–603.
- Cianchino V, Acosta G, Ortega C, Martinez LD, Gomez MR. 2008. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chem.* 108:1075–1081.
- Date H, Toyota A, Terauchi M, Sugimura M, Matsuo T, Mochiike C. 2008. Rapid determination of medical components found in the health food for weight loss by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Yakugaku Zasshi.* 128:811–817.
- de Simone G, D'Addeo G. 2008. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18:337–341.
- Haaz S, Fontaine KR, Cutter G, Limdi N, Perumean-Chaney S, Allison DB. 2006. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obes Rev.* 7:79–88.

- Haller CA, Benowitz NL, Jacob P. 2005. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. *Am J Med.* 118:998–1003.
- Huang Z, Xiao S, Luo D, Chen B, Yao S. 2008. Simultaneous determination of sibutramine and N-desmethylsibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC-ESI-MS. *J Chromatogr Sci.* 46:707–711.
- Jung J, Hermanns-Clausen M, Weinmann W. 2006. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. *Forensic Sci Int.* 161:221–222.
- Lai KC, Liu YC, Tseng MC, Lin YL, Lin JH. 2007. Isolation and identification of a sibutramine analogue in a healthy food for weight loss. *J Food Drug Anal.* 15:20–24.
- Lau AJ, Holmes MJ, Woo SO, Koh HL. 2003. Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 31:401–406.
- Liang Q, Qu J, Luo G, Wang Y. 2006. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 40:305–311.
- Liu SY, Woo SO, Koh HL. 2001. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Anal.* 24:983–992.
- Lu F, Li S, Le J, Chen G, Cao Y, Qi Y, Chai Y, Wu Y. 2007. A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy. *Anal Chim Acta.* 589:200–207.
- Müller D, Weinmann W, Hermanns-Clausen M. 2009. Chinese slimming capsules containing sibutramine sold over the Internet: a case series. *Dtsch Arztebl Int.* 106:218–222.
- Narkiewicz K. 2002. Sibutramine and its cardiovascular profile. *Int J Obes.* 26:S38–S41.
- Nyadong L, Harris GA, Balayssac S, Galhena AS, Malet-Martino M, Martino R, Parry RM, Wang MD, Fernandez FM, Gilard V. 2009. Combining two-dimensional diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy, imaging desorption electrospray ionization mass spectrometry and direct analysis in real time mass spectrometry for the integral investigation of counterfeit pharmaceuticals. *Anal Chem.* 81:4803–4812.
- Sein Anand J, Chodorowski Z. 2007. Side effects after the usage of Chinese dieting product Meizitanc. *Przegl Lek.* 64:346–347.
- Tramesel D, Catherinot V, Delsuc MA. 2007. Modeling of NMR processing, toward efficient unattended processing of NMR experiments. *J Magn Reson.* 188:56–67.
- Trefi S, Routaboul C, Hamieh S, Gilard V, Malet-Martino M, Martino R. 2008. Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis®) by ¹H-NMR, 2D DOSY ¹H-NMR and Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 47:103–113.
- Tseng MC, Tsai MJ, Lin JH, Wen KC. 2000. GC/MS analysis on anorectics adulterated in traditional Chinese medicines. *J Food Drug Anal.* 8:315–330.
- Wang J, Chen B, Yao S. 2008. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. *Food Addit Contam.* 25:822–830.
- Yuen YP, Lai CK, Poon WT, Ng SW, Chan AYW, Mak TWL. 2007. Adulteration of over-the-counter slimming products with pharmaceutical analogue – an emerging threat. *Hong Kong Med J.* 13:216–220.
- Zhu X, Zhang Z, Lu F, Wu Y, Qi Y. 2009. Modified local straight-line screening to detect synthetic drugs in adulterated herbal medicines. *Appl Spectrosc.* 63:471–476.
- Zou P, Oh SS-Y, Kiang K-H, Low M-Y, Bloodworth BC. 2007. Detection of sibutramine, its two metabolites and one analogue in a herbal product for weight loss by liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21:614–618.

II.3) Autres formulations

II.3.1) Matériels

D'autres compléments alimentaires annoncés 100 % naturels ainsi que des médicaments ont été analysés. La liste des formulations analysées est présentée dans le Tableau 3. Les formulations 1 et 2, fournies par l'Afssaps, sont des compléments alimentaires utilisés comme amaigrissants. Les formulations 3 à 5 sont des compléments alimentaires conseillés dans des cas de dysfonctionnement érectile. Elles ont été achetées via internet. La formulation 6, fournie par l'Afssaps, est un anti-inflammatoire non stéroïdien. La formulation 7, fournie par l'Afssaps, est un médicament antipaludique. Enfin, les formulations 8 à 10 sont des médicaments utilisés pour le traitement du dysfonctionnement érectile. Elles ont été fournies par l'agence suisse du contrôle des médicaments, Swissmedic.

N° de formulation	Nom de la formulation	Numéro de lot	Date de péremption	Laboratoire	Pays	Principes actifs annoncés
Compléments alimentaires						
1	Métabodrène	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	naturels
2	Lida	10122008	Décembre 2010	Non précisé	Non précisé	naturels
3	Ierect	7164	Décembre 2012	Kedozze	Suède	naturels
4	Man power	Non précisé	Décembre 2012	Non précisé	Estonie	naturels
5	Start up for him	728070714	Septembre 2012	Lab-startup	Union européenne	naturels
Médicaments						
6	Piroxicam Nebula	20050227	Février 2007	Non précisé	Chine	piroxicam (anti-inflammatoire non stéroïdien)

7	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Africain	quinine (anti-paludéen)
8	Viagra	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	sildénafil (inhibiteur PDE-5)
9	Viagra	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	sildénafil (inhibiteur PDE-5)
10	Cialis	Non précisé	Non précisé	Non précisé	Non précisé	tadalafil (inhibiteur PDE-5)

Tableau 3. Liste des formulations analysées

II.3.2) Mode opératoire

Les formulations 1, 2, 3, 4, 5 et 10 sont analysées par RMN ^1H DOSY et quantifiées par RMN ^1H en suivant les conditions opératoires décrites dans la publication « Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY ^1H -NMR » page 50. Pour les formulations 6, 7, 8 et 9, le protocole est le même, seul le solvant change. Les formulations 8 et 9 sont dissoutes dans du D_2O et les formulations 6 et 7 sont dissoutes dans du méthanol deutéré, MeOD.

La quantification de l'éthanol dans la formulation 4 a été réalisée selon le protocole suivant : 5 % de la formulation est solubilisé dans 5 mL de MeOD sous agitation magnétique pendant 40 minutes puis placé dans un bain à ultrason pendant 5 minutes. Après centrifugation, 500 μL de surnageant sont analysés avec 50 μL de TSP à 5 mM.

La formulation 6 est une solution dans l'éthanol. Le protocole est alors différent. Une solution mère est préparée en diluant 50 μL de la formulation dans 600 μL de MeOD. L'échantillon est agité sous vortex pendant 5 minutes. 100 μL de la solution mère sont dilués dans 1 mL de MeOD. L'échantillon est agité sous vortex pendant 5 minutes. 500 μL de la solution fille sont analysés par RMN avec 50 μL de TSP à 10 mM. Suite aux premières analyses, un second mode opératoire fut établi : afin d'éliminer l'éthanol et autres composés volatiles, 100 μL de la formulation 6 sont placés une nuit au speed-vac puis le résidu est repris dans 600 μL de chloroforme. Cet échantillon a été caractérisé par spectrométrie RMN (^1H , Jmod, COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C et HMBC ^1H - ^{13}C), par spectrométrie MS-MS et par

spectrométrie IR. Les paramètres d'acquisition RMN sont ceux décrits dans la publication « Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY $^1\text{H-NMR}$ » page 50.

Les spectres de masse sont réalisés sur spectromètre MS/MS API-365 (Perkin Elmer Sciex) équipé d'une source Electrospray (ESI). Les spectres sont enregistrés en ionisation positive et traités par le logiciel Analyst version 1.4. Le gaz utilisé comme auxiliaire et de collision est de l'azote alors que le gaz nébuliseur est de l'oxygène.

Les conditions d'acquisition des spectres de masse de la formulation 4 sont les suivantes : une fenêtre spectrale de 200 à 800 u (1s) avec un pas de 0,1 u, un potentiel d'ionisation IS (Ion Spray ionisation) de 4700 V et un potentiel pour éliminer les clusters de solvant DP (declustering potential) de 60 V. Pour le spectre MS-MS sur l'ion 630, la fenêtre spectrale est réduite de 50 à 650 u avec un pas de 0,1 u, un IS de 4700, un DP de 60 et une énergie de collision CE (Collision Energy) de 30. Les spectres sont enregistrés en introduction directe.

Les conditions d'acquisition des spectres de masse de la formulation 6 sont les suivantes : une fenêtre spectrale de 100 à 800 u (1s) avec un pas de 0,1 u, un IS de 5000 V et un DP de 50 V. Pour le spectre MS-MS sur l'ion 282, la fenêtre spectrale est réduite de 40 à 300 u avec un pas de 0,1 u, un IS de 5000, un DP de 50 et une CE de 40. Les spectres sont enregistrés en introduction directe.

La formulation 3 a également un protocole particulier. Celui-ci est décrit dans la publication « Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement » page 82.

II.3.3) Résultats et discussion

L'ensemble des formulations a été analysé par RMN ^1H DOSY et quantifié par RMN ^1H . Le Tableau 4 montre les principes actifs et les excipients détectés.

N° de formulation	Principes actifs détectés (mg/ gélule)	Excipients
Compléments alimentaires		
1	Caféine (47,1 ± 0,8) Théobromine (25,1 ± 0,3) Synéphrine (16,9 ± 0,7) Yohimbine (0,3 ± 0,0)	Stéarate, composés naturels
2	Sibutramine (22,6 ± 0,4)	-
3	Thiosildénafil (216,5 ± 6,2) Sildénafil (trace) Un produit d'hydrolyse (31,5 ± 1,2)	Stéarate
4	Nitrosoprodénafil (93,1 ± 3,3)	Ethanol
5	Tadalafil (13,9 ± 0,8)	Sucrose, glucose, stéarate
Médicaments		
6		Camphre, bornéol, menthol, laurocapram, 1,2-propanediol
7	Chloroquine (13,0 ± 0,5)	Lactose, stéarate
8	Sildénafil (63,1 ± 1,8) Paracétamol (trace)	Citrate, lactose, PEG
9	Sildénafil (53,4 ± 1,0)	PEG, hypromélose
10	Tadalafil (20,6 ± 0,3) Paracétamol (4,5 ± 0,1)	Lactose, PEG, laurylsulfate

Tableau 4. Tableau des principes actifs et des excipients détectés par formulations.

Les formulations 1 à 5 sont vendues comme étant des compléments alimentaires 100 % naturels. Pourtant les analyses RMN ¹H DOSY montrent que toutes ces formulations contiennent des molécules de synthèse.

Les formulations 1 et 2 sont des compléments alimentaires utilisés comme amaigrissants. La formulation 1 est composée d'un mélange de caféine, de théobromine, de synéphrine, de yohimbine et autres extraits de plantes. La synéphrine possède des propriétés adrénergiques c'est-à-dire une action stimulante similaire à celle de l'adrénaline. Elle est

utilisée comme substitut de l'éphédrine depuis son interdiction à la vente. Plusieurs publications dénoncent les problèmes d'innocuité de cette molécule, dont ses effets sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle, que les méthylxanthines (caféine et théobromine) potentialisent (Haaz, et al., 2006) (Nelson, et al., 2007).

La présence de caféine, de théobromine, de synéphrine et de yohimbine a été confirmée par un ajout de ces standards dans l'échantillon. Leurs caractéristiques RMN ¹H sont présentées dans le tableau ci-dessous :

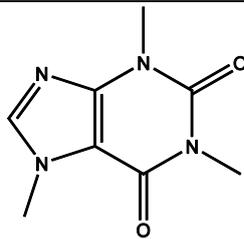
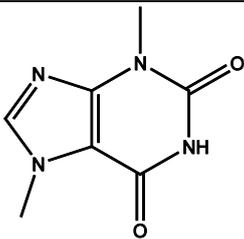
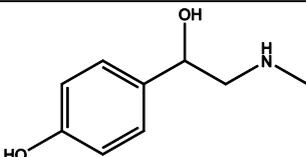
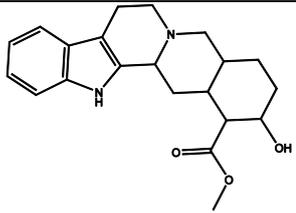
caféine		théobromine		synéphrine		yohimbine	
							
δ (ppm)	Intégration Multiplicité	δ (ppm)	Intégration Multiplicité	δ (ppm)	Intégration Multiplicité, J (Hz)	δ (ppm)	Intégration Multiplicité J (Hz)
7,74	1H, s	7,74	1H, s	7,21	2H, m	7,54	1H, d (7,9)
3,90	3H, s	3,87	3H, s	6,81	2H, m	7,43	1H, d (8,2)
3,47	3H, s	3,42	3H, s	4,68	1H, dd (4,3 ; 8,8)	7,22	1H, t (7,3)
3,29	3H, s			2,68	2H, systeme ABd (12,3 ; 8,9 ; 4,3)	7,13	1H, t (7,3)
				2,34	3H, s	4,64	1H, d (11,5)
						4,29	1H, m
						3,78	3H, s
						3,74	1H, m
						3,49	2H, m
						3,13	3H, m
						2,73	1H, m
						2,44	1H, dd (11,5 ; 2,5)
						2,21	1H, m
						1,93	1H, dt (14,2 ; 3,1)
						1,74	2H, m
						1,51	3H, m

Tableau 5. Caractéristiques RMN de la caféine, théobromine, synéphrine et yohimbine dans CD₃CN/D₂O.

La formulation 2 est composée exclusivement de sibutramine. Les doses de sibutramine autorisées (avant le retrait de l'autorisation de mise sur le marché en 2010) dans des médicaments étaient de 5, 10 ou 15 mg par gélule (Narkiewicz, 2002). La formulation 2

en contient 22 mg par gélule. Elle contient donc une molécule de synthèse frauduleusement ajoutée et qui plus est, en surdosage par rapport aux doses alors recommandées.

La formulation 2 (envoyée par l'Afssaps) porte le même nom, Lida, que la formulation 12 (achetée sur internet) analysée dans le chapitre précédent. Les formes, les couleurs des gélules, les notices et les conditionnements secondaires cartonnés semblent au premier abord similaires (Figure 25). Quelques différences sont pourtant visibles. La formulation 12 a un imprimé sur la gélule contrairement à la formulation 2 et les boîtes ont également quelques différences.



Figure 25. Conditionnement des formulations Lida. Formulation 12 à gauche et formulation 2 à droite

Par contre leurs spectres RMN ^1H DOSY, représentés Figure 26, sont complètement différents. Les deux formulations sont des contrefaçons mais la formulation 12 est composée de synéphrine ($D = 734 \pm 20 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), de caféine ($D = 1156 \pm 39 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) et de composés naturels alors que la formulation 2 est exclusivement composée de sibutramine ($D = 1079 \pm 10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Cet exemple montre que la composition de certaines formulations peut être modifiée au cours du temps par les fabricants et comporter des composés potentiellement dangereux. Ces changements de composition sont probablement effectués pour rendre plus difficile les contrôles qualités réalisés par les services douaniers ou les autorités de santé.

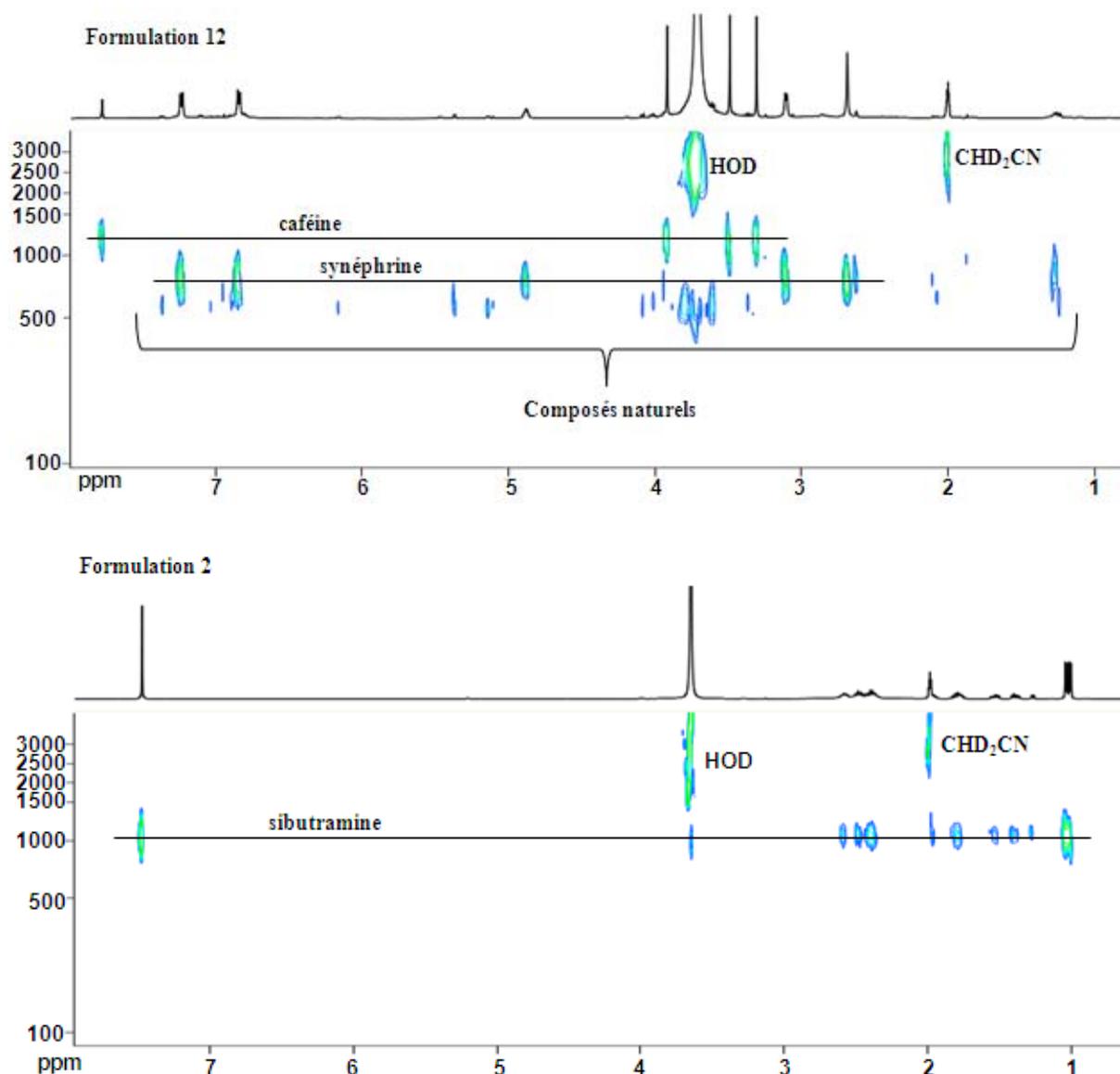


Figure 26. Spectres RMN DOSY ^1H des formulations 12 et 2 enregistrés dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$.

Les formulations 3, 4 et 5 sont des compléments alimentaires, annoncés 100 % naturels, utilisés pour des problèmes d'érection. Les spectres ^1H DOSY des formulations 4 et 5 sont présentés Figure 27.

La formulation 5 est composée de stéarate ($D = 1089 \pm 12 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), de sucres et d'une molécule de synthèse, le tadalafil ($D = 1032 \pm 6 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) dont les caractéristiques RMN sont présentées Tableau 6. La formulation en contient $13,9 \pm 0,8$ mg par gélule. Les signaux du stéarate et du tadalafil sont presque alignés car leurs coefficients de diffusion sont proches. La confirmation de la présence de tadalafil a été réalisée par un ajout du standard.

Le tadalafil est un inhibiteur de la phosphodiesterase-5 (PDE-5) normalement prescrit sous contrôle médical. Aujourd'hui il existe trois inhibiteurs PDE-5 approuvés par l'US Food

and Drug Administration pour le traitement de dysfonctionnement érectile. Il y a le sildénafil, commercialisé sous le nom de Viagra®, le tadalafil, commercialisé sous le nom de Cialis® et le vardénafil, commercialisé sous le nom de Levitra®. Due à leurs possibles effets secondaires, la prise de ces molécules doit être suivie médicalement. De nombreuses publications dénoncent des adultérations des compléments alimentaires annoncés naturels par des inhibiteurs synthétiques de la PDE-5 mais également par des analogues de ces molécules. Plusieurs publications citent des listes non exhaustives de ces analogues (Balayssac, et al., 2009) (Zou, et al., 2008) (Venhuis, et al., 2011).

Les formulations 3 et 4 contiennent respectivement $216,5 \pm 6,2$ mg par gélule de thiosildénafil ($D = 729 \pm 8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et $93,1 \pm 3,3$ mg par gélule de nitroso-prodénafil ($D = 706 \pm 10 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) qui sont des analogues du sildénafil. L'identification de ces composés a été réalisée à l'aide de spectres RMN 2D couplés à la spectrométrie de masse. La formulation 3 a fait l'objet d'une publication. Celle-ci est présentée à la fin de ce chapitre. Les caractéristiques RMN du nitroso-prodénafil contenu dans la formulation 4 sont présentées Tableau 6. Le spectre de masse montre un ion moléculaire $[M+H^+]$ à m/z égal à 630 ce qui confirme qu'il s'agit bien du nitroso-prodénafil. La fragmentation de cet ion moléculaire par spectrométrie de masse en tandem révèle cinq principaux signaux : un pic à 141,9 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_3\text{OS}^+$), un pic à 377,3 ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+$), un pic à 407,5 ($\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}^+$), un pic à 489,5 ($\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}^+$) et un pic à 600,5. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés dans la littérature (Venhuis, et al., 2011).

Ces analogues sont relativement récents puisque l'isolement et la caractérisation du thiosildénafil ont été réalisées par Zou en 2008 (Zou, et al., 2008) et celles du nitroso-prodénafil ont été réalisées par Venhuis en 2011 (Venhuis, et al., 2011). Ils possèdent des modifications structurales minimales par rapport à la molécule de référence. L'ajout d'analogues peut être réalisé par les fabricants afin d'échapper à certaines analyses de contrôle pouvant rechercher la présence des principes actifs les plus connus comme le sildénafil ou le tadalafil. Les patients consommant ces analogues s'exposent alors à de gros risques car les effets toxicologiques et les possibles synergies entre médicaments n'ont pas été testés (Zou, et al., 2008).

La formulation 4 contient également de l'éthanol résiduel ($D = 2285 \pm 24 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une contamination lors de la préparation de l'échantillon, la formulation a été analysée par RMN ^1H à deux reprises sur deux gélules

différentes puis quantifiée sur trois gélules différentes. Lors de chaque analyse une quantité importante d'éthanol ($83,5 \pm 3,4$ mg par gélule) a été mesurée.

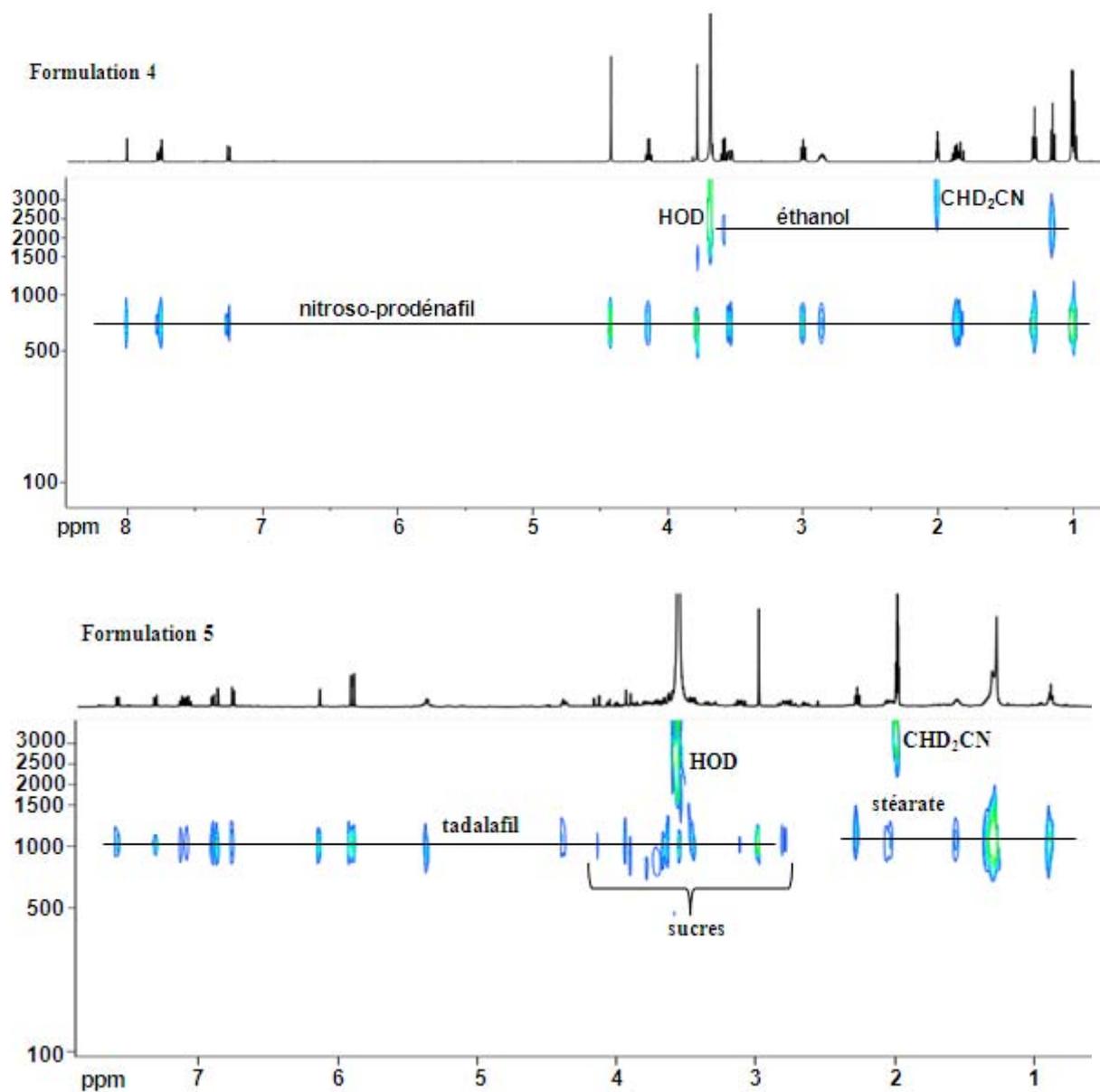


Figure 27. Spectres RMN DOSY ¹H des formulations 4 et 5 enregistrés dans CD₃CN/D₂O

Nitroso-prodénafil				Tadalafil		
¹ H δ (ppm)	Intégration Multiplicité J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	Numéro	¹ H δ (ppm)	Intégration Multiplicité J (Hz)	Numéro
-	-	162,0	19			
-	-	156,3	14			
-	-	151,7	31			
-	-	151,5	4			
-	-	147,5	1			
-	-	144,1	8	7,57	1H, d (7,9)	13
8,00	1H, s	141,1	33	7,30	1H, d (7,9)	10
7,76	1H, dd (2,5 ; 8,7)	132,0	17	7,09	1H, m	11
7,74	1H, d (2,4)	132,7	15	7,07	1H, m	12
-	-	130,1	9	6,89	1H, dd (8,1 ; 1,9)	4
-	-	129,2	6	6,85	1H, d (1,8)	2
-	-	127,9	16	6,74	1H, d (8,1)	3
-	-	117,5	34	6,12	1H, s	5
7,24	1H, d (8,8)	115,0	18	5,90	1H, d (1,1)	1
4,42	3H, s	40,4	10	5,88	1H, d (1,0)	1'
4,14	2H, q (7,0)	66,3	20	4,37	1H, dd (11,6 ; 4,0)	8
3,78	3H, s	34,4	37	4,14	1H, dd (17,6 ; 1,8)	6
3,54	2H, m	52,7	24 ou 28	3,90	1H, d (17,6)	6'
3,00	2H, t (7,5)	28,7	11	3,60	1H, dd (15,7 ; 4,2)	9
2,86	2H, m	51,5	25, 27	3,11	1H, ddd (15,9 ; 11,6 ; 1,3)	9'
1,87	2H, m	23,4	12	2,97	3H, s	7
1,83	2H, m	52,7	24 ou 28			
1,29	3H, t (7,0)	15,2	21			
1,01	6H, d (6,5)	19,3	29, 30			
1,00	3H, t (7,4)	14,6	13			

Tableau 6. Caractéristiques RMN du nitroso-prodénafil et du tadalafil dans CD₃CN/D₂O. (m : multiplet, q : quadruplet, d : doublet, dd : doublet dédoublé, s : singulet, t : triplet).

La formulation 6 est un anti-inflammatoire non-stéroïdien. Sur la boîte cartonnée et sur le spray, il est clairement spécifié que ce produit contient du piroxicam, Figure 28.

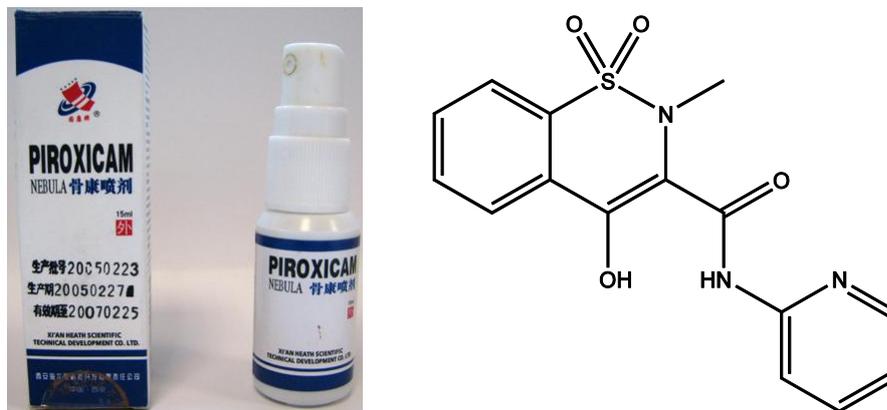


Figure 28. Photo des emballages de la formulation 6 et structure du piroxicam.

La notice indique que les excipients sont des extraits de plantes. Le spectre RMN ^1H de la formulation 6 enregistré dans du méthanol deutéré est présenté Figure 29.

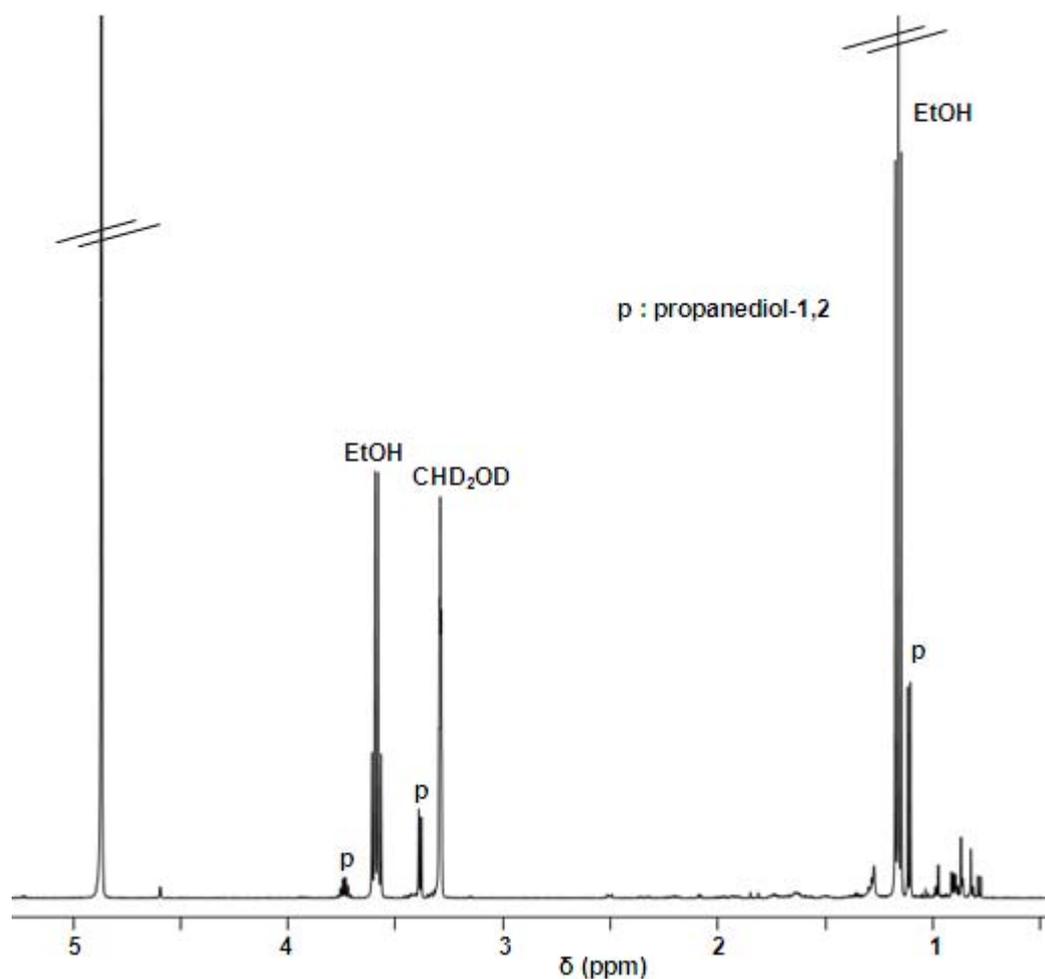


Figure 29. Spectre RMN ^1H de la formulation 6 enregistré dans CD_3OD .

Les principaux signaux sont attribués à l'éthanol et au 1,2-propanediol. Les autres signaux, beaucoup moins intenses, sont attribués au camphre, au bornéol, au menthol et à un composé inconnu. Malheureusement, sur le spectre DOSY ^1H et sur les spectres RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , Jmod, HSQC ^1H - ^{13}C et HMBC ^1H - ^{13}C) les signaux de l'éthanol et du 1,2-propanediol gênent l'interprétation des spectres et l'identification de l'inconnu. Cependant, aucun signal ne correspond aux signaux du piroxicam. Il n'y a donc pas le principe actif annoncé sur l'emballage.

Le composé inconnu a été identifié après avoir éliminé les composés volatiles (éthanol, menthol, camphre, bornéol, 1,2-propanediol) en couplant des analyses par spectrométrie RMN et par spectrométrie de masse. Il s'agit du laurocapram. Son spectre RMN ^1H est présenté Figure 30, sa structure et ses caractéristiques spectrales sont données dans le Tableau 7. Le laurocapram (dérivée du caprolactam) est utilisé comme excipient pour améliorer l'absorption percutanée de substances actives (Lopez-Cervantes, et al., 2006).

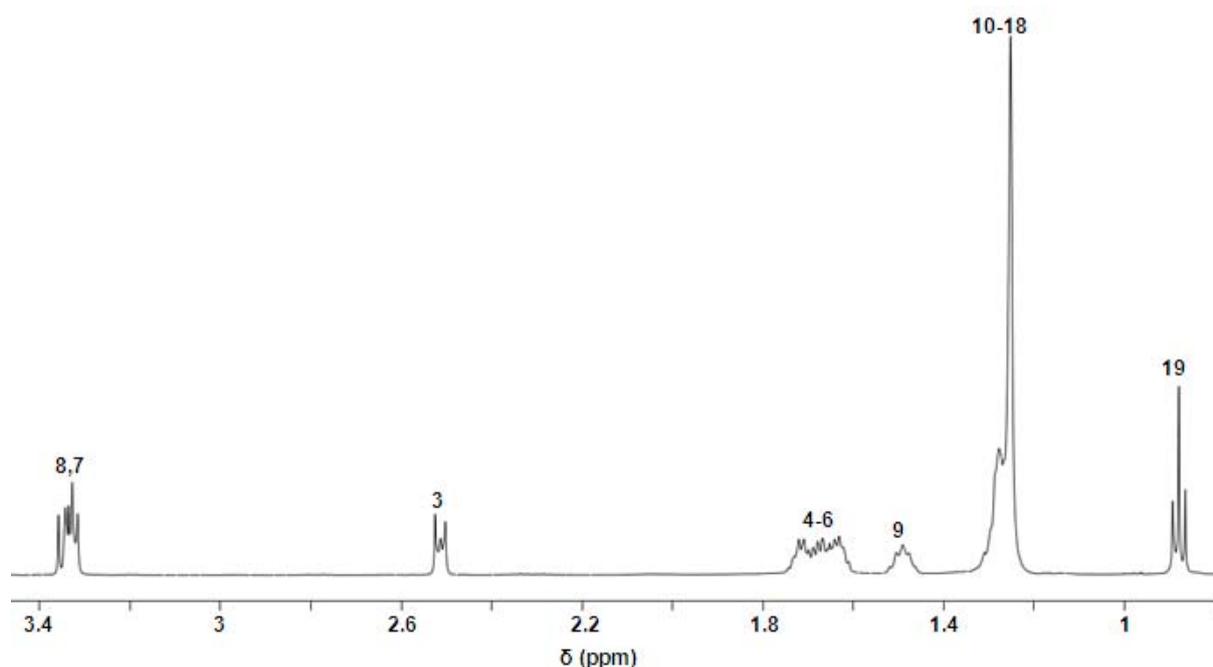
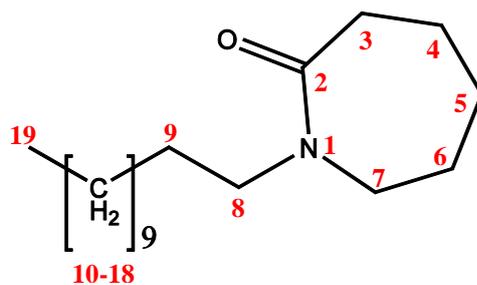


Figure 30. Spectre RMN ^1H de la formulation 6 après élimination des composés volatiles par passage au speed-vac et redissolution du résidu dans CDCl_3 .



¹ H			¹³ C	
¹ H	δ ¹ H (ppm)	Intégration et multiplicité J (Hz)	¹³ C	δ ¹³ C (ppm)
-	-	-	2	175,9
8	3,34	4H, m	8	48,7
7	3,33		7	49,9
3	2,51	2H, m	3	37,7
4-6	1,61 à 1,74	6H, m	5	30,4
			4	23,8
			6	29,1
9	1,49	2H, quint (7,2 Hz)	9	28,5
10-18	1,25	18H, large s	10-18	32,3
				30,00
				29,98
				29,95
				29,93
				29,8
				29,7
				27,3
23,0				
19	0,88	3H, t (7,0 Hz)	19	14,5
Données MS				
Ion moléculaire		m/z 282		
Ions chaîne alkyle		m/z 43, 57, 71		

Tableau 7. Caractéristiques RMN et masse du laurocapram. (m : multiplet, quint : quintuplet, s : singulet, t : triplet).

La formulation 7 est un médicament contre le paludisme. La notice annonce qu'il contient de la quinine. Le spectre ^1H DOSY présenté Figure 31 montre que cette formulation contient de la chloroquine ($D = 691 \pm 10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), un analogue de la quinine, du stéarate ($D = 943 \pm 14 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) et du lactose ($D = 683 \pm 6 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Les caractéristiques RMN de la chloroquine sont présentées Tableau 8. La chloroquine est un traitement antipaludique moins cher que la quinine. Cependant depuis plusieurs années des articles signalent des cas de chloroquino-résistance (Ngimbi, et al., 1998). Une étude réalisée au Cameroun en 2000 révèle que le niveau de la résistance *in vitro* à la chloroquine est de 61 %, alors que la quinine présente encore une bonne activité, avec 80 % d'isolats sensibles malgré un usage intensif sur le site (Agnamey, et al., 2002).

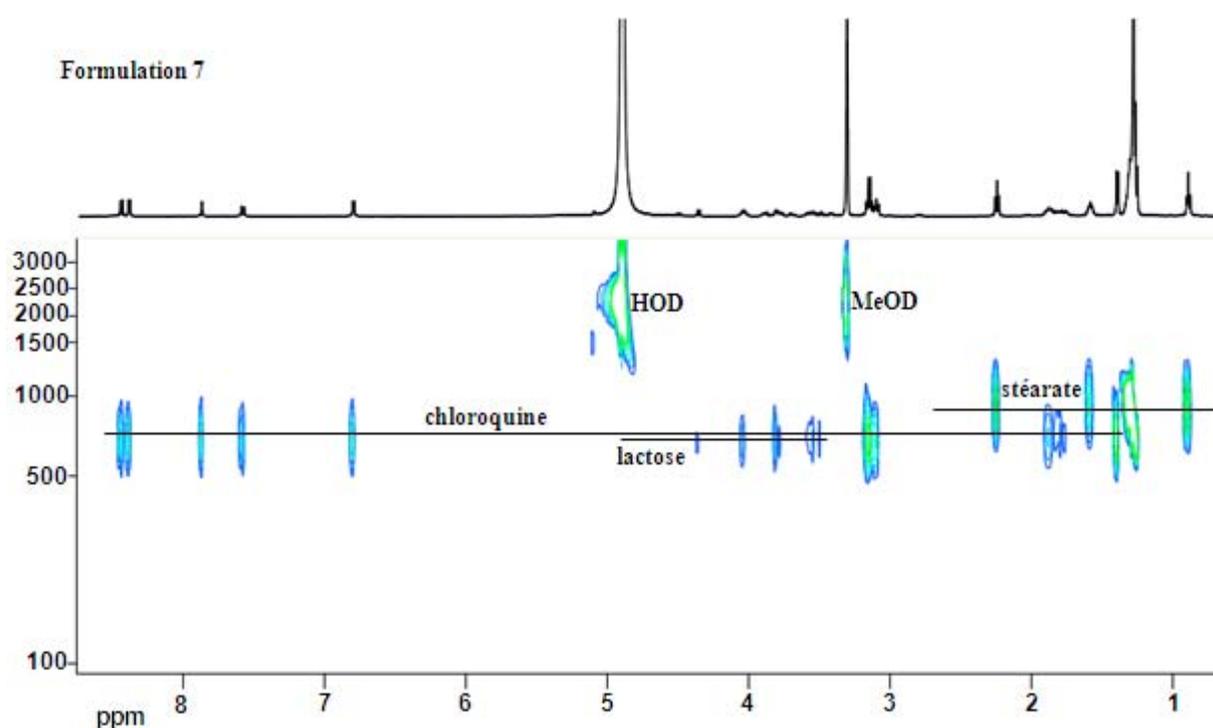


Figure 31. Spectre RMN DOSY ^1H de la formulation 7 enregistré dans le MeOD.

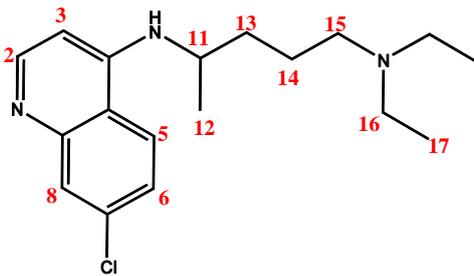
		
¹ H δ (ppm)	Intégration, Multiplicité J (Hz)	Numéro
8,42	1H, d (9,1)	5
8,37	1H, d (6,6)	2
7,86	1H, d (2,1)	8
7,57	1H, dd (2,1 ; 9,1)	6
6,79	1H, d (6,8)	3
4,03	1H, m	11
3,14	2H, q (7,4)	16
3,09	2H, t (7,9)	15
1,80	4H, m	13-14
1,39	3H, d (6,5)	12
1,26	3H, t (7,0)	17

Tableau 8. Caractéristiques RMN de la chloroquine dans MeOD. (m : multiplet, q : quadruplet, d : doublet, dd : doublet dédoublé, t : triplet).

Les formulations 8, 9 et 10 sont des médicaments préconisés pour les problèmes érectiles. Les formulations 8 et 9 sont des copies du Viagra®. Elles contiennent le principe actif attendu, le citrate de sildénafil. Les caractéristiques RMN du sildénafil sont présentées Tableau 9. Les excipients détectés par RMN ¹H DOSY du Viagra® sont l'hypromellose, le lactose et la triacétine (Trefi, et al., 2009). Les excipients des formulations sont différents. La formulation 8 contient du lactose et du PEG et la formulation 9 contient du PEG et de l'hypromellose. De plus, la formulation 8 contient du paracétamol.

La formulation 10 est une copie du Cialis®. Les spectres ¹H DOSY du Cialis® et de la copie sont présentés Figure 32. Malgré le fait que les comprimés semblent identiques, leur composition est différente. La formulation 10 contient bien le principe actif attendu, le tadalafil ($D = 1033 \pm 6 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Par contre, elle contient également du paracétamol et les excipients sont différents de la formulation originale. Sur le spectre DOSY ¹H du Cialis®, les excipients identifiés sont le lactose ($D = 661 \pm 3 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), la triacétine ($D = 1327 \pm 40 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), le lauryl sulfate de sodium, le stéarate de magnésium, l'hypromellose ($D = 173 \pm 8 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) et l'hydroxypropylcellulose ($D = 118 \pm 7 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Le spectre DOSY ¹H de la formulation 10

montre seulement les signaux du lactose, du PEG et du lauryl sulfate. La présence de paracétamol dans le cas de cette formulation peut éventuellement être expliquée par l'utilisation de matériel mal nettoyé dans le procédé de fabrication servant également à la fabrication de formulations de paracétamol.

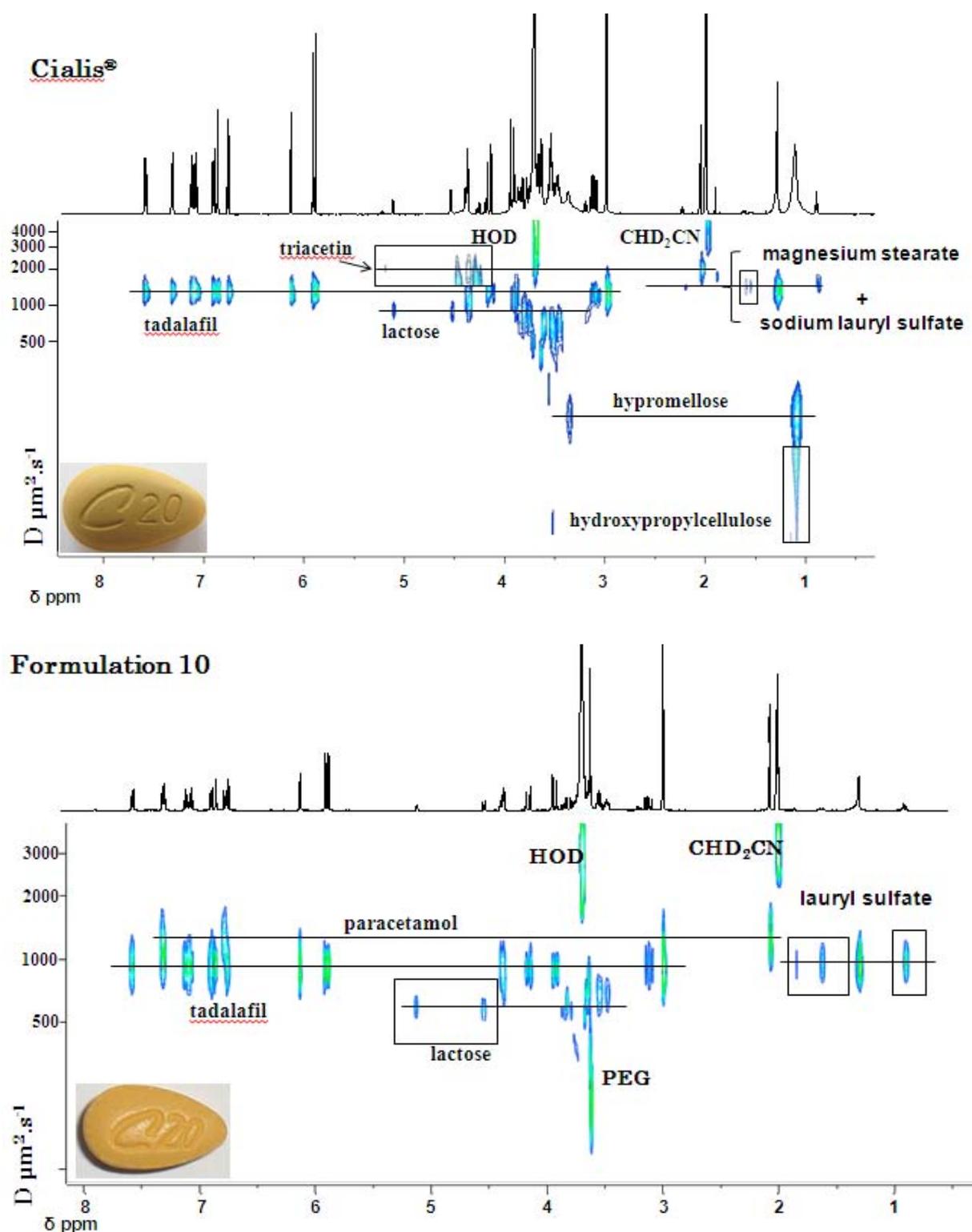


Figure 32. Spectres RMN DOSY ¹H du Cialis® et de la formulation 10 enregistrés dans CD₃CN/D₂O.

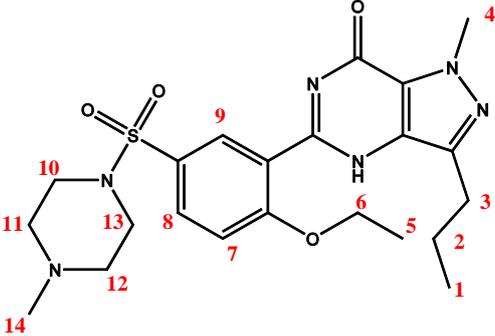
		
^1H δ (ppm)	Intégration, Multiplicité J (Hz)	Numéro
8,08	1H, d (2,4)	9
7,91	1H, dd (2,4 ; 8,9)	8
7,32	1H, d (8,9)	7
4,28	2H, q (7,0)	6
4,14	3H, s	4
2,78	2H, t (7,4)	3
2,92	3H, s	14
1,71	2H, sex (7,4)	2
1,46	3H, t (6,9)	5
0,92	3H, t (7,4)	1

Tableau 9. Caractéristiques RMN du sildénafil dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ (q : quadruplet, d : doublet, dd : doublet dédoublé, t : triplet, s : singulet, sex : sextuplet).

II.3.4) Formulation 3

L'étude de cette formulation a été décrite dans une publication :

Publication 2 :

Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement.

Publication acceptée dans le Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.





Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement

Julie Vaysse, Véronique Gilard, Stéphane Balayssac, Chantal Zedde, Robert Martino, Myriam Malet-Martino*

Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2011
Received in revised form
30 September 2011
Accepted 1 October 2011
Available online xxx

Keywords:

Dietary supplement
Adulterants
Depiperazinothiosildenafil
NMR
MS

ABSTRACT

iErect, a new dietary supplement marketed as “100% natural” and sold over the Internet, was analyzed. It contains thiosildenafil, a sildenafil analogue already reported as an adulterant in herbal formulations, and a new compound whose structure was elucidated after isolation using NMR, MS and IR. It was named depiperazinothiosildenafil as it results from the hydrolytic cleavage of the S–N bond of the sulfonamide group of thiosildenafil. A capsule of iErect contains a very high amount (≈ 220 mg) of thiosildenafil and ≈ 30 mg of depiperazinothiosildenafil, which places consumers at risk for potentially serious side-effects.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Adulterants are frequently detected in dietary supplements or herbal medicines aimed at increasing sexual function. In addition to the approved phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, sildenafil (Viagra®), tadalafil (Cialis®) and vardenafil (Levitra®) in Europe and USA, udenafil (Zydena®) in South Korea and Malaysia, mirodenafil (Mvix®) in South Korea, and lodenafil carbonate (Helleva®) in Brazil, it has been reported that “natural” herbal products were also adulterated with unapproved analogues in which most often minor modifications were brought to the parent structure. To our knowledge, 29 analogues have been described so far in the literature as illegal additives in herbal drugs [1–31].

In this study, a new sildenafil analogue was isolated from iErect, a new “100% natural enhance formula”, which was claimed to contain plant extracts, vitamins, zinc and arginine. Thiosildenafil and the new analogue called depiperazinothiosildenafil were detected in the preparation and their chemical structures elucidated using NMR, MS and IR.

2. Experimental

2.1. Commercial herbal drug

Four different boxes of iErect (Fig. 1A) containing either 1 or 4 capsules (batches 7164 and 8164) were purchased at

different dates between December 2010 and June 2011 on the Internet from a Lithuanian site and two French sites. The claimed composition for a net weight of 585 mg/capsule was as follows: arginine 150 mg, Rosenroot *Rhodiola rosea* 100 mg, Mallow *Malva sylvestris* 50 mg, Ginger *Zingiber officinale* 50 mg, *Tribulus terrestris* 50 mg, Stinging Nettle *Urtica dioica* 50 mg, Pumpkin *Cucurbita pepo* 25 mg, Cinnamon *Cinnamomum zeylanicum* 25 mg, zinc 30 mg, vitamin E 30 mg, niacin (vitamin B3) 25 mg. The capsules were analyzed before expiry date (12/2012).

2.2. NMR analysis

2.2.1. Preparation of samples for NMR analysis

The capsule was emptied and 10 mg were dissolved in 1.5 mL of the chosen solvent (CD_3CN , CD_3OD or $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20)) under vortex agitation during 10 min and then sonication for 10 min. The suspension was then centrifuged (5 min, 4000 rpm) and 500 μL of the supernatant was analyzed.

For the quantitative analysis, the capsule was emptied and 10% of the powder (≈ 58 mg) was dissolved in 10 mL of methanol under magnetic stirring during 40 min, then sonicated for 5 min. After centrifugation (5 min, 4000 rpm), an aliquot of 1 mL was evaporated to dryness and the residue dissolved in 1 mL of methanol- d_4 . The experiments were done in triplicate on each batch. The quantification was performed on the ^1H NMR signals of aromatic protons 15 and 18 (Fig. 1B). The solid residue from the first extraction was re-extracted using the same protocol. The supernatants of the three extracts from the same batch were pooled, then lyophilized and the

* Corresponding author. Tel.: +33 5 61 55 68 90; fax: +33 5 61 55 76 25.
E-mail address: martino@chimie.ups-tlse.fr (M. Malet-Martino).

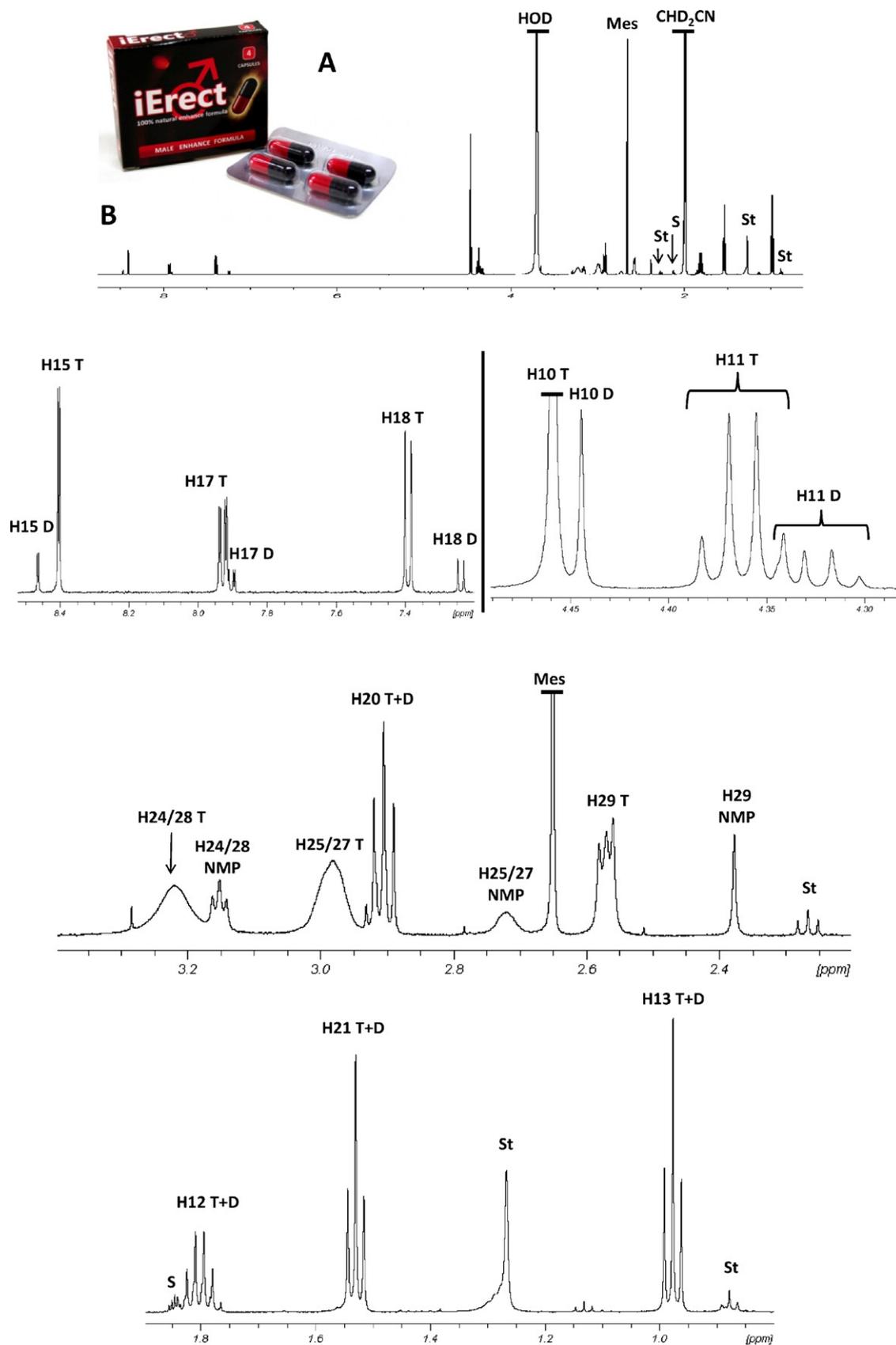


Fig. 1. (A) Photograph of iErect box and capsules; (B) ¹H NMR spectrum of a CD₃CN:D₂O (80:20) extract of a iErect capsule content. T: thiosildenafil; D: depiperazinothiosildenafil; NMP: N-methylpiperazine; Mes: mesylate; St: stearate; S: satellite signal of CHD₂CN. The CH₃ 29 resonance of thiosildenafil usually appears as a singlet. The multiplicity observed for this signal in the spectrum shown results most probably from a coupling with ¹⁴N nucleus.

residue dissolved in 1 mL of methanol-d₄. The quantification was performed on the ¹H NMR singlet of CH₃ 10 (Fig. 1B).

2.2.2. Stability of thiosildenafil

Three experiments were carried out in order to check the stability of thiosildenafil. In the first one, the supernatants obtained as described in Section 2.2.1 were analyzed by ¹H NMR immediately after their preparation and after 24 h at 37 ± 0.2 °C in a water bath. In the second experiment, 30 mg of commercial powder was dissolved in 1.5 mL of CD₃CN:D₂O (80:20) under vortex agitation during 20 min and then sonicated for 10 min. The suspension was then centrifuged (5 min, 4000 rpm). 500 µL of the supernatant was transferred into a NMR tube and the solution was analyzed immediately. The tube was then placed in an ultrasonic bath for 2 additional hours and a second ¹H NMR spectrum was recorded. Finally, an authentic sample of thiosildenafil obtained after purification of the commercial preparation (see below) was submitted to the same extraction protocol in CD₃CN:D₂O (80:20) than that used for the commercial powder.

2.2.3. NMR recording conditions

The NMR experiments were performed on a Bruker Avance 500 spectrometer (Bruker BioSpin AG, Fällanden, Switzerland) equipped with a 5 mm dual ¹H–¹³C TCI cryoprobe. Sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate (TSP; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as an internal reference for chemical shift (δ) measurement and quantification. A solution of TSP (10 µL) was added before the NMR analysis at a final concentration of 0.2 mM in all the samples analyzed. The recording and processing conditions for ¹H NMR, quantitative ¹H NMR and 2D DOSY ¹H NMR spectra have already been described [22,32].

For structural characterization of thiosildenafil and the unknown compound in the crude extracts and after purification, 1D (¹H and ¹³C) and 2D (gCOSY, gHSQC and gHMBC) NMR spectra were recorded in two different solvent systems, CD₃OD and CD₃CN:D₂O (80:20).

2.3. LC–MS analysis of iErect methanolic extracts

The HPLC system used consisted of an Agilent 1100 series apparatus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). An Applied System QTRAP triple quadrupole mass spectrometer, equipped with a Turbo Ion Spray (TIS) interface, was used for detection. Both were controlled by an Agilent Analyst software (version 1.4). The analytical column was a reversed-phase column Luna C18 (100 mm × 3 mm i.d.; 3 µm particle size; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of a mixture of (A) a buffer solution (ammonium acetate 10 mmol L⁻¹, pH 7) and (B) acetonitrile. The starting mobile phase was 70% A–30% B during 1 min, then a linear gradient was run up to 20% A–80% B in 5 min, then to 10% A–90% B in 1 min, followed by isocratic elution at the same ratio during 3 min. The flow rate was 0.6 mL min⁻¹ and the volume injected 10 µL. The unknown compound and thiosildenafil eluted respectively at 4.6 and 8.1 min.

The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with TIS heater set at 440 °C. Nitrogen served both as auxiliary, collision gas and nebulizer gas. The operating conditions for TIS interface were: mass range 100–1000 u (1 s), step size 0.1 u; Q1 TIS MS spectra were recorded in profile mode, IS 5000 V, DP 80 V.

2.4. Isolation of thiosildenafil and new analogue

The content from two capsules was suspended in methanol, vortexed for 10 min and then sonicated for 10 min. After filtration, the solid phase was washed twice with dichloromethane.

The liquid phases were pooled and evaporated to dryness. Purification was carried out using a Waters Delta Prep 4000 system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with a 486 tunable absorbance detector set at 300 nm. 100 mg of powder was put on 10 g of silica (50 µm). The mobile phase was a mixture of ethyl acetate:dichloromethane:methanol (45:45:10) with a flow rate of 8 mL min⁻¹.

The eluted fractions were collected and analyzed with a Waters Acquity UPLC–DAD system controlled by Waters Empower 2 software. The analysis conditions were: Acquity UPLC BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm i.d.; 1.7 µm particle size); mobile phase: (A) demineralized water and (B) acetonitrile (HPLC grade) both containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid; flow rate: 0.3 mL min⁻¹; detection wavelength: 254 nm. The gradient condition was as follows: 0–0.5 min, isocratic elution with a 90:10 A:B mixture; 0.5–6 min, linear increase to 20:80 A:B ratio; re-equilibration for 0.5 min with a 90:10 A:B mixture before the start of the next run. The unknown compound and thiosildenafil eluted respectively at 3.6 and 4.5 min.

2.5. MS, MS/MS and high resolution MS analyses

The methanolic extract of the capsule content and the purified compounds dissolved in methanol were directly infused in an Applied Biosystems API 365 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), equipped with a TIS interface and controlled by the Analyst software (version 1.4). The mass spectrometer was operated in positive ionization mode. Nitrogen served both as auxiliary and collision gas and oxygen served as nebulizer gas. The operating conditions for TIS interface were as follows: (1) in MS mode: mass range 100–600 u (1 s), step size 0.1 u; Q1 TIS MS spectra were recorded in profile mode, IS 4700 V, DP 50 V; and (2) in MS–MS mode: precursor mass 491 u for thiosildenafil and 409 u for the new analogue; mass range 30–500 u for thiosildenafil and 50–500 for the new analogue, step size 0.1 u; MS–MS spectra were recorded in profile mode, IS 4700 V for thiosildenafil and 5000 V for the unknown compound, DP 50 V, CE 50 V for thiosildenafil and 45 V for the unknown compound.

The accurate mass of the new analogue was determined on a Waters GCT Premier time-of-flight (TOF) mass spectrometer equipped with a Desorption Chemical Ionization (DCI) probe employing methane as the reagent gas and controlled by the MassLynx 4.1 software. The TOF–MS was operated between *m/z* 100 and 600 in positive ionization mode. The sample was dissolved in methanol and analyzed after direct infusion.

2.6. IR spectroscopy

Samples were prepared in KBr pellets and spectra were recorded on a Thermo Nicolet Nexus 670 FTIR spectrophotometer (Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI, USA) over the spectral range 4000–400 cm⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. NMR and LC–MS of iErect extracts

The herbal dietary supplement iErect was extracted with CD₃OD, CD₃CN or CD₃CN:D₂O (80:20) and the extracts were subjected to ¹H and ¹³C NMR analysis. The three spectra were quite similar. As an illustration, we present in Fig. 1B the ¹H NMR spectrum in CD₃CN:D₂O. It showed characteristic signals of the lubricant agent stearate (0.88 ppm, t, 7.1 Hz; 1.27 ppm, broad s; 2.27 ppm, t, 7.5 Hz), and of methanesulfonate (2.65 ppm, s), a non-toxic acid often used to form salts of active pharmaceutical ingredients containing basic centers. Their attributions were confirmed by spiking with authentic standards. Some other resonances

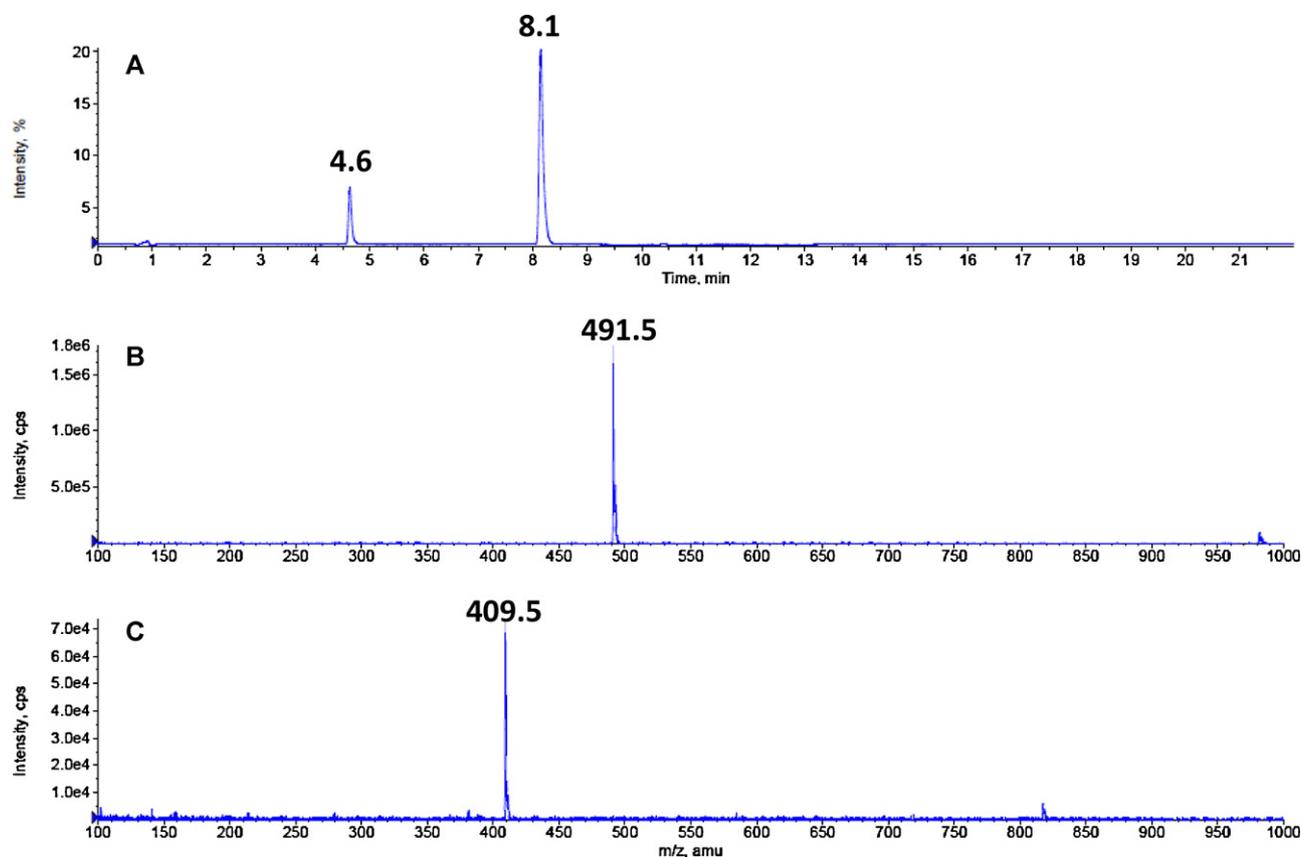


Fig. 2. (A) HPLC chromatogram of a acetonitrile:H₂O (80:20) extract of a iErect capsule content; (B) and (C) mass spectra of the compounds eluting at 8.1 and 4.6 min, respectively.

could correspond to protons from two PDE-5 inhibitors with one in a greater amount. The LC–MS analysis of the extract showed the presence of two major peaks at RT 4.6 min and 8.1 min with protonated molecular ions at m/z 409.5 and 491.5, respectively (Fig. 2) and a very minor peak with a RT at 6.0 min and m/z 475.5 (not shown in Fig. 2). Among the PDE-5 inhibitors and their analogues described in the literature, only thiosildenafil and sildenafil have molecular weights (490.6 and 474.6 Da) corresponding to the observed ions. These data suggest that iErect could contain thiosildenafil, a very low quantity of sildenafil (not detected in ¹H NMR) and an unknown PDE-5 inhibitor analogue with a molecular weight of 408.5 Da.

3.2. Characterization of thiosildenafil and unknown compound after isolation

¹H and ¹³C NMR data of isolated compounds are listed in Table 1. The NMR resonances were assigned by 2D NMR experiments (gCOSY, gHSQC and gHMBC) and comparison with published data for thiosildenafil [15]. The strong resemblance of ¹H and ¹³C NMR spectra of the unknown analogue with those of thiosildenafil would indicate that this compound is a thiosildenafil derivative. The fact that the proton and carbon signals at positions 24/28, 25/27, and 29 are not present and the 10.2 ppm deshielding of quaternary carbon 16 relative to thiosildenafil suggest the cleavage of the sulfonamide SO₂–N bond, generating a sulfonic acid function. The unknown compound was thus identified as 4-ethoxy-3-(1-methyl-7-thio-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5(6H)-yl)benzenesulfonic acid, hereinafter referred to as depiperazinothiosildenafil (Fig. 3). Spiking the iErect extracts with these two products after their isolation and purification enabled unambiguous attribution of their respective proton resonances.

To confirm the structures of both compounds, a MS study was conducted. The MS and MS–MS spectra of thiosildenafil (Fig. 4A) were in agreement with literature data [15,33]. Compared to thiosildenafil, the MS–MS spectrum of the unknown analogue (Fig. 4B) showed the absence of all the peaks corresponding to the N-methylpiperazine (NMP) ions at m/z 100 ([NMP]⁺), 99 ([CH₂=N–CH₂–CH₂–N(CH₃)=CH₂]⁺), and fragments at 85 (loss of CH₂ from the fragment ion at m/z 99) and 58 ([(CH₃)₂N=CH₂]⁺) or resulting from NMP methyl transfer on the S atom of the C=S bond at m/z 407, 343 and 341 [33]. Two common peaks were observed in MS–MS spectra of thiosildenafil and the unknown compound at m/z 327 (loss of NMP–SO₂H for thiosildenafil and of sulfonic acid for the unknown compound), and 299 resulting from an additional neutral loss of C₂H₄. Moreover, the MS–MS spectrum of the new analogue displayed a strong peak at m/z 381 due to the loss of C₂H₄. The accurate mass of the protonated molecular ion of the unknown compound was found at m/z 409.1003 in agreement with the calculated mass 409.1004 of C₁₇H₂₁N₄O₄S₂ within –0.2 ppm, which corresponds to the atomic composition of depiperazinothiosildenafil C₁₇H₂₀N₄O₄S₂.

The UV spectra of thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil are similar and show two absorption bands at 295 and 354 nm, the last one being characteristic of conjugated heterocyclic thiones [15].

The IR spectra of isolated thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil revealed common absorption bands characteristic of an amine moiety (ν_{NH} at 3271 and 3251 cm⁻¹, respectively) and a thiocarbonyl group directly attached to a nitrogen atom which leads to 3 bands at 1498, 1253 and 928 cm⁻¹ for thiosildenafil, and 1498, 1258 and 927 cm⁻¹ for depiperazinothiosildenafil, all of them being associated at least partly with the C=S stretching vibration as a consequence of the strong coupling between the C=S

Table 1

¹H and ¹³C NMR characteristics of thiosildenafil and unknown analogue (depiperazinothiosildenafil) detected in the herbal dietary supplement iErect. Spectra were recorded in CD₃OD.

Atom	Group	Thiosildenafil			Depiperazinothiosildenafil		
		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity ^a	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity ^a	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
3	Cq C=N			147.9			147.9
5	Cq C=N			149.8			150.5
7	Cq C=S			175.7			175.2
8	Cq C=C			134.7			134.7
9	Cq C=C			135.4			135.4
10	N-CH ₃	4.48	s	40.6	4.46	s	40.5
11	CH ₂	2.88	t, J = 7.5 Hz	29.1	2.89	t, J = 7.4 Hz	29.1
12	CH ₂	1.81	sext, J = 7.45 Hz	24.2	1.82	sext, J = 7.4 Hz	24.2
13	CH ₃	0.99	t, J = 7.4 Hz	15.1	0.98	t, J = 7.4 Hz	15.1
14	Cq Ar			124.1			121.7
15	CH Ar	8.32	d, J = 2.45 Hz	132.4	8.55	d, J = 2.3 Hz	130.45
16	Cq Ar			130.2			140.4
17	CH Ar	7.96	dd, J = 2.45 and 8.85 Hz	134.3	7.89	dd, J = 2.3 and 8.8 Hz	132.5
18	CH Ar	7.41	d, J = 8.85 Hz	115.4	7.23	d, J = 8.8 Hz	115.6
19	Cq Ar			162.9			160.3
20	O-CH ₂	4.34	q, J = 7.0 Hz	67.9	4.31	q, J = 6.95 Hz	67.6
21	CH ₃	1.52	t, J = 7.0 Hz	15.9	1.55	t, J = 6.95 Hz	15.7
24/28	N-CH ₂ piperazine	3.06	Broad signal	47.8			
25/27	N-CH ₂ piperazine	2.52	Broad signal	56.0			
29	N-CH ₃ piperazine	2.27	s	46.7			

^a s: singlet; d: doublet; dd: doublet of doublet; t: triplet; q: quadruplet; sext: sextuplet.

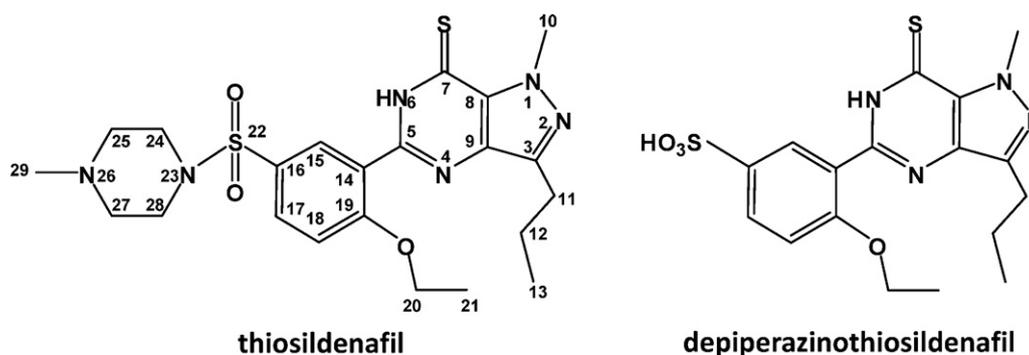


Fig. 3. Chemical structures of the PDE-5 inhibitor analogues, thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil, contained in the dietary supplement iErect.

and C–N groups [34]. In the spectrum of thiosildenafil, medium intensity bands at 2856 and 2806 cm⁻¹ were attributed to asymmetric and symmetric ν_{CH_3} of the N-methyl group of piperazine, and two strong absorption bands at 1352 and 1171 cm⁻¹ corresponded to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of SO₂ in the sulfonamide group [34]. All these absorption bands were not present in the IR spectrum of depiperazinothiosildenafil, whereas two very strong bands were observed at 1190 (broad band with shoulders) and 1034 cm⁻¹ characteristic of the asymmetric and symmetric stretching vibrations of a SO₃ group [34]. These data were consistent with the cleavage of the S–N sulfonamide bond of thiosildenafil leading to the formation of a sulfonic acid compound.

3.3. 2D DOSY ¹H NMR

The fact that the new analogue was a cleavage product of thiosildenafil led us to look for the presence of NMP in the commercial dietary supplement iErect. 2D DOSY ¹H NMR is an attractive method as the virtual separation of a mixture is based on the differences in self-diffusion coefficients *D* of the various components and *D* generally decrease with increasing molecular weight. The 2D DOSY ¹H NMR spectrum presented in Fig. 5 clearly demonstrated the presence of thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil on the same line (*D* = 937 μm² s⁻¹), stearate (*D* = 1139 μm² s⁻¹), and methanesulfonate and NMP also aligned (*D* = 1264 μm² s⁻¹). The presence of NMP in iErect extracts was confirmed by careful

Table 2

¹H NMR chemical shift ranges of piperazine moieties in CD₃CN:D₂O and CD₃OD extract solutions of iErect.

Proton numbering ^a	Thiosildenafil (ppm)	NMP (ppm) ^b
24/28	3.33–3.05	3.33–2.87
25/27	3.28–2.47	3.05–2.44
29	2.88–2.18	2.61–2.30

^a cf. Fig. 3.

^b NMP: N-methylpiperazine.

spiking with an authentic sample. Indeed, the ¹H NMR chemical shifts of the protons from the piperazine ring and from the methyl group linked to the nitrogen atom of piperazines in NMP and thiosildenafil are very concentration-dependent being upfield shielded with decreasing concentrations (Table 2). The broad signals of the N-CH₂ protons are often overlapped whereas the singlets of N-CH₃ are often well resolved and their quantification easily performed. COSY, HSQC, HMBC and even DOSY experiments are thus necessary for an unambiguous attribution of all the resonances of the piperazine moieties in iErect extract solutions.

3.4. Origin of depiperazinothiosildenafil

As already stated above, the extraction of the content of iErect capsules in three different solvents gave identical ¹H NMR spectra

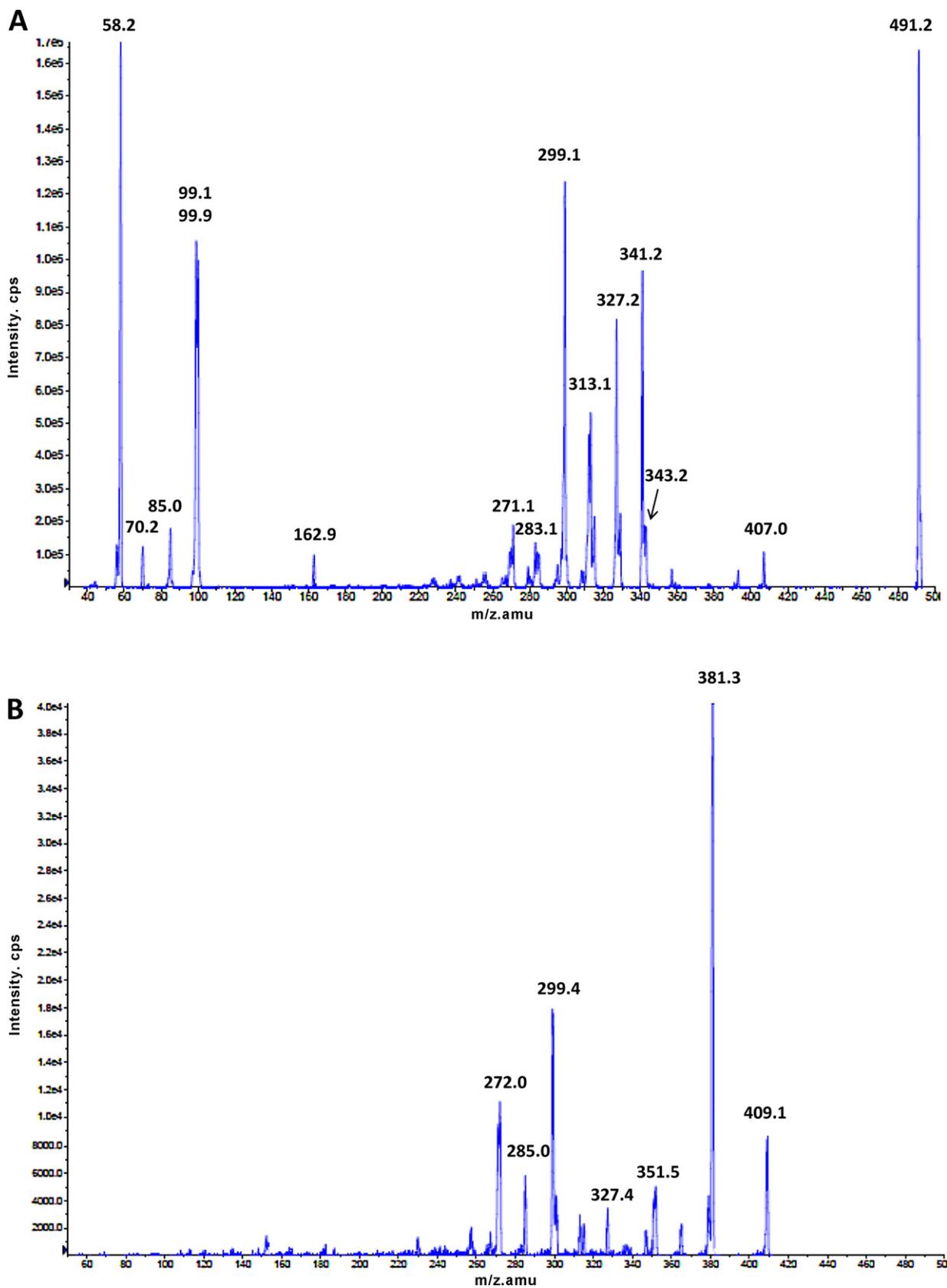


Fig. 4. MS-MS spectra of pure (A) thiosildenafil (product ion spectrum of the molecular peak at m/z 491.2) and (B) depiperazinothiosildenafil (product ion spectrum of the molecular peak at m/z 409.1).

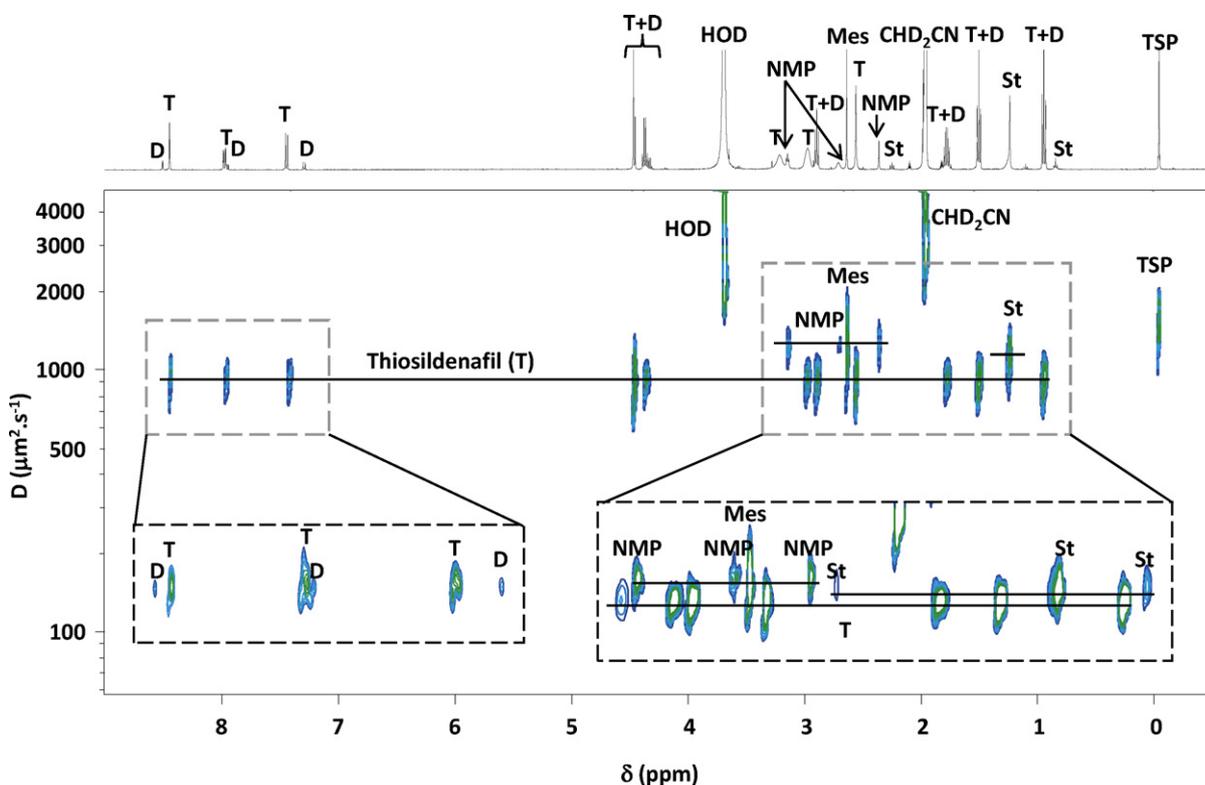


Fig. 5. 2D DOSY ^1H NMR spectrum of a $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) extract of a iErect capsule content. Deeper sections of some signals are shown in the boxes presented in the lower part of the figure. T: thiosildenafil; D: depiperazinothiosildenafil; NMP: N-methylpiperazine; Mes: mesylate; St: stearate; TSP: sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate (internal reference).

in terms of relative percentage of depiperazinothiosildenafil with respect to thiosildenafil. Three experiments were nevertheless performed to check the stability of thiosildenafil in order to confirm that the cleavage of the sulfonamide bond did not occur during the preparation of the extracts from commercial iErect. Pure thiosildenafil was subjected to the same extraction protocol in $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) than that used for the commercial powder. No degradation could be observed on the ^1H NMR spectrum. The effect of an extended duration of sonication (2 additional hours) on a $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) extract of the commercial product was also verified. The ^1H NMR spectra before and after the additional sonication period were identical. A last verification consisting in heating for 24 h at 37°C the CD_3CN , CD_3OD or $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) extract of the commercial powder did not show any change in the relative intensities of the ^1H NMR signals, which is consistent with the fact that the breakdown of the sulfonamide bond of thiosildenafil was obtained after heating at 105°C for 21 h in a 6.1 mol L^{-1} solution of HCl [23]. All these experiments demonstrate that depiperazinothiosildenafil was not formed in our experimental extraction conditions and was indeed present in the commercial formulation. The identical relative proportions of depiperazinothiosildenafil and NMP with respect to thiosildenafil (respectively $18.3 \pm 1.0\%$ and $18.8 \pm 1.4\%$ ($n=6$)) in CD_3OD and $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) extracts could suggest that the hydrolytic cleavage of the S–N bond of the sulfonamide group of thiosildenafil occurred during its synthesis.

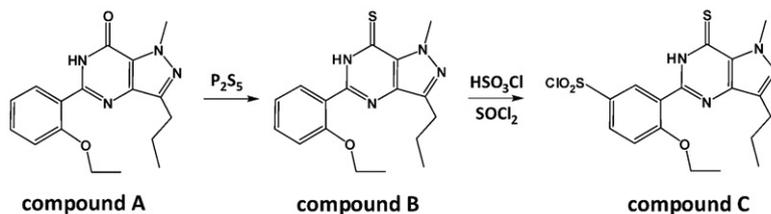
Kim et al. [35] patented two different ways to prepare thiosildenafil (Fig. 6). The first one involved three steps: (i) conversion of the C=O of compound A into C=S (compound B) by P_2S_5 treatment, (ii) chlorosulfonation of the benzene ring in the para position relative to the ethoxy group of compound B leading to a benzenesulfonyl chloride (compound C), and (iii) reaction of the latter compound with NMP in a 3.6-fold molar excess of amine. Even if the column chromatographic purification described in the patent at this stage

was not thoroughly performed, this synthetic route cannot explain the presence in equimolar amounts of NMP and depiperazinothiosildenafil resulting from compound C hydrolysis. The second way consisted in a direct thionation of sildenafil with P_2S_5 in a quasi-stoichiometric ratio (1/1.1) of sildenafil/sulfur atom. The subsequent work-up to get pure thiosildenafil involves a treatment with dichloromethane and 6 mol L^{-1} aqueous sodium hydroxide, which is unlikely to provoke the breakdown of the $\text{SO}_2\text{--N}$ bond as base-catalyzed hydrolysis of arenesulfonamides is unusual [36]. The only remaining possibility to explain the presence of depiperazinothiosildenafil and NMP in equimolar amounts might be that sildenafil used to prepare thiosildenafil was partially degraded into NMP and a sulfonic acid moiety whose ketone function in position 7 is thionated during the treatment with P_2S_5 . However, one cannot exclude the degradation of thiosildenafil during the formulation process of commercial iErect preparations, which is unknown.

3.5. Quantification of thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil in iErect commercial formulations

The contents of thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil were measured by ^1H NMR in both batches 7164 and 8164 of iErect. They were identical and amounted to 217 ± 5 and $31 \pm 2\text{ mg/capsule}$ for thiosildenafil and depiperazinothiosildenafil, respectively. A second extraction of the previously extracted powder resulted in additional 2 mg of thiosildenafil and 0.5 mg of depiperazinothiosildenafil. The amount of thiosildenafil in iErect was very high compared to those reported by Uchiyama et al. [17] and Reepmeyer and d'Avignon [23] who found respectively 0.4 mg in a 400 mg tablet and 35 mg in a $\approx 320\text{ mg}$ capsule. The “herbal” dietary supplement iErect thus places consumers at risk for potentially serious side-effects. Indeed, the unapproved analogue thiosildenafil has an inhibitory activity against the isolated enzyme

Synthetic pathway 1



Synthetic pathway 2

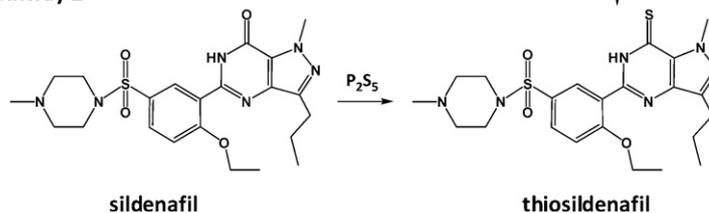


Fig. 6. Synthetic pathways of thiosildenafil described in Ref. [35]. P₂S₅: phosphorus pentasulfide; HSO₃Cl: chlorosulfonic acid; SOCl₂: thionyl chloride; NMP: N-methylpiperazine.

PDE-5 more than ten-fold higher than that of sildenafil (IC₅₀ = 0.59 and 6.86 nM, respectively) [35]. Moreover, each capsule of iErect contains more than 200 mg of thiosildenafil whereas the maximum recommended human dose of sildenafil is 100 mg/day [37]. To our knowledge, depiperazinothiosildenafil was not reported in the literature. However, acetilacid which is the benzoic acid derived from acetildenafil is active against isolated PDE-5 and displays an IC₅₀ of 5.5 nM [38]. A PDE-5 inhibitory activity of depiperazinothiosildenafil that would add to that of thiosildenafil cannot thus be excluded.

4. Conclusion

The dietary supplement iErect, sold over the Internet, marketed as 100% natural and advertised as a sexual performance enhancer for men, was found to contain two analogues of sildenafil. After isolation, their structures were elucidated using NMR, MS and IR. One of them is thiosildenafil already described in the literature [15] and the second one, named depiperazinothiosildenafil, results from the hydrolytic cleavage of the S–N bond of the sulfonamide group of thiosildenafil. To our knowledge, it is the first time that this compound is detected in a commercial formulation.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. C. Routaboul from IR and Raman Department and researchers from the Mass Spectrometry Department for technical assistance.

References

- [1] M.H. Shin, M.K. Hong, W.S. Kim, Y.J. Lee, Y.C. Jeoung, Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 793–796.
- [2] C. Shin, M. Hong, D. Kim, Y. Lim, Structure determination of a sildenafil analogue contained in commercial herb drinks, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 1060–1062.
- [3] L. Blok-Tip, B. Zomer, F. Bakker, K.D. Hartog, M. Hamzink, J. ten Hove, M. Vredendregt, D. de Kaste, Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products, *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 737–748.
- [4] P. Zou, P. Hou, M.Y. Low, H.L. Koh, Structure elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product, *Food Addit. Contam.* 23 (2006) 446–451.
- [5] J.C. Reepmeyer, J.T. Woodruff, Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of

a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a “natural” herbal dietary supplement, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 67–75.

- [6] P. Hou, P. Zou, M.Y. Low, E. Chan, H.L. Koh, Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement, *Food Addit. Contam.* 23 (2006) 870–875.
- [7] S.R. Gratz, B.M. Gamble, R.A. Flurer, Accurate mass measurement using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2317–2327.
- [8] J.C. Reepmeyer, J.T. Woodruff, Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 887–893.
- [9] P. Zou, S.S.Y. Oh, K.H. Kiang, M.Y. Low, H.L. Koh, Liquid chromatography ion trap/time-of-flight mass spectrometric study on the fragmentation of an acetildenafil analogue, *Eur. J. Mass Spectrom.* 13 (2007) 233–238.
- [10] J.C. Reepmeyer, J.T. Woodruff, D.A. d’Avignon, Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1615–1621.
- [11] M. Dusek, M. Sanda, P. Cuhra, S. Barsova, Simultaneous LC–MS/MS determination of sildenafil and related analogues added illegally to herbal products intended for the treatment of erectile dysfunction, in: *Proc. 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, Prague, November 7–9, 2007, p. 238.
- [12] P. Zou, P. Hou, S.S.Y. Oh, X. Ge, B.C. Bloodworth, M.Y. Low, H.L. Koh, Identification of benzamidenafil, a new class of phosphodiesterase-5 inhibitor, as an adulterant in a dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 255–259.
- [13] K. Kumazaka, N. Kawahara, K. Doi, T. Kojima, Y. Goda, Determination of (R)-xanthoanthrafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 227–230.
- [14] B.J. Venhuis, G. Zomer, D. de Kaste, Structure elucidation of a novel synthetic thiono analogue of sildenafil detected in an alleged herbal aphrodisiac, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 814–817.
- [15] P. Zou, P. Hou, S.S.Y. Oh, Y.M. Chong, B.C. Bloodworth, M.Y. Low, H.L. Koh, Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 279–284.
- [16] Y.H. Lam, W.T. Poon, C.K. Lai, A.Y.W. Chan, T.W.L. Mak, Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 804–807.
- [17] N. Uchiyama, K. Saisho, R. Kikura-Hanajiri, Y. Haishima, Y. Goda, Determination of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, thioquinapiperil, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 1331–1334.
- [18] X. Ge, M.Y. Low, P. Zou, L. Lin, S.O.S. Yin, B.C. Bloodworth, H.L. Koh, Structural elucidation of a PDE-5 inhibitor detected as an adulterant in a health supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 1070–1075.
- [19] T. Hasegawa, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, Y. Haishima, N. Kawahara, Y. Goda, Structural elucidation of a tadalafil analogue found in a dietary supplement, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 49 (2008) 311–315.
- [20] M.C. Lin, Y.C. Liu, Y.L. Lin, J.H. Lin, Isolation and identification of a novel sildenafil analogue adulterated in dietary supplements, *J. Food Drug Anal.* 16 (2008) 15–20.
- [21] D.M. Choi, S. Park, T.H. Yoon, H.K. Jeong, J.S. Pyo, J. Park, D. Kim, S.W. Kwon, Determination of analogs of sildenafil and vardenafil in foods by column

- liquid chromatography with a photodiode array detector, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectrometry, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 580–588.
- [22] S. Balayssac, S. Trefi, V. Gilard, M. Malet-Martino, R. Martino, M.A. Delsuc, 2D and 3D DOSY ^1H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 602–612.
- [23] J.C. Reepmeyer, D.A. d'Avignon, Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 145–150.
- [24] L. Li, M.Y. Low, F. Aliwarga, J. Teo, X.W. Ge, Y. Zeng, B.C. Bloodworth, H.L. Koh, Isolation and identification of hydroxythiohomosildenafil in herbal dietary supplements sold as sexual performance enhancement products, *Food Addit. Contam.* 26 (2009) 145–151.
- [25] T. Hasegawa, K. Takahashi, M. Saijo, T. Ishii, T. Nagata, M. Kurihara, Y. Haishima, Y. Goda, N. Kawahara, Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement, *Chem. Pharm. Bull.* 57 (2009) 185–189.
- [26] H. Goker, M. Coskun, M. Alp, Isolation and identification of a new acetildenafil analogue used to adulterate a dietary supplement: dimethylacetildenafil, *Turk. J. Chem.* 34 (2010) 157–163.
- [27] C.S. Ng, T.Y. Law, Y.K. Cheung, P.C. Ng, K.K. Choi, Development of a screening method for the detection of analogues of sildenafil and vardenafil by the use of liquid chromatography coupled with triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer, *Anal. Methods* 2 (2010) 890–896.
- [28] B.J. Venhuis, G. Zomer, H.D. Meiring, Y. Aubin, D. de Kaste, The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: a Viagra with a pop, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 735–741.
- [29] H.M. Lee, C.S. Kim, Y.M. Jang, S.W. Kwon, B.J. Lee, Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 491–496.
- [30] X. Ge, L. Li, H.L. Koh, M.Y. Low, Identification of a new sildenafil analogue in a health supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 491–496.
- [31] U. Wollein, W. Eisenreich, N. Schramek, Identification of novel sildenafil analogues in an adulterated herbal food supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2011), doi:10.1016/j.jpba.2011.07.012.
- [32] S. Trefi, C. Routaboul, S. Hamieh, V. Gilard, M. Malet-Martino, R. Martino, Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis®) by ^1H NMR 2D DOSY ^1H NMR and Raman spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 103–113.
- [33] J. Lee, H.H. Yoo, M.Y. Kang, D.H. Kim, Low-energy collision-induced dissociation of sildenafil thiono analogues: gas-phase intramolecular nucleophilic substitution through ion-neutral complexes between a cationic substrate and a thione-containing neutral nucleophile, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1767–1770.
- [34] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, third ed., John Wiley & Sons, Chichester, 2001.
- [35] J.H. Kim, Y. Kim, K.I. Choi, D.H. Kim, G. Nam, J.H. Seo, Novel pyrazolopyrimidinethione derivatives, preparation methods thereof and their use as therapeutics for erectile dysfunction, US Patent 0176371A1 (2004).
- [36] S. Searles, S. Nukina, Cleavage and rearrangement of sulfonamides, *Chem. Rev.* 59 (1959) 1077–1103.
- [37] Data Sheet, Viagra®, 2008. www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/v/viagratab.pdf.
- [38] A.S. Bell, K.N. Terrett, Pyrazolopyrimidinone antianginal agents, European Patent 0526004A1 (1993).

II.4) Conclusion

Dans ce chapitre, une trentaine de médicaments conventionnels, phytomédicaments ou compléments alimentaires a été analysée par RMN ^1H DOSY.

Souvent les méthodes chromatographiques sont préférées pour étudier des milieux complexes tels que les mélanges de principes actifs et d'excipients des médicaments surtout pour ceux à base de plantes. Quantitatives, sélectives, relativement simples et peu coûteuses, elles sont souvent utilisées pour la détection de contrefaçons.

Par ces différents exemples, nous montrons que la RMN présente plusieurs avantages. Il s'agit d'une méthode quantitative et simple à mettre en place. Mais le principal avantage de la RMN est qu'il s'agit d'une méthode globale. Elle permet donc de détecter les principes actifs mais également les excipients. La RMN DOSY ^1H permet d'avoir une séparation virtuelle des composés en fonction de leur coefficient de diffusion. Cette séparation virtuelle apporte une information supplémentaire par rapport aux autres techniques analytiques globales telles que la diffraction des rayons X ou la spectroscopie infra-rouge.

La RMN DOSY ^1H a permis de détecter 17 formulations contenant des molécules de synthèse parmi 25 phytomédicaments ou compléments alimentaires. 14 amaigrissants étaient adultérés par de la sibutramine, aujourd'hui interdite à la vente à cause d'effets secondaires graves. Trois compléments alimentaires pour des problèmes d'érection sont adultérés par du tadalafil et des analogues du sildénafil. Des analogues sont parfois utilisés, peut être afin d'éviter leur détection par des analyses spécifiques de routine qui recherchent en général les molécules les plus utilisées comme le sildénafil, vardénafil ou tadalafil.

14 médicaments conventionnels ont été analysés par RMN ^1H DOSY. Parmi les 9 formulations à base de sibutramine, trois ne contiennent pas d'excipients détectables, une ne contient pas les mêmes excipients que le Sibutral® et cinq contiennent les mêmes excipients que le Sibutral® mais dans des proportions différentes. Parmi les trois médicaments contre les problèmes d'érection, deux contiennent, en plus du principe actif, du paracétamol et les trois ont des excipients différents par rapport aux médicaments de référence. L'antipaludique et l'anti-inflammatoire non stéroïdien analysés ne contiennent pas le principe actif annoncé. Dans les médicaments analysés, la plupart contiennent des excipients différents, ceci renforce l'intérêt d'avoir une technique analytique globale pour leur caractérisation.

Dans ce chapitre, plusieurs analogues ont été détectés avec des structures plus ou moins proches du principe actif. Il est donc nécessaire d'avoir des techniques analytiques complémentaires permettant l'identification de ces composés. Le couplage des analyses par spectrométrie RMN et par spectrométrie de masse permet une meilleure caractérisation de l'échantillon. Cela permet ainsi d'éviter des faux négatifs ou faux positifs en particulier dans le cas de certains analogues qui ont des caractéristiques spectrales proches du composé original.

III) La RMN DOSY ^1H et les cyclodextrines

III.1) Etat de l'art

III.1.1) Les cyclodextrines

III.1.1.1) La structure

Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques de D-glucose provenant de la dégradation enzymatique de l'amylose. Elles furent découvertes pour la première fois par Villiers en 1891 puis caractérisées par Sharding de 1903 à 1911. Les cyclodextrines naturelles α , β et γ sont les plus couramment rencontrées. Elles contiennent respectivement 6, 7 et 8 unités de D-glucose (Duchene, et al., 2009). Leurs caractéristiques principales sont présentées dans le Tableau 10.

	α -cyclodextrine	β -cyclodextrine	γ -cyclodextrine
Nombre d'unités de glucose	6	7	8
Masse molaire	972 g.mol ⁻¹	1135 g.mol ⁻¹	1297 g.mol ⁻¹
Formule brute	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Solubilité dans l'eau à 25°C	145 g.mol ⁻¹	18,5 g.mol ⁻¹	233 g.mol ⁻¹
Diamètre (partie secondaire intérieur-extérieur)	4,9-14,6 Å	6,2-15,4 Å	7,9-17,5 Å

Tableau 10. Principales caractéristiques des cyclodextrines naturelles (Duchene, et al., 2009)

Leur structure en trois dimensions apparaît sous la forme d'un cône tronqué à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles (Figure 33). La partie extérieure est donc hautement hydrophile. Les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 se situent sur le côté le plus large du cône appelé face secondaire tandis que les hydroxyles

primaires, deux fois moins nombreux que les OH secondaires, en C6 se trouvent du côté le plus étroit (face primaire).

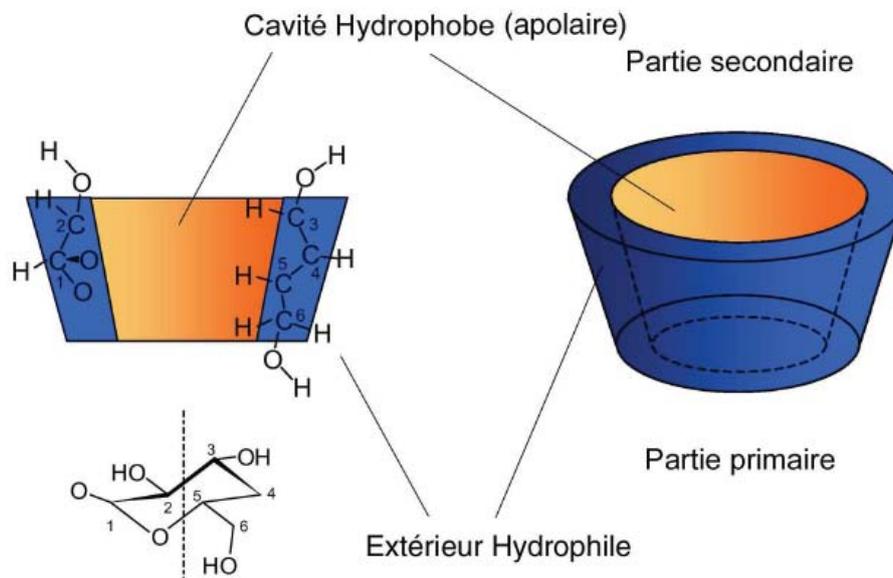


Figure 33. Structure d'une cyclodextrine

La libre rotation des hydroxyles primaires diminue le diamètre effectif de la cavité du côté où ils se trouvent, alors que les hydroxyles secondaires sont en position plus figée. La cavité interne du tore est relativement apolaire car tapissée de deux couronnes de groupes CH (proton H₃ près de la face secondaire et proton H₅ près de la face primaire), séparées par les oxygènes glucosidiques. On peut distinguer sur la figure ci-dessus que tous les protons H₃ et H₅ des différentes unités glucose pointent vers l'intérieur de la cavité des cyclodextrines.

III.1.1.2) Les propriétés complexantes

Les cyclodextrines sont des molécules hôtes appelées aussi molécules cages. Par leur structure et le caractère légèrement plus lipophile de leur cavité par rapport à l'extérieur plus hydrophile, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion avec des molécules ou des parties de molécules appelées molécules invitées (Perly, et al., 1997). La cavité apolaire des cyclodextrines est occupée par des molécules d'eau, ce qui la rend énergétiquement défavorable (interactions polaire – apolaire). Ces molécules d'eau peuvent donc être facilement substituées par une molécule invitée appropriée, moins polaire que l'eau.

Selon la taille des molécules invitées et des cyclodextrines, des complexes de stoechiométries diverses peuvent être formés. Un rapport 1 : 2, 1 : 3, ... sera obtenu si la molécule à inclure est de grande taille et que plusieurs cyclodextrines peuvent interagir avec

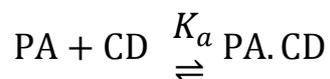
la molécule invitée. Au contraire, un rapport 2 : 1 sera observé si la cavité de la cyclodextrine est suffisamment large pour inclure plusieurs molécules de principe actif. La plupart des complexes ont une stœchiométrie 1 : 1 (Davis, et al., 2004).

La β -cyclodextrine est la cyclodextrine naturelle la plus utilisée pour la réalisation des complexes d'inclusion et ceci pour deux raisons. La β -cyclodextrine est moins chère que les autres cyclodextrines due à la facilité d'obtenir sa forme pure. La seconde raison est la taille de sa cavité bien adaptée à la formation de complexes. La cavité de l' α -cyclodextrine est souvent trop petite pour inclure des principes actifs, l'inclusion est alors très limitée. Et la cavité de la γ -cyclodextrine est quant à elle trop grande et par conséquent les interactions sont plus faibles (Xing, et al., 2009). Cependant elle présente une très basse solubilité aqueuse par rapport aux autres, Tableau 10. Cette perte de solubilité, dont les causes n'ont pas été totalement éclaircies, semble due au réseau de liaisons hydrogènes particulièrement fort dans le cas de cyclodextrines à 7 unités.

Les interactions mises en œuvre entre l'hôte et l'invité peuvent être de différentes natures comme des interactions coulombiennes, dipolaires, de Van Der Waals ou des liaisons hydrogènes. Cependant lors de la formation du complexe d'inclusion, il n'y a aucune liaison covalente qui se forme.

La formation d'un complexe est un processus réversible décrit quantitativement par une constante appelée constante d'association (K_a). Cette constante s'exprime en M^{-1} et peut être décrite par les équations suivantes :

- Pour le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1



$$K_a = \frac{[PA \cdot CD]}{[PA][CD]}$$

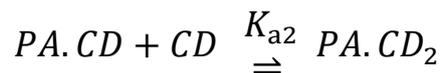
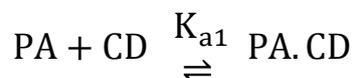
Équation 14

[PA.CD] : Concentration du complexe (PA.CD)

[PA] : Concentration en principe actif (PA)

[CD] : Concentration en cyclodextrine (CD)

- Pour le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 : 2



$$K_{a1} = \frac{[PA \cdot CD]}{[PA][CD]}$$

Équation 15

$$K_{a2} = \frac{[PA \cdot CD_2]}{[PA \cdot CD][CD]}$$

Équation 16

III.1.1.3) Les domaines d'application dans le milieu pharmaceutique

Les propriétés complexantes des cyclodextrines avec un large panel de molécules et leur caractère biodégradable les prédisposent à de nombreuses et diverses applications dans des domaines tels que la cosmétique, l'agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, l'environnement...

Dans cette partie, je présenterai quelques exemples d'utilisation de cyclodextrines dans l'industrie pharmaceutique.

III.1.1.3.1) L'augmentation de la stabilité

Certaines molécules ont une faible stabilité. Par exemple, la vitamine E est connue pour être très sensible à la lumière et à l'air. L'inclusion de cette molécule dans une cyclodextrine permet de la protéger des agressions du milieu extérieur (Regiert, 2006). D'autres publications montrent que l'encapsulation d'un composé dans les cyclodextrines permet d'augmenter sa stabilité vis-à-vis de la lumière, la température, l'hydrolyse,

l'oxydation, les réarrangements stériques, la racémisation et autres formes d'isomérisation, la polymérisation et même la décomposition enzymatique de nombreuses molécules (Sekharan, et al., 2010) (Fauvelle, et al., 2001).

III.1.1.3.2) Le masquage du goût et de l'odeur

Certaines molécules ont un goût ou une odeur désagréable. C'est le cas par exemple de l'eszopiclone. Ce principe actif utilisé pour traiter les insomnies possède un mauvais goût amer qui reste en bouche. L'inclusion de la molécule dans la cavité de la cyclodextrine permet de la masquer aux papilles gustatives et ainsi d'atténuer son amertume (Linde, et al., 2009). Le même procédé est également utilisé pour masquer les mauvaises odeurs de certaines formulations (Duchene, et al., 2009).

III.1.1.3.3) L'augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité

C'est dans ce domaine que les cyclodextrines sont les plus employées en pharmacie. La biodisponibilité se définit par la quantité de principe actif qui parvient à son site d'action et la vitesse avec laquelle il y accède. La mesure au niveau du site d'action étant difficile à obtenir, on considère plus généralement la biodisponibilité comme la fraction du médicament qui atteint la circulation générale. Elle dépend de plusieurs facteurs comme sa vitesse de dissolution, sa solubilité ou sa vitesse d'absorption intestinale. L'encapsulation d'un principe actif par une cyclodextrine permet d'augmenter sa solubilité aqueuse, sa vitesse de dissolution et par conséquent d'accroître sa biodisponibilité. Les exemples dans la bibliographie de molécules encapsulées dans une cyclodextrine pour améliorer sa solubilité sont très nombreux. Pour n'en citer que quelques-uns, les cyclodextrines sont utilisées pour augmenter la solubilité des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'ibuprofène, le nimésulide (Piel, et al., 1997), le naproxène (Mura, et al., 2003)... des antihistaminiques tels que le terféndine et la cinnarizine (Redenti, et al., 2000) ou des antimycosiques tels que le miconazole (Barillaro, et al., 2007) et le kétoconazole (Selva, et al., 1998).

III.1.1.3.4) La diminution des effets indésirables

Le principal effet secondaire des anti-inflammatoires non stéroïdiens est l'irritation des muqueuses gastro-intestinales. L'encapsulation de ces anti-inflammatoires par des cyclodextrines permet de diminuer les effets secondaires pour plusieurs raisons. L'augmentation de la solubilité et par conséquent de la biodisponibilité de la molécule permet de réduire les doses et ainsi les effets secondaires. De plus, la dissolution rapide de la

molécule évite le contact direct des cristaux de principe actif avec la muqueuse gastrique et donc diminue son irritation (Warrington, 1993).

III.1.1.3.5) Le ciblage moléculaire

Une application très différente est le « ciblage moléculaire ». Cette technique consiste à diriger le principe actif vers le site biologique où il pourra exprimer son activité. Dans cette approche, le transporteur doit permettre d'acheminer le médicament vers un site précis. Des cyclodextrines peuvent ainsi être greffées avec des molécules ayant un récepteur spécifique dans l'organisme et devenir un excellent vecteur moléculaire. La β -cyclodextrine greffée d'un peptide enképhaline ou endorphine est destinée au ciblage de médicaments neurotropes c'est à dire agissant directement au niveau cérébral. L'enképhaline ou endorphine présentent une très grande affinité pour les récepteurs cérébraux de la morphine (Perly, et al., 1997).

III.1.2) Les complexes d'encapsulation par des cyclodextrines

III.1.2.1) Les techniques d'encapsulation (Charoenchaitrakool, et al., 2002) (Zhang, et al., 2009) (Doijad, et al., 2007)

La formation d'un complexe consiste essentiellement à substituer les molécules d'eau présentes dans la cavité de la cyclodextrine par une autre molécule. La libération de ces molécules d'eau et la formation d'interactions de Van der Waals entre la cyclodextrine et la molécule invitée amènent le complexe à un niveau d'énergie plus favorable. Il existe différents procédés pour réaliser des complexes d'inclusion.

➤ **La complexation en solution**

La complexation en solution consiste à dissoudre la cyclodextrine et la molécule à inclure dans un milieu souvent aqueux et à laisser l'équilibre s'établir. Le complexe formé est récupéré sous forme solide après sa précipitation. Cette précipitation peut se faire par diverses façons :

- précipitation spontanée
- précipitation par refroidissement
- neutralisation
- lyophilisation

- évaporation du solvant

La complexation en suspension est quasi identique sauf que les composés ne sont pas dissous mais maintenus en suspension à l'aide d'une forte agitation. Le principal inconvénient de cette méthode est l'utilisation d'un solvant et donc la nécessité de l'éliminer une fois le complexe formé.

➤ **La complexation en phase solide**

La complexation peut être envisagée en phase solide par co-broyage. L'avantage principal de cette technique est l'absence de solvant. Néanmoins des phénomènes non désirés peuvent apparaître comme un changement polymorphique et/ou une diminution de la stabilité du complexe.

➤ **La complexation par malaxage**

La technique de malaxage consiste à humidifier les composés afin d'obtenir une pâte puis de la malaxer. La présence d'eau favorise la formation d'un complexe d'inclusion (Sauceau, et al., 2008).

➤ **La complexation par CO₂ à l'état supercritique** (Delattre, 2007) (Sauceau, et al., 2008)

Lorsqu'un fluide est placé dans des conditions de température et de pression supérieures à son point critique, il entre dans un état de matière appelé supercritique (Figure 34). L'état supercritique d'un fluide se caractérise par un état intermédiaire entre le liquide et le gaz (avec une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide et un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au fluide liquide).

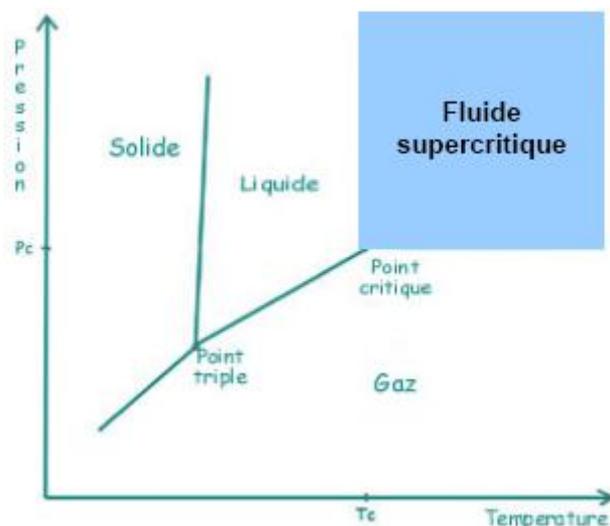


Figure 34. Diagramme de phase

Les fluides supercritiques possèdent un certain pouvoir solvant, ajustable en fonction de la pression et de la température. Le dioxyde de carbone à l'état supercritique a été proposé pour réaliser l'inclusion de substances actives diverses dans des cyclodextrines en 1990. L'avantage de l'utilisation du CO₂ est qu'il est non toxique, facilement disponible et par conséquent peu cher. Son point critique est facile à atteindre (T_c = 31,1 °C; P_c = 73,8 bar). Grâce à sa faible température critique, le CO₂ supercritique permet de développer des procédés à basse température pour des produits thermosensibles. A la fin de l'encapsulation, une phase appelée de détente est réalisée. Elle consiste à abaisser la pression ce qui provoque le passage du gaz carbonique de l'état supercritique à l'état gazeux et permet de récupérer le complexe à l'état solide et exempt de tous résidus de solvant d'extraction.

Ce procédé présente de nombreux avantages dont celui de réaliser une réaction d'inclusion simple, reproductible et en une seule étape. L'absence de solvant permet de supprimer l'étape d'élimination de ce dernier et par conséquent de réduire l'investissement, la pollution et le coût.

III.1.2.2) Les techniques d'analyses des complexes

Une fois la substance incluse dans la cavité de la cyclodextrine, ses propriétés physico-chimiques sont modifiées. Toutes les techniques utilisées pour caractériser l'existence d'un complexe d'inclusion mettent en évidence une modification de la molécule invitée.

III.1.2.2.1) A l'état liquide

III.1.2.2.1.1) La RMN

- La RMN ^1H

La formation d'un complexe entraîne la modification de l'environnement magnétique des noyaux des molécules qui jouent un rôle lors de l'encapsulation. Ces modifications peuvent être détectées par spectrométrie RMN. En effet, la modification de la fréquence de résonance des protons intérieurs de la cyclodextrine H₃ et H₅ couplée à celle de la substance invitée permet d'établir la présence ou non d'un complexe mais également d'en déterminer la géométrie. La Figure 35 montre les spectres RMN ^1H d'un principe actif, la vinpocétine (I), de la β -cyclodextrine (II) et du complexe obtenu en présence d'acide tartrique (III). On remarque bien les déplacements vers les champs forts des signaux des protons intérieurs de la cyclodextrine H₃ et H₅. Ces variations de déplacements chimiques sont causées par l'effet anisotropique produit par l'inclusion des cycles riches en π -électrons de la molécule invitée dans la cage hydrophobique de la cyclodextrine. Les déplacements vers les champs forts des signaux des protons A₁/A₂ et A₄ du principe actif sont dus à la proximité des atomes de la cyclodextrine qui sont riches en électrons π car ils sont associés aux atomes d'oxygène. Les déplacements vers les champs faibles des signaux des protons A₃ sont eux sûrement dus au changement de polarité (Ribeiro, et al., 2005).

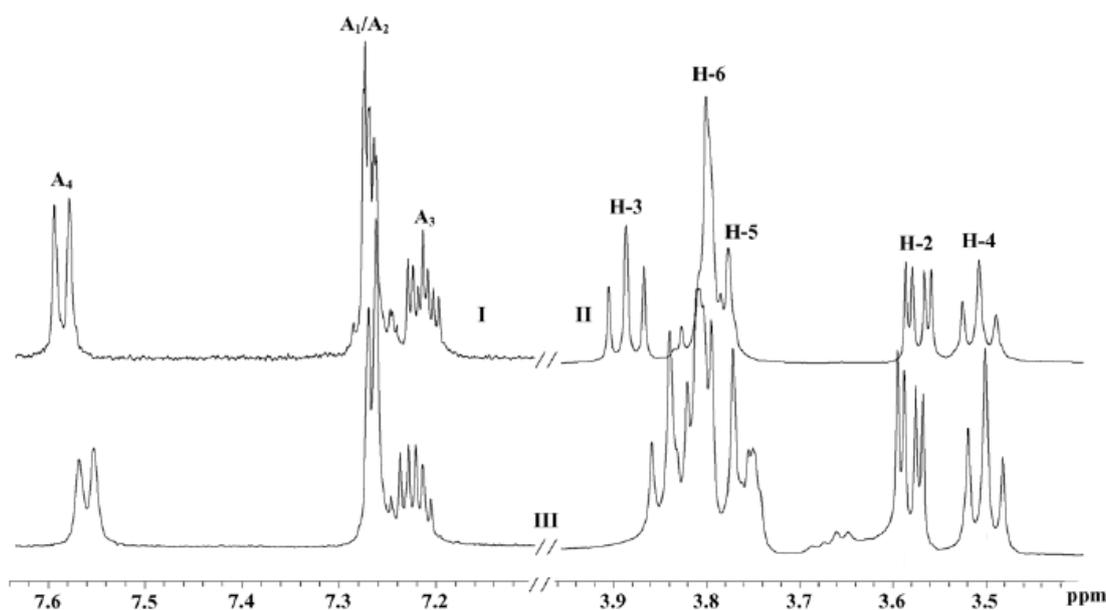


Figure 35. Spectres RMN ^1H d'un principe actif, la vinpocétine (I), de la β -cyclodextrine (II) et du complexe en présence d'acide tartrique (III) enregistrés dans D_2O (Ribeiro, et al., 2005).

Comme le processus d'association-dissociation est très rapide, la modification observée est une moyenne des déplacements chimiques des protons de la molécule libre et complexée. En faisant varier la concentration en cyclodextrine et en principe actif, on peut définir la stœchiométrie du complexe (méthode de Job) ou mesurer la constante de stabilité (méthode de Benesis-Hildebrand) (Bakkour, et al., 2006). Ces deux méthodes seront décrites ultérieurement.

- L'expérience RMN ROESY

L'expérience ROESY (Rotating frame Overhauser Effect spectroscopy) est utilisée pour observer les interactions dipolaires de protons proches dans l'espace. Les interactions entre les protons intérieurs de la cyclodextrine (H₃ et H₅) et la molécule invitée confirment la présence d'un complexe d'inclusion. De ce fait, elle permet de proposer une hypothèse sur la géométrie du complexe (Ribeiro, et al., 2005).

- L'analyse des temps de relaxation T₁

Lors d'une inclusion dans une cyclodextrine, la mobilité du principe actif est réduite ce qui entraîne une diminution des temps de relaxation du principe actif. Les temps de relaxation longitudinale peuvent être mesurés par RMN ¹H par une séquence appelée inversion-récupération (inversion-recovery). L'inconvénient de cette technique pour analyser les complexes est que la variation des temps de relaxation est faible et qu'elle nécessite de dégazer l'échantillon pour éviter des artefacts lors de la mesure (Redenti, et al., 1999).

III.1.2.2.1.2) Le diagramme de solubilité

Les diagrammes de solubilité ou isothermes de solubilité sont réalisés en plaçant un excès de substance en présence de solutions aqueuses de cyclodextrines de concentrations croissantes, à une température donnée. Après un temps d'agitation nécessaire pour atteindre l'équilibre de la complexation (de plusieurs heures à plusieurs jours), la quantité de substance solubilisée est déterminée par une méthode de dosage appropriée. Un diagramme de solubilité est alors réalisé en reportant sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe vertical et la concentration molaire en agent complexant sur l'axe horizontal. Higuchi et Connors ont classé les différents types de diagrammes (Figure 36) caractérisant les interactions substrat-ligand, auxquelles peuvent être assimilées les interactions cyclodextrine-molécule invitée.

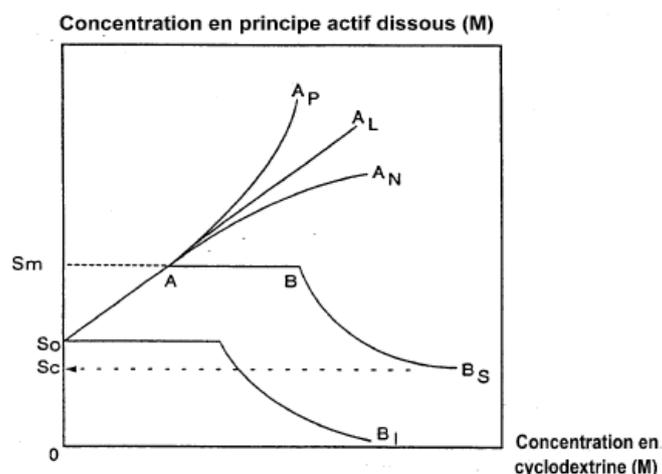


Figure 36. Types de diagrammes de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors (Higuchi, et al., 1965).

Le type A est obtenu quand la solubilité apparente de la substance augmente avec des concentrations croissantes en cyclodextrine. Une augmentation linéaire de la solubilité est représentée par la courbe A_L alors que les courbures positive et négative sont représentées respectivement par les courbes A_P et A_N. Les profils linéaires sont généralement attribués à une stœchiométrie 1 : 1. Un diagramme de type A_P traduit la formation simultanée de complexes de stœchiométries différentes (1 : 1 à l'origine, puis 1 : 2 ou 1 : 3, ...) (Higuchi, et al., 1965).

Les courbes de type B sont observées lorsque le complexe d'inclusion a une solubilité limitée. Si on considère la courbe B_S, la solubilité du substrat est augmentée par l'ajout de cyclodextrine jusqu'au point A. Du point A à B, la solubilité maximale du complexe est atteinte puis l'ajout de cyclodextrine entraîne une précipitation du complexe. Pour la courbe B_I, l'ajout de cyclodextrine n'entraîne pas une augmentation de solubilité du substrat. De plus, au bout d'une certaine concentration, le complexe d'inclusion précipite. La constante d'association K_a d'un complexe 1 : 1 peut être déterminée à partir de la portion linéaire des diagrammes B_S ou A selon l'équation (Higuchi, et al., 1965):

$$K_a = \frac{\text{pente}}{S_0 * (1 - \text{pente})}$$

Équation 17

S₀ : Solubilité intrinsèque de la substance active.

III.1.2.2.1.1) La spectroscopie UV

Beaucoup de molécules invitées présentent une modification de leur spectre d'absorption UV-visible lorsqu'elles sont incluses dans une cyclodextrine. Généralement, ces modifications spectrales sont similaires à celles observées lors d'un changement de solvant. On peut alors observer un déplacement du maximum d'absorption ou une diminution du coefficient d'extinction molaire (Van Hees, et al., 2002).

La Figure 37 montre l'influence de l'addition de β -cyclodextrine dans un rapport molaire variant de 0 à 100 mM sur le spectre d'une solution de piroxicam. L'ajout de cyclodextrine entraîne un effet hypsochrome et hypochrome sur le spectre UV du piroxicam.

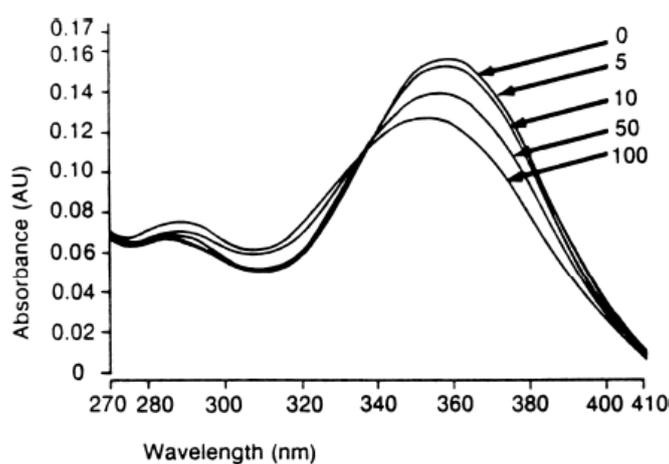


Figure 37. Influence de l'addition de la β -cyclodextrine sur le spectre UV d'une solution aqueuse d'un principe actif, le piroxicam à 95 μ M et à pH 5 (Acerbi, et al., 1990)

En mesurant les variations de λ_{\max} ou de l'absorbance en fonction de la concentration en cyclodextrine, la constante d'association d'un complexe 1 : 1 peut être déterminée selon la méthode de Benesis-Hildebrand (Gibaud, et al., 2005).

Valero en 1996 a démontré que la position des bandes d'absorption de la molécule complexée pouvait également être utilisée pour estimer la polarité du microenvironnement de la cyclodextrine. Pour ce faire, ils ont analysé les variations du λ_{\max} du principe actif dans des solvants de différentes polarités qu'ils comparent ensuite aux variations du λ_{\max} du principe actif dues à l'encapsulation. A l'aide de modèles créés sur la relation entre la polarité des solvants et les variations du λ_{\max} , ils évaluent la constante diélectrique du microenvironnement de la β -cyclodextrine (Valero, et al., 1996).

III.1.2.2.1.2) La spectrométrie de masse

D'après la littérature, il n'y a pas de changement entre la phase liquide et la phase gazeuse en terme de complexe ; la dissociation entre la molécule hôte et invitée se fait rarement. Les complexes peuvent donc être analysés par spectrométrie de masse. Différentes techniques ont été utilisées avec différentes sources (ESI ou API) et différents analyseurs (triple quadrupole, trappe à ion) que ce soit en mode d'ionisation positive ou négative (Selva, et al., 1996) (Dall'Asta, et al., 2009) (Kralj, et al., 2009). Les échantillons sont en général dissous dans une solution aqueuse ou un mélange acétonitrile-eau puis introduits dans le spectromètre.

III.1.2.2.1.3) La microcalorimétrie

La mesure de la chaleur libérée lors du mélange de deux solutions, l'une contenant la cyclodextrine et l'autre contenant le principe actif, permet de quantifier l'énergie libérée par la formation du complexe. En faisant varier les débits des deux solutions, on peut calculer l'enthalpie et l'entropie de formation du complexe, ainsi que la constante d'association de celui-ci (Sun, et al., 2005).

III.1.2.2.1.4) La fluorimétrie

L'intensité de la fluorescence d'un principe actif est modifiée lorsque ce dernier est encapsulé dans une cyclodextrine.

La figure ci-dessous montre l'influence de l'addition de sulfobutyléther- β -cyclodextrine dans un rapport molaire variant de 0 à 6 mM sur le spectre d'une solution de piroxicam. L'ajout de cyclodextrine entraîne une augmentation de la fluorescence sur le spectre de fluorimétrie du piroxicam (Zhou, et al., 2006). Cette augmentation est proportionnelle au taux d'encapsulation du principe actif. On peut alors étudier la stoechiométrie du complexe par la méthode de Job et calculer la constante d'association du complexe par la méthode de Benesis-Hildebrand (Zhou, et al., 2006).

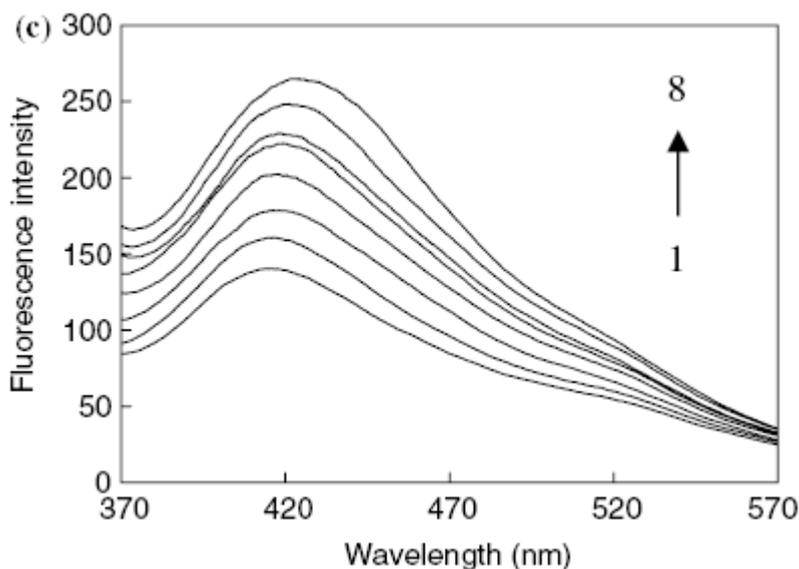


Figure 38. Influence de l'addition de la sulfobutyléther- β -cyclodextrine sur le spectre de fluorescence d'une solution aqueuse d'un principe actif, le piroxicam à 1.10^{-5} M et à pH 5,5. Les concentrations en sulfobutyléther- β -cyclodextrine sont : (1) 0 M, (2) 5.10^{-4} M, (3) 1.10^{-3} M, (4) 2.10^{-3} M, (5) 3.10^{-3} M, (6) 4.10^{-3} M, (7) 5.10^{-3} M, (8) 6.10^{-3} M (Zhou, et al., 2006).

III.1.2.2.1.5) La solubilité différentielle

Dans certains solvants organiques, la cyclodextrine n'est pas soluble. Dans ces conditions, le principe actif inclus dans la β -cyclodextrine reste piégé dans la cavité alors que la fraction non incluse est dissoute dans le solvant. Depuis longtemps les solvants organiques sont donc utilisés pour laver les complexes d'inclusion et enlever les molécules non incluses.

Frömming et Szejtli en 1994 ont décrit une technique analytique appelée la solubilité différentielle. Ils ont dissous leur produit dans l'acétone. La β -cyclodextrine n'étant pas soluble dans ce solvant, seul le principe actif libre est analysé. Si 50 % d'eau est ensuite ajouté au mélange, la cyclodextrine et le principe actif encapsulé deviennent solubles. Il est alors possible d'analyser la totalité du principe actif libre et lié.

Van Hees et al en 2002 ont repris ces analyses avec le complexe piroxicam- β -cyclodextrine mais en remplaçant l'acétone par de l'acétonitrile. La β -cyclodextrine est également insoluble dans l'acétonitrile. De plus ce solvant est moins volatile et la fenêtre spectrale d'analyse UV peut descendre plus bas en longueur d'onde (jusqu'à 200 nm) qu'avec l'acétone (Van Hees, et al., 2002).

III.1.2.2.2) A l'état solide

III.1.2.2.2.1) La diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet d'observer un changement du réseau cristallin lors de la formation d'un complexe. En général, on observe la disparition ou la diminution des raies de diffraction du principe actif synonyme, d'une perte de cristallinité et donc d'une possible complexation. La figure ci-dessous montre le spectre obtenu par diffraction des rayons X d'un principe actif, le sel de trométhamine de l'ibuprofène (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d). Le spectre obtenu pour le mélange physique comporte des raies caractéristiques du principe actif et de la β -cyclodextrine avec une prédominance de cette dernière. Le spectre obtenu pour le complexe est complètement différent dû à la perte de cristallinité qui est généralement associée à la formation d'un complexe d'inclusion (Al Omari, et al., 2009).

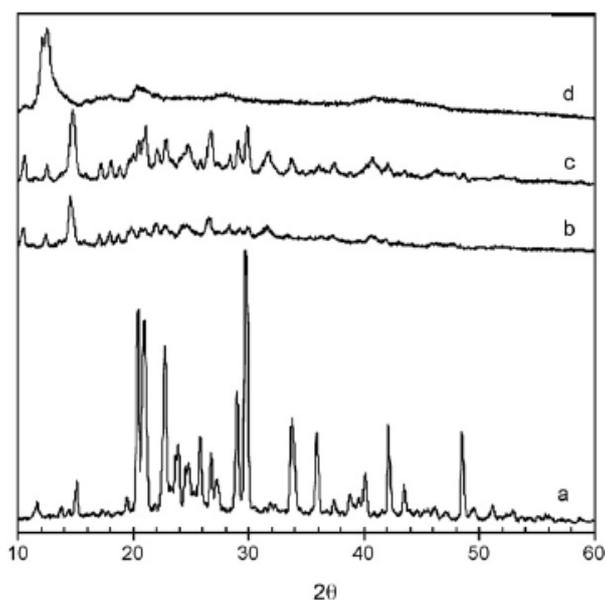


Figure 39. Spectres obtenus par diffraction des rayons X d'un principe actif, l'ibuprofène (sel de trométhamine (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d) (Al Omari, et al., 2009)

III.1.2.2.2.2) L'analyse thermique différentielle (DSC)

La DSC permet d'observer les événements thermiques caractéristiques d'un composé tels que la fusion, les transitions de phases, l'oxydation etc. Lors de la formation d'un complexe d'inclusion, les propriétés cristallographiques des composés changent. Dès lors des analyses thermiques peuvent être utilisées pour observer ce changement.

On observe généralement la disparition du pic de fusion de la molécule invitée. La mesure de l'enthalpie absorbée au cours de la fusion est directement proportionnelle à la quantité du composé présent sous forme cristalline. Il est alors possible de calculer le taux d'encapsulation ρ du complexe d'inclusion selon la formule ci-dessous (Sauceau, et al., 2008) :

$$\rho = 1 - \left(\frac{\Delta H_{PAc}}{\Delta H_{PAI}} \right)$$

Équation 18

ΔH_{PAc} : Enthalpie du principe actif complexé

ΔH_{PAI} : Enthalpie du principe actif libre

III.1.2.2.2.3) La microscopie

La microscopie à balayage électronique MEB ou SEM en anglais (scanning electron microscopy) est souvent utilisée pour observer le changement de morphologie de la molécule invitée lorsqu'elle est encapsulée dans une cyclodextrine. La figure ci-dessous montre l'analyse MEB d'un principe actif, le sel de trométhamine de l'ibuprofène (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d). Dans le mélange physique, la morphologie obtenue est un mélange de la morphologie du principe actif et de celle de la β -cyclodextrine avec une prédominance de cette dernière. Par contre il est impossible de reconnaître la morphologie des composés dans l'analyse du complexe ce qui prouve une interaction entre le principe actif et la cyclodextrine.

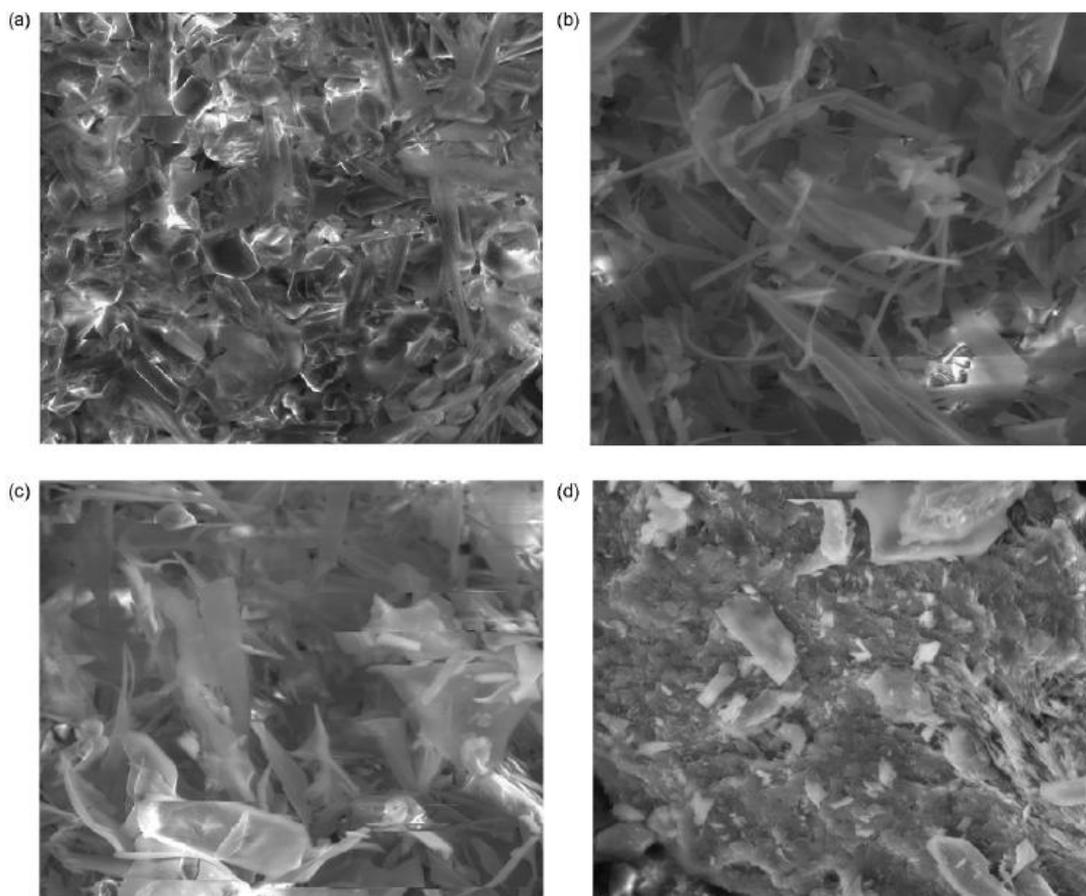


Figure 40. Images MEB d'un principe actif, l'ibuprofène (le sel de trométhamine) (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d) (Al Omari, et al., 2009)

III.1.2.2.2.4) Les spectroscopies vibrationnelles: FT-IR et Raman

Lors de la formation du complexe d'inclusion, les interactions entre le principe actif et la cyclodextrine vont modifier les modes de vibration. On peut alors observer un déplacement ou une modification de l'intensité des bandes caractéristiques des cyclodextrines et des groupements fonctionnels de la molécule invitée qui s'inclue dans la cyclodextrine par spectrométrie FT-IR ou RAMAN.

La figure ci-dessous montre les spectres FT-IR du principe actif, la cladribine (a), du mélange physique (b), du complexe (c) et de la 2HP- β -cyclodextrine (d). Les flèches noires marquent des bandes de vibration caractéristiques du principe actif à l'état non complexé. Ces bandes de vibration deviennent peu visibles dans le mélange physique et disparaissent dans le complexe.

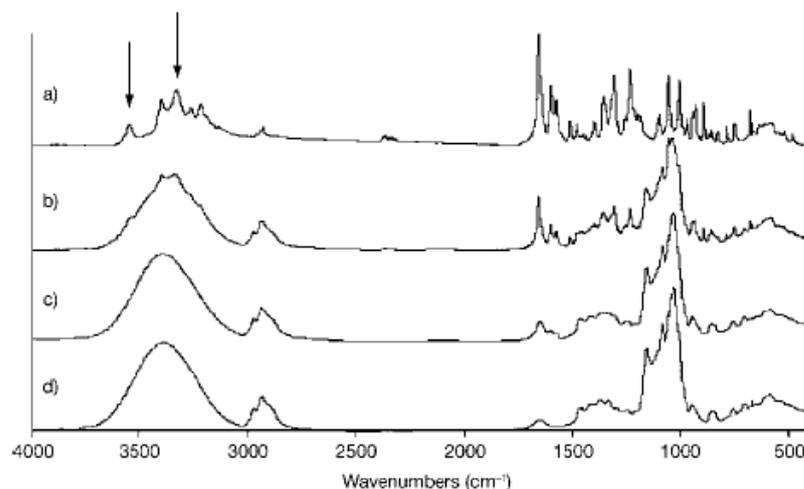


Figure 41. Spectres FT-IR d'un principe actif, la cladrifine (a), du mélange physique (b), du complexe (c) et de la 2HP-β-cyclodextrine (Van Axel Castelli, et al., 2008)

III.1.2.2.3) Caractéristiques d'un complexe

Un complexe est caractérisé par une stœchiométrie qui peut être déterminée par la méthode de Job et une constante d'association qui peut être déterminée par la technique de Benesis-Hildebrand.

III.1.2.2.3.1) La méthode de Job

La méthode des variations continues de P. Job permet de déterminer la stœchiométrie d'un complexe en solution. Le procédé consiste à préparer une série de mélanges en proportions variables de la molécule invitée par rapport à la molécule hôte et que la concentration totale des solutions soient fixes. Un rapport r , compris entre 0 et 1, est calculé pour chaque solution préparée :

$$r = \frac{[PA]}{([PA][CD])}$$

Équation 19

[PA] : Concentration en principe actif

[CD] : Concentration en cyclodextrine

Ces différentes solutions sont ensuite analysées par spectroscopie (UV, RMN ou fluorescence). L'absorbance en UV, l'intensité en fluorescence ou la variation des déplacements chimiques en RMN sont mesurées, c'est la quantité P.

La stœchiométrie peut être déterminée en traçant la quantité $P^*[PA]$ en fonction du rapport r . Une courbe en cloche est alors obtenue et la valeur de r au maximum de la courbe donne la stœchiométrie du complexe.

La méthode de Job possède cependant ses limites. Lorsqu'il y a formation de dimères du principe actif, son encapsulation par la cyclodextrine peut entraîner la séparation des dimères et engendrer des variations de déplacements chimiques dues à la séparation du dimère. Les variations de déplacements chimiques ne venant pas exclusivement de la formation du complexe d'inclusion, la méthode de Job est alors faussée (Rozou, et al., 2004).

III.1.2.2.3.2) La technique de Benesis-Hildebrand

La méthode de Benesis-Hildebrand permet de déterminer la constante d'association d'un complexe en solution. Historiquement, cette méthode a été développée par Benesis et Hildebrand pour étudier des complexes par spectrométrie UV en 1949. La constante d'association est déterminée en observant la différence d'absorption entre la molécule complexée et la molécule libre.

Le procédé consiste à suivre l'absorbance d'un principe actif lorsque la cyclodextrine est ajoutée. Ce procédé permet de déterminer la constante d'association d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1, à condition qu'un des composés soit en très large excès par rapport à l'autre, par l'équation suivante (Gibaud, et al., 2005) :

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{[PA]K\Delta\epsilon[CD]} + \frac{1}{[PA]\Delta\epsilon}$$

Équation 20

ΔA : Différence d'absorption entre la molécule complexée et la molécule libre

$\Delta\epsilon$: Différence du coefficient d'extinction entre la molécule complexée et la molécule libre

$[PA]$: Concentration en principe actif

$[CD]$: Concentration en cyclodextrine

La constante d'association peut alors être déterminée en traçant $1/\Delta A$ en fonction de $1/[PA]$. $\Delta\epsilon$ est alors donné par l'ordonnée à l'origine et la constante d'association K_a est calculée à partir de la pente de la droite.

L'équation de Benesis-Hildebrand a ensuite été adaptée pour des études par fluorimétrie (Zhou, et al., 2006) :

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{K_a kQ[PA][CD]} + \frac{1}{kQ[PA]}$$

Équation 21

F : Intensité de la fluorescence du principe actif en présence de cyclodextrine

F₀ : Intensité de la fluorescence du principe actif sans cyclodextrine

k : Constante de l'appareil

Q : Rendement quantique du complexe

L'équation de Benesis-Hildebrand a ensuite été adaptée pour des études par RMN (Bakkour, et al., 2006) :

$$\frac{1}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{1}{K_a \Delta\delta_c[CD]} + \frac{1}{\Delta\delta_c}$$

Équation 22

$\Delta\delta_{obs}$: Variation des déplacements chimiques de la molécule invitée pour une concentration donnée en cyclodextrine.

$\Delta\delta_c$: Variation des déplacements chimiques entre le principe actif complexé et le principe actif libre à saturation

III.1.2.2.4) Etude des complexes par RMN DOSY ¹H

L'encapsulation d'un principe actif modifie son coefficient de diffusion. De ce fait, les complexes peuvent également être caractérisés par RMN DOSY ¹H.

III.1.2.2.4.1) Complexe de stœchiométrie 1 :1 (Bakkour, et al., 2006) (Pescitelli, et al., 2010) (Cameron, et al., 2001)

Le coefficient de diffusion observé par RMN DOSY ¹H est une moyenne entre le coefficient de diffusion de la molécule à l'état libre et le coefficient de diffusion de la molécule à l'état lié. Pour les complexes de stœchiométrie 1 :1, le coefficient de diffusion est décrit par l'équation suivante :

$$D_{\text{obs}} = (1 - \rho) * D_{\text{PA,libre}} + \rho * D_{\text{lié}}$$

Équation 23

D_{obs} : Coefficient de diffusion observé

ρ : Taux d'encapsulation

$D_{\text{PA,libre}}$: Coefficient de diffusion de la molécule à l'état libre

$D_{\text{lié}}$: Coefficient de diffusion observé de la molécule à l'état lié

Le taux d'encapsulation peut donc être déterminé par (Cameron, et al., 2001):

$$\rho = \frac{D_{\text{obs}} - D_{\text{lié}}}{D_{\text{lié}} - D_{\text{libre}}}$$

Équation 24

Cependant le coefficient de diffusion du complexe ($D_{\text{lié}}$) ne peut pas être mesuré. Pour un complexe de stœchiométrie 1 :1, il est considéré comme égal au coefficient de diffusion de la cyclodextrine libre ($D_{\text{lié}} \approx D_{\text{CD}}$) (Pescitelli, et al., 2010) (Bakkour, et al., 2006).

Le taux d'encapsulation peut également être défini par l'équation suivante :

$$\rho = \frac{[\text{PA. CD}]}{[\text{PA}] + [\text{PA. CD}]}$$

Équation 25

Où [PA.CD] est la concentration du complexe. Sachant que la constante d'association est définie en fonction des concentrations des espèces en solution par l'équation 15, la constante d'association peut être reliée au taux d'encapsulation par l'équation suivante :

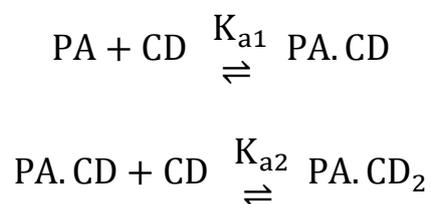
$$\rho = \frac{K_A * [\text{CD}]}{1 + K_A * [\text{CD}]}$$

Équation 26

En pratique, le taux d'encapsulation est calculé pour différentes concentrations de cyclodextrine puis un tracé est réalisé du taux d'encapsulation en fonction de la concentration de la cyclodextrine.

III.1.2.2.4.2) Complexes de stœchiométrie 1 : 2

Dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 : 2, nous avons vu qu'il y a davantage d'espèces en équilibre.



Le coefficient de diffusion observé est une moyenne entre les différentes espèces en solution, selon les équations suivantes (Cabaleiro-Lago, et al., 2005) (Guerrero-Martinez, et al., 2006) (Gierczyk, et al., 2010) :

$$D_{\text{PA,obs}} = D_{\text{PA,libre}} * \rho_{\text{PA,libre}} + D_{1:1} * \rho_{1:1}^{\text{PA}} + n * D_{1:2} * \rho_{1:2}^{\text{PA}}$$

$$D_{\text{CD,obs}} = D_{\text{CD,libre}} * \rho_{\text{CD,libre}} + D_{1:1} * \rho_{1:1}^{\text{CD}} + n * D_{1:2} * \rho_{1:2}^{\text{CD}}$$

$D_{1:1}$: coefficient de diffusion du complexe de stœchiométrie 1 : 1.

$D_{1:2}$: coefficient de diffusion du complexe de stœchiométrie 1 : 2.

$\rho_{1:1}^{\text{PA}}$: Le taux d'encapsulation du principe actif du complexe de stœchiométrie 1 : 1.

$\rho_{1:2}^{\text{PA}}$: Le taux d'encapsulation du principe actif du complexe de stœchiométrie 1 : 2.

$\rho_{1:1}^{\text{CD}}$: Le taux d'encapsulation de la cyclodextrine du complexe de stœchiométrie 1 : 1.

$\rho_{1:2}^{\text{CD}}$: Le taux d'encapsulation de la cyclodextrine du complexe de stœchiométrie 1 : 2.

Avec $n=1$ pour le principe actif et $n=2$ pour la cyclodextrine

Résoudre cette équation est alors plus compliquée que dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1.

Certains auteurs tels que Celia Cabaleiro-lago, en 2005, proposent d'utiliser des analyses multivariées. Les fractions molaires de chaque espèce peuvent être référencées en fonction de leurs concentrations totales (Cabaleiro-Lago, et al., 2005):

$$\rho_{PA, libre} = \frac{[PA]}{[PA]_T} \quad \rho_{CD, libre} = \frac{[CD]}{[CD]_T} \quad \rho_{1:1}^{PA} = \frac{[CD-PA]}{[PA]_T}$$

$$\rho_{1:2}^{PA} = \frac{[CD_2-PA]}{[PA]_T} \quad \rho_{1:1}^{CD} = \frac{[CD-PA]}{[CD]_T} \quad \rho_{1:2}^{CD} = \frac{[CD_2-PA]}{[CD]_T}$$

Les termes inconnus peuvent alors être déterminés par la méthode des moindres carrés non linéaire en utilisant un programme basé sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt.

III.1.2.3) Les agents ternaires

Nous avons vu que l'utilisation de cyclodextrines permet d'augmenter la solubilité d'un principe actif et par conséquent d'améliorer sa biodisponibilité. Cependant le résultat obtenu n'est pas toujours satisfaisant et de grandes quantités de cyclodextrines sont souvent requises pour obtenir la concentration adéquate en substance active. Dans un souci de diminution des coûts et de leurs effets toxiques éventuels, la quantité de cyclodextrine a été limitée. Différentes approches ont donc été réalisées pour améliorer la solubilité des complexes :

- Modification des cyclodextrines

Il est possible de greffer une grande variété de groupements chimiques sur les cyclodextrines afin de modifier leurs propriétés telles que leur solubilité. Les cyclodextrines modifiées les plus courantes sont les dérivés méthylés (par exemple, le CRYSMEB est la forme méthylée en position 2 de la β -cyclodextrine) et les dérivés hydroxypropylés (par exemple, la hydropropyl- β -cyclodextrine) (Palma, et al., 2009).

- Ajout d'un agent ternaire

De nombreux auteurs ont montré l'augmentation de la solubilité des complexes en ajoutant un agent ternaire (Piel, et al., 1997) (Mura, et al., 2003) (Ribeiro, et al., 2005) (Palma, et al., 2009) (Sauceau, et al., 2008). Il en existe deux sortes soit des polymères hydrosolubles tels que le polyvinylpyrrolidone (Ribeiro, et al., 2007) (Palma, et al., 2009) soit des agents acides ou basiques de faible poids moléculaire (Redenti, et al., 1999). C'est à cette dernière catégorie d'agents ternaires que nous nous sommes intéressés.

Typiquement lorsque le principe actif présente un caractère acide, l'agent ternaire utilisé est une base (arginine, lysine, triethanolamine, etc). Inversement, lorsque le principe

actif présente un caractère basique, l'agent ternaire utilisé est un acide (acide tartrique, acide maléique, etc).

L'agent ternaire forme des liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles de la cyclodextrine ce qui augmente la solubilité de celle-ci. Il crée également des interactions électrostatiques avec le principe actif. Le sel formé possède alors une meilleure solubilité aqueuse. Par contre, le principe actif ionisé a moins d'affinité que le principe actif neutre pour la cage hydrophobe de la cyclodextrine ce qui diminue sa constante d'association. D'autre part, les interactions non covalentes de l'agent ternaire avec le principe actif et la cyclodextrine établissent une sorte de verrou qui stabilise le système (Redenti, et al., 1999), (Ribeiro, et al., 2005), (Barillaro, et al., 2007)

Deux autres hypothèses sur l'origine de l'amélioration des propriétés physico-chimiques des complexes avec un agent ternaire ont été faites. Ce sont l'obtention d'un système présentant un point eutectique et une modification de l'interface entre le système et son milieu de dissolution (effet tensioactif, changement de granulométrie) (Freiss, et al., 2005).

III.2) Analyse d'encapsulation de principe actif

III.2.1) Objectif

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont des médicaments dépourvus de noyau stéroïde ayant une action anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique (Du, et al., 2006). Ces médicaments sont l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Leur mécanisme d'action est relativement simple. Lors d'un stimulus (allergie, blessure...), les phospholipides contenus dans les cellules membranaires subissent des réactions en chaîne menant à la synthèse des prostaglandines qui créent alors une inflammation. La cyclooxygénase est une enzyme clef dans la synthèse des prostaglandines. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent l'enzyme cyclooxygénase ce qui conduit à une diminution de la synthèse des prostaglandines qui est la cause de l'inflammation (Rao, et al., 2008) (Siddiqui, 2003-2007).

Le principal inconvénient de la plupart des anti-inflammatoires non stéroïdiens est leur faible solubilité dans l'eau et par voie de conséquence dans les liquides biologiques. Ceci implique une faible biodisponibilité de ces substrats, une forte augmentation des doses

administrées aux patients pour atteindre l'objectif thérapeutique fixé et donc un accroissement des effets secondaires tels que des effets néfastes au niveau digestif et cutané.

L'encapsulation des anti-inflammatoires non stéroïdiens par une cyclodextrine permet d'augmenter leur solubilité aqueuse, leur vitesse de dissolution et par conséquent d'accroître leur biodisponibilité. De ce fait plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens sont aujourd'hui encapsulés dans des cyclodextrines comme l'ibuprofène et la molécule X.

L'ibuprofène également appelé (\pm) -2-(4 isobutylphenyl) propionic acid a été développé par les chercheurs de chez Boots dans les années 1960. Sa structure est présentée ci-dessous :

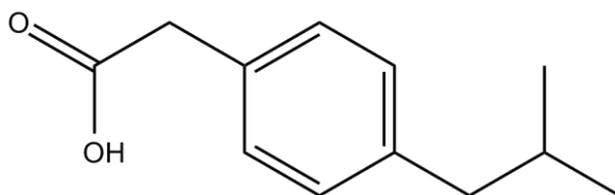


Figure 42. Structure de l'ibuprofène

L'objectif de ce chapitre est de caractériser ces deux anti-inflammatoires encapsulés dans des cyclodextrines par CO₂ supercritique, en présence ou non d'agents ternaires (arginine et lysine).

III.2.2) Mise au point expérimentale

III.2.2.1) Choix du solvant

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens étant peu solubles dans l'eau, des analyses ont été réalisées dans le DMSO-d₆ et comparées à des analyses réalisées dans D₂O. Ces analyses sont faites sur trois différents complexes d'ibuprofène : le complexe ibuprofène- β -cyclodextrine (IC), le complexe ibuprofène- β -cyclodextrine-arginine (ICA) et le complexe ibuprofène- β -cyclodextrine-lysine (ICL).

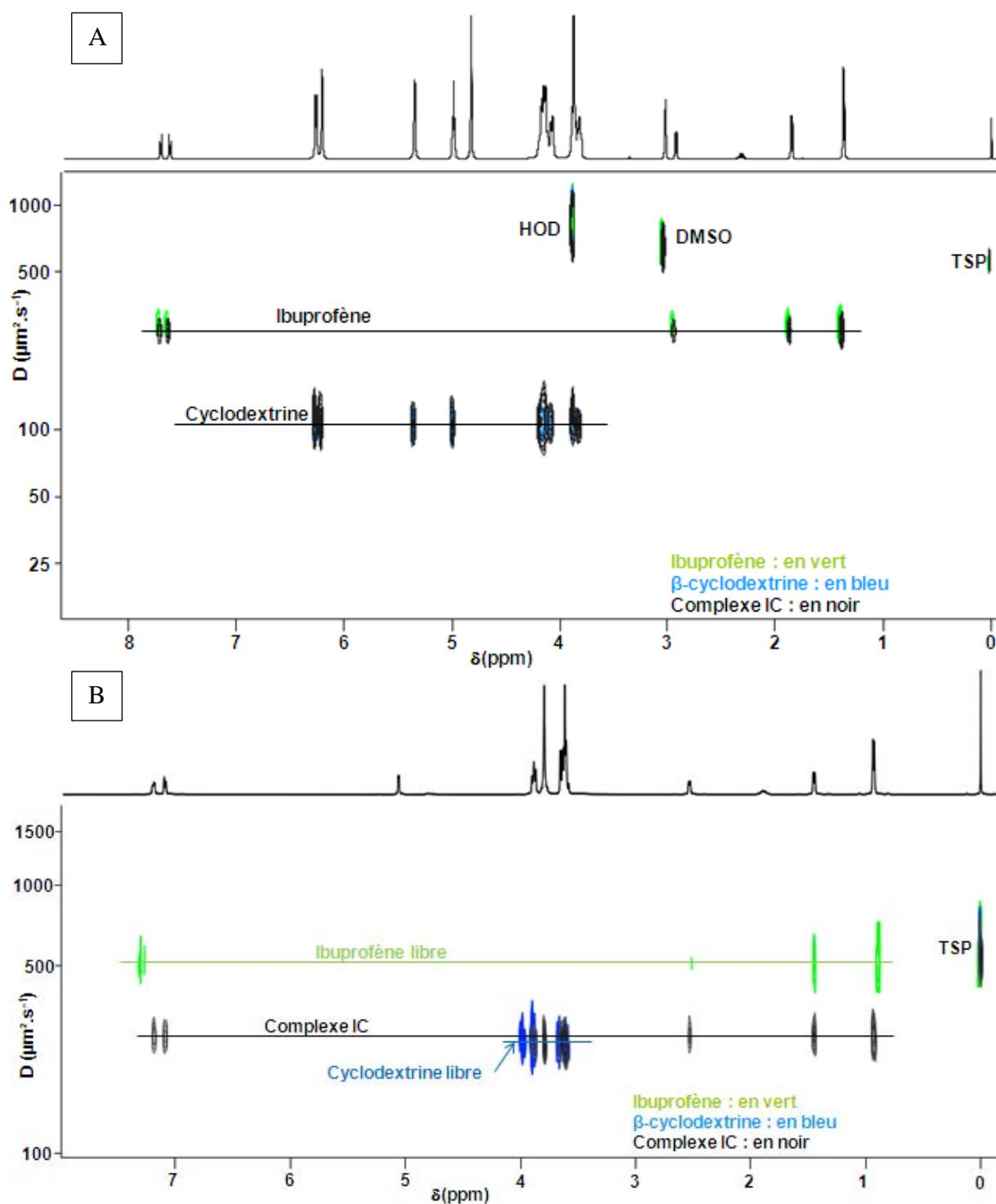
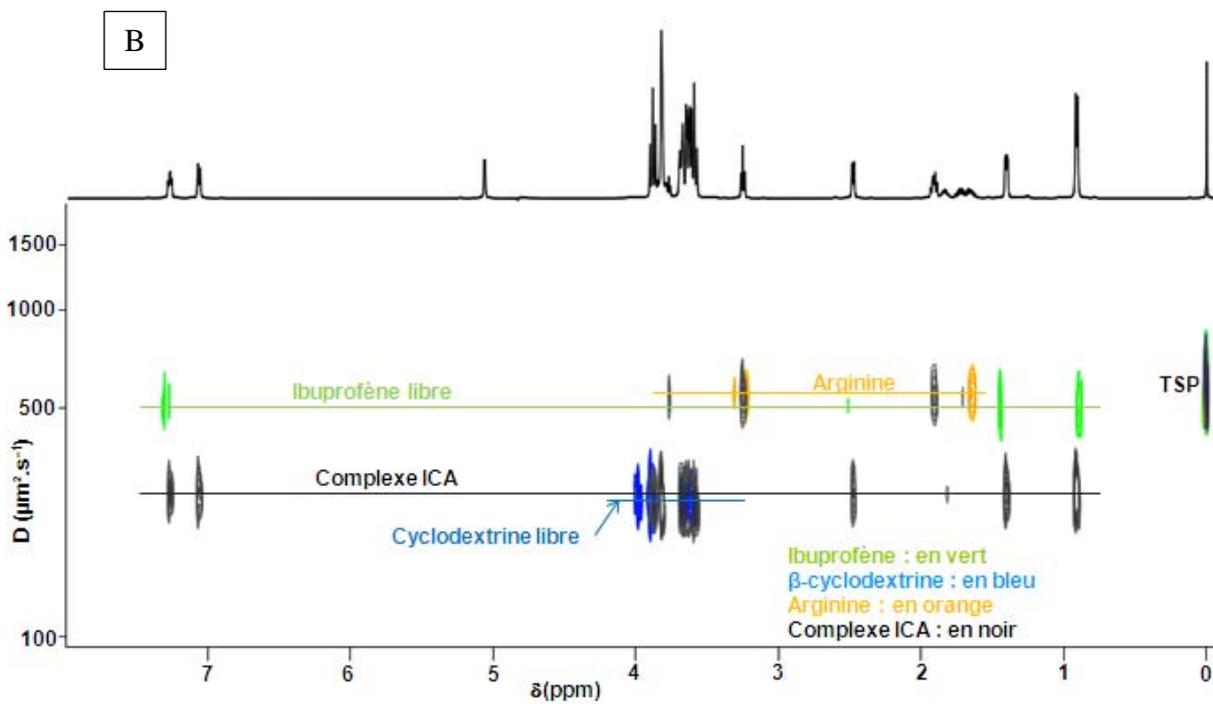
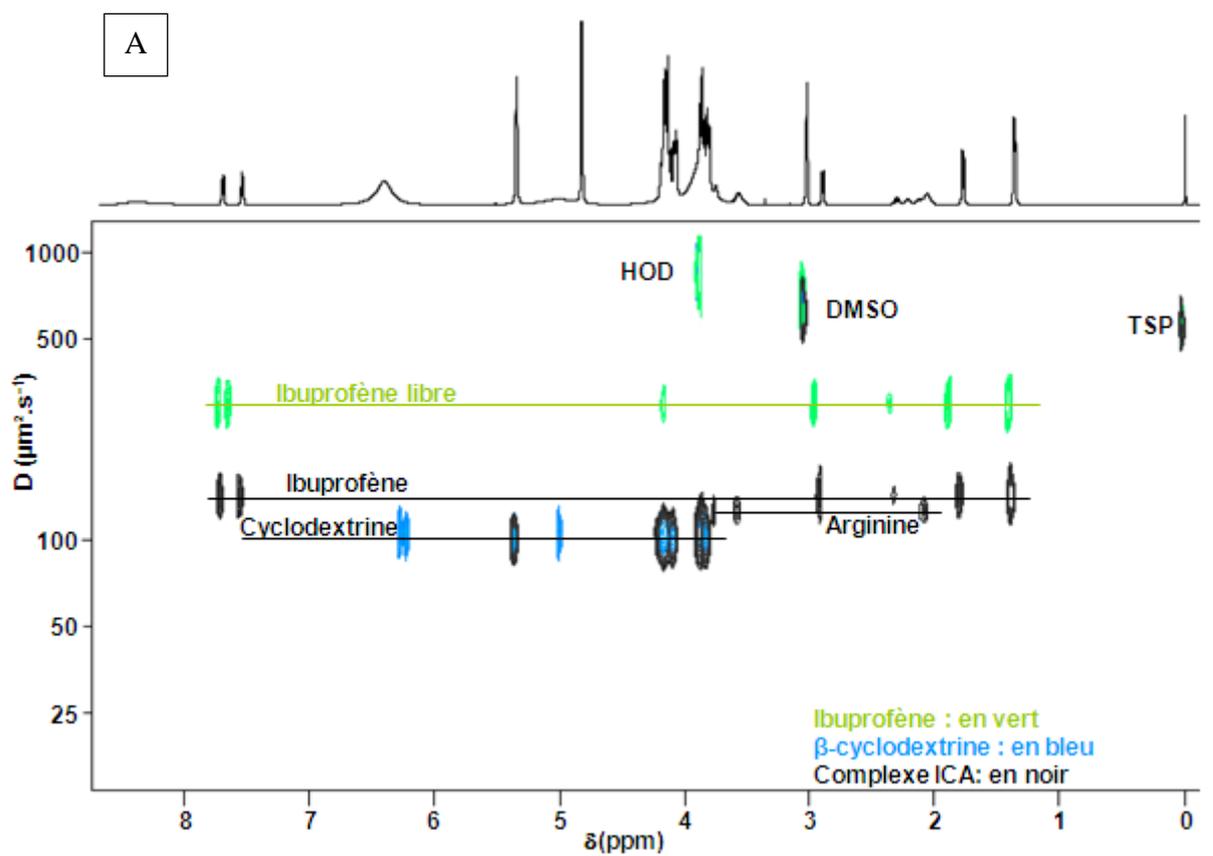


Figure 43. Superpositions des spectres RMN DOSY ^1H de l'ibuprofène seul (en vert), de la β -cyclodextrine (en bleu) et du complexe IC (en noir) enregistrés dans le DMSO- d_6 (A) et dans D_2O (B).

La Figure 43 (A) montre la superposition des spectres DOSY ^1H de l'ibuprofène seul (en vert), de la β -cyclodextrine (en bleu) et du complexe IC (en noir) enregistrés dans le DMSO- d_6 . Le coefficient de diffusion de l'ibuprofène libre est de $305 \pm 3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Dans le complexe, le coefficient de diffusion de l'ibuprofène est égal à $279 \pm 2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Il a légèrement diminué par rapport à l'état libre.

Il y a donc une faible encapsulation de l'ibuprofène dans la cyclodextrine dans le DMSO-d₆. Dans D₂O, Figure 43 (B), le coefficient de diffusion de l'ibuprofène à l'état libre est de $513 \pm 9 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Celui de l'ibuprofène du complexe est égal à $273 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Il diminue par rapport au coefficient de diffusion de l'ibuprofène libre. Il y a une encapsulation de l'ibuprofène dans la cyclodextrine.

Les spectres obtenus en présence d'un agent ternaire sont montrés en noir dans la Figure 44. Dans le DMSO-d₆, le coefficient de diffusion de l'ibuprofène du complexe est égal à $144 \pm 2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ en présence d'arginine (Figure 44 A) et à $173 \pm 2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ en présence de lysine (Figure 44 C). Les coefficients de diffusion de l'ibuprofène ont diminué par rapport au coefficient de diffusion de l'ibuprofène libre ($D = 305 \pm 3 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) mais il reste supérieur au coefficient de diffusion de la cyclodextrine ($D = 106 \pm 1 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Dans D₂O, le coefficient de diffusion de l'ibuprofène du complexe a diminué par rapport au coefficient de diffusion de l'ibuprofène libre et il est proche de la valeur du coefficient de diffusion de la cyclodextrine. Le taux d'encapsulation de l'ibuprofène dans la cyclodextrine est donc plus élevé dans D₂O que dans le DMSO-d₆.



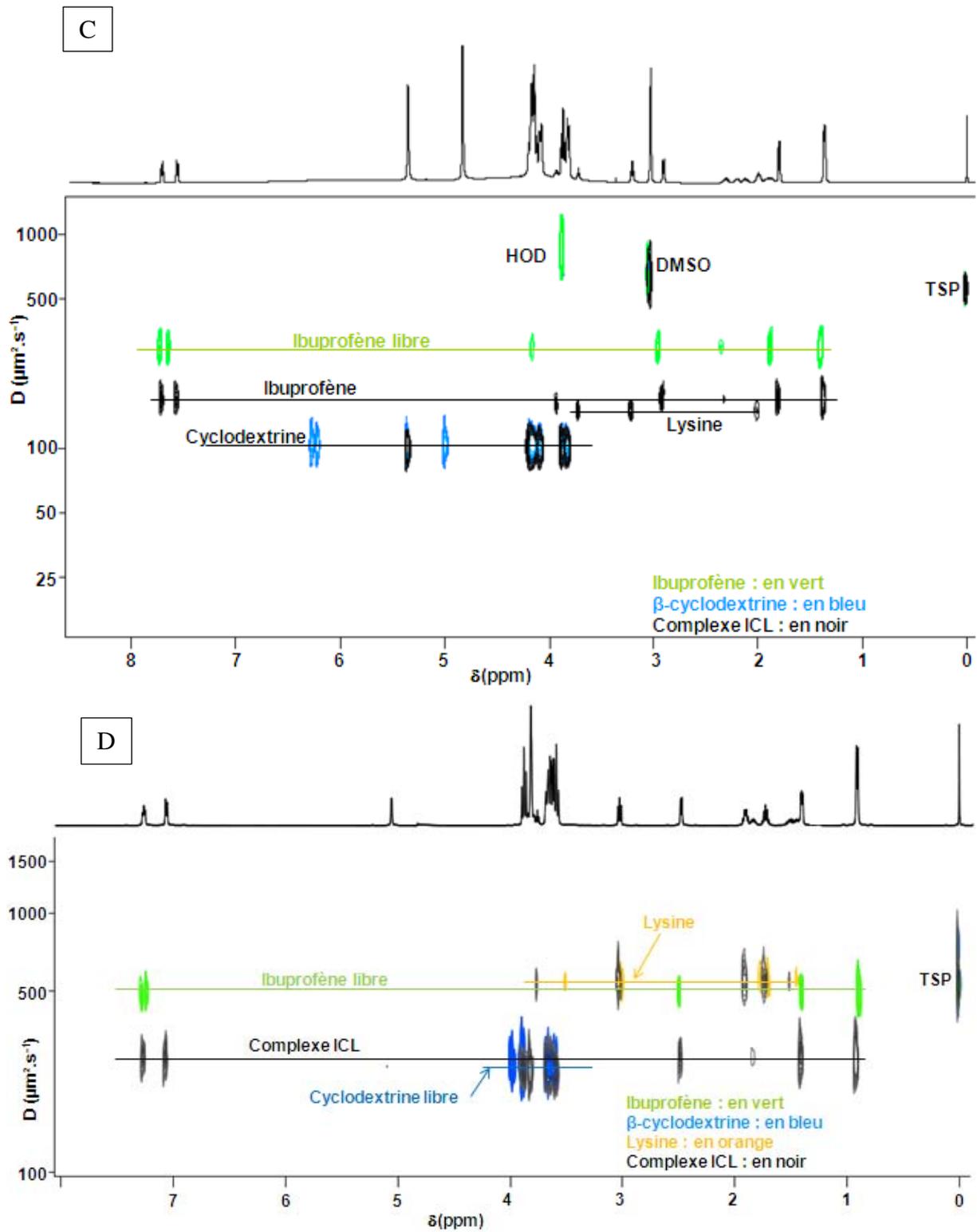


Figure 44. Superpositions des spectres RMN DOSY ¹H de l'ibuprofène seul (en vert), de la β-cyclodextrine (en bleu), de l'agent ternaire (en orange (l'arginine (B) et lysine (D)) et du complexe ICA (en noir (A et B)) ou du complexe ICL (en noir (C et D)) enregistrés dans le DMSO-d₆ (A et C) et dans D₂O (B et D).

D'après la mesure de ces coefficients de diffusion, il apparaît que le complexe IC se décomplexe lorsqu'il est dissous dans le DMSO-d₆. Dans ce solvant, la présence d'un agent ternaire semble stabiliser le complexe même si le taux d'encapsulation est moins élevé que

dans une solution aqueuse. Le choix du solvant d'analyse s'est ensuite porté sur le D₂O car les complexes semblent plus stables dans le D₂O que dans le DMSO-d₆.

III.2.2.2) Etude de la viscosité

Nous avons vu dans le premier chapitre que le coefficient de diffusion était caractérisé par l'équation de Stokes-Einstein (équation 1). Il dépend de la température, du rayon hydrodynamique de la molécule considérée comme sphérique mais également de la viscosité.

Certains auteurs effectuent une correction du coefficient de diffusion en fonction de la viscosité de leur solution (Bakkour, et al., 2006). Pour ce faire, ils utilisent un signal de référence, souvent celui du solvant, puis ils calculent le coefficient corrigé selon l'équation suivante :

$$D_{\text{cor}} = D_{\text{app}} * \frac{D_{\text{ref}}}{D_{\text{ref,app}}}$$

Équation 27

D_{cor} : Diffusion corrigée de la viscosité

D_{app} : Diffusion apparente mesurée dans le milieu

D_{ref} : Diffusion de la référence mesurée seule

$D_{\text{ref,app}}$: Diffusion apparente de la référence mesurée dans le milieu

Wimmer en 2002 a élaboré une équation décrivant la variation de la viscosité de la α -cyclodextrine en fonction de sa concentration variant de 0 à 100mM à 290 K (Wimmer, et al., 2002) :

$$\eta(\text{CD}) = \eta_0 + 3,1 * [\text{CD}] + 11,43 * [\text{CD}]^2$$

Équation 28

Certains auteurs démontrent que pour de faibles concentrations de cyclodextrine, la variation de viscosité des solutions est négligeable (Lin, et al., 1995) (Grillo, et al., 2007).

Pour le vérifier, nous avons réalisé quelques expériences complémentaires décrites ci-dessous (III.2.2.2.1).

III.2.2.2.1) Rhéométrie

Un rhéomètre permet de déterminer les propriétés viscoélastiques d'un échantillon dont la viscosité. Le tableau ci-dessous indique les valeurs de viscosités obtenues pour des solutions aqueuses à 25 °C de 5 mM d'ibuprofène, de β -cyclodextrine, de complexe IC, de complexe ICA et de complexe ICL. Une solution de β -cyclodextrine à 10 mM a également été analysée.

Échantillon	Viscosité (mPa.s)
Ibuprofène (5 mM)	0,871± 0,021
Complexe IC (5 mM)	0,900± 0,012
Complexe ICA (5 mM)	0,908± 0,022
Complexe ICL (5 mM)	0,917± 0,022
Cyclodextrine (5 mM)	0,900± 0,016
Cyclodextrine (10 mM)	0,996± 0,006

Tableau 11. Valeurs de viscosité des échantillons

Ces valeurs varient peu, de 0,871 mPa.s pour l'ibuprofène à 0,996 mPa.s pour la cyclodextrine à 10 mM. On peut donc considérer que l'ajout de cyclodextrine, aux concentrations étudiées, influence peu la viscosité des solutions.

III.2.2.2.2) RMN DOSY 1H

La Figure 45 représente la superposition des spectres DOSY de trois solutions aqueuses contenant de la lysine, avec une concentration constante de 5 mM, et de la β -cyclodextrine avec trois concentrations différentes : 0 mM (en orange), 5 mM (en bleu clair) et 10 mM (en bleu foncé).

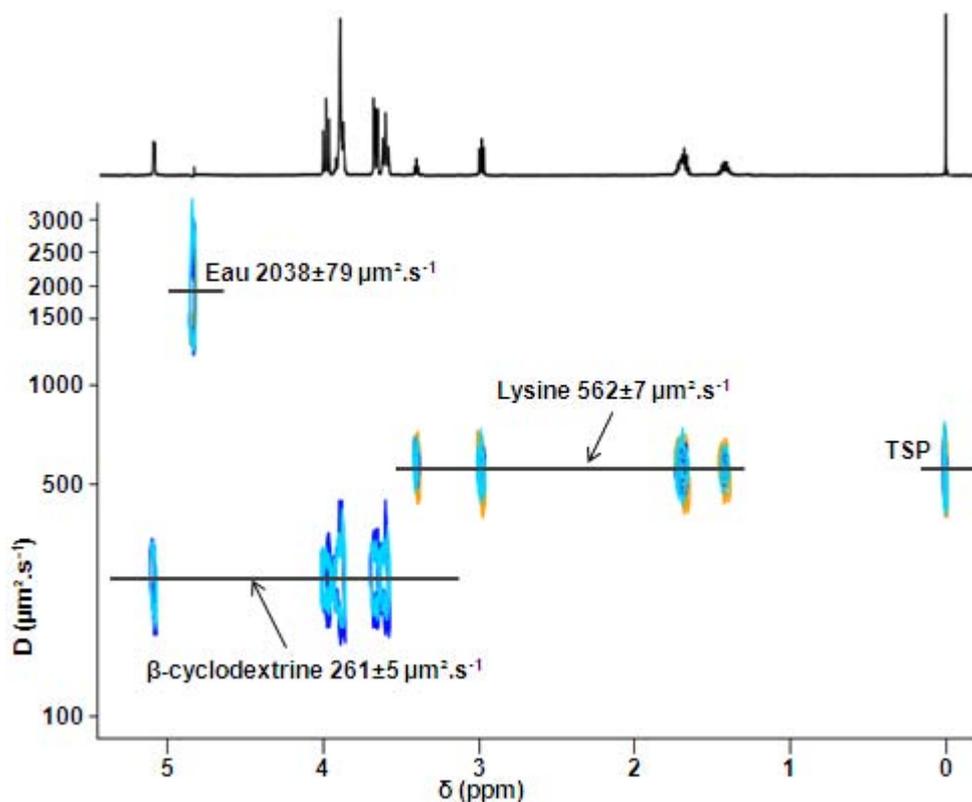


Figure 45. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H de trois solutions contenant de la lysine à 5mM et de la β -cyclodextrine à des concentrations variables : 0 mM (orange), 5 mM (bleu clair) et 10 mM (bleu foncé)

Quelle que soit la concentration de la cyclodextrine, le coefficient de diffusion de la lysine et le coefficient de diffusion de l'eau ne varient pas ; ils sont respectivement égaux à $562 \pm 7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $2038 \pm 79 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. On peut donc en déduire que, pour une concentration de cyclodextrine comprise entre 0 et 10 mM, la viscosité des solutions ne varie pas.

III.2.2.2.3) Conclusion

La viscosité de différentes solutions en présence et en absence de cyclodextrine a été mesurée par rhéométrie. Pour des concentrations de cyclodextrines comprises entre 0 et 10 mM, la variation de viscosité est très faible. L'influence de cette petite variation sur les coefficients de diffusion a été mesurée par RMN DOSY ^1H sur des solutions de lysine en présence et en absence de cyclodextrine. La présence de cyclodextrine ne modifie pas les coefficients de diffusion de l'eau et la lysine pris comme références. Par conséquent, pour la suite des analyses, le coefficient de diffusion mesuré sur le spectre DOSY ^1H ne sera pas corrigé de la viscosité des solutions en présence de cyclodextrine.

III.2.2.3) Vérification de la relation de proportionnalité entre la masse molaire du système étudié et le coefficient de diffusion

D'après l'équation de Stokes-Einstein, la diffusion est proportionnelle au rayon hydrodynamique de la molécule considérée comme sphérique. Connaissant le coefficient de diffusion, la taille du système analysé peut donc être estimée. Cependant, cette équation n'est valable que pour les molécules sphériques. Nous avons vu dans le chapitre I.4.1, que certains auteurs réalisaient des courbes de calibration pour ensuite calculer la taille de polysaccharides. Cette courbe de calibration se fait pour une famille de composés, pour une gamme de concentration, à une température et un solvant donnés.

Les cyclodextrines naturelles α , β et γ contiennent respectivement 6, 7 et 8 unités de D-glucose et leur masse moléculaire sont respectivement $972,86 \text{ g.mol}^{-1}$, $1134,98 \text{ g.mol}^{-1}$ et $1297,15 \text{ g.mol}^{-1}$. Pour vérifier la relation de proportionnalité entre le coefficient de diffusion et la masse molaire, ces trois cyclodextrines naturelles ont été analysées par RMN DOSY ^1H à 25°C dans D_2O à 5 mM.

Cyclodextrine	Coefficient de diffusion ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	Masse molaire (g.mol^{-1})
α -cyclodextrine	280 ± 4	972,86
β -cyclodextrine	261 ± 5	1134,98
γ -cyclodextrine	244 ± 2	1297,15

Tableau 12. Les coefficients de diffusion mesurés et les masses molaires des trois cyclodextrines naturelles

Comme le montre le Tableau 12, le coefficient de diffusion diminue avec l'augmentation de la masse molaire de la cyclodextrine.

Les logarithmes des coefficients de diffusion sont tracés en fonction des logarithmes des masses molaires, une droite est obtenue avec un coefficient de détermination (R^2) égal à 0,9992 (présentée Figure 46). Il y a donc une relation de proportionnalité entre les coefficients de diffusion et les masses molaires.

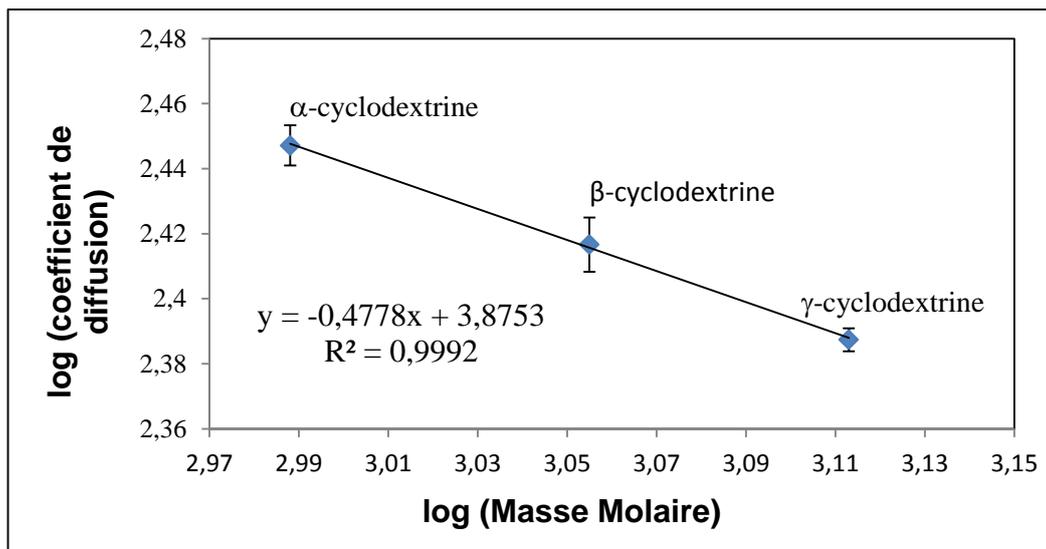


Figure 46. Tracé des coefficients de diffusion en fonction des masses molaires des cyclodextrines.

D'après la bibliographie (Bakkour, et al., 2006) (Laverde, et al., 2002) (Wimmer, et al., 2002) pour les complexes de stœchiométrie 1 : 1, le coefficient de diffusion du complexe est proche de celui de la cyclodextrine. Par contre, pour les complexes de stœchiométrie 1 : 2, le coefficient de diffusion du complexe doit être inférieur au coefficient de diffusion de la cyclodextrine seule (Simova, et al., 2005) (Guerrero-Martinez, et al., 2006). La relation de proportionnalité entre les coefficients de diffusion et les masses molaires ayant été vérifiée, il est donc possible d'extrapoler l'équation pour un complexe de stœchiométrie 1 : 2.

D'après la bibliographie, le camphre forme un complexe de stœchiométrie 1 : 2 lorsqu'il est complexé avec un excès de cyclodextrine α (Simova, et al., 2005).

Deux mélanges de camphre et de cyclodextrine α ont été préparés avec un rapport 1 : 18 et un rapport de 1 : 6 et analysés par RMN DOSY ^1H .

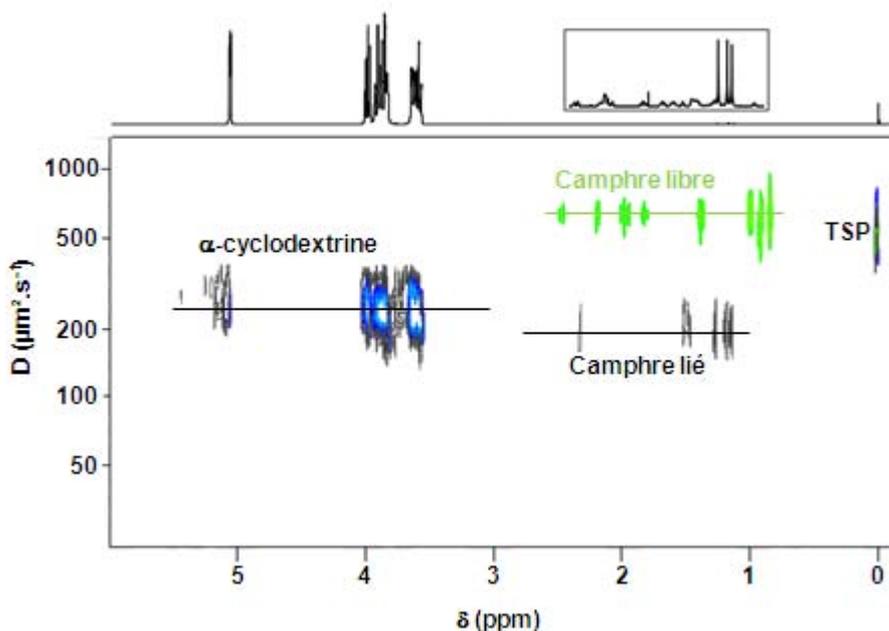


Figure 47. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H du camphre, de l' α -cyclodextrine et du complexe camphre-(α -cyclodextrine) réalisé avec un large excès d' α -cyclodextrine.

La superposition des spectres DOSY ^1H du camphre, de l' α -cyclodextrine et du complexe camphre-(α -cyclodextrine) réalisé avec un 1 : 18 est présentée Figure 47. Le coefficient de diffusion du camphre libre, mesuré sur le spectre DOSY ^1H (en vert), est de $642 \pm 10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Celui de l' α -cyclodextrine libre (en bleu) est de $280 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Les signaux en noir représentent le spectre DOSY ^1H obtenu pour le complexe. Le coefficient de diffusion de l' α -cyclodextrine ne varie pas. Le coefficient de diffusion observé est donc essentiellement celui de l' α -cyclodextrine libre qui est en très large excès par rapport à l' α -cyclodextrine liée. Le coefficient de diffusion du camphre est égal à $201 \pm 7 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Il a fortement diminué par rapport à celui du camphre libre. De plus, il est inférieur à celui de l' α -cyclodextrine libre.

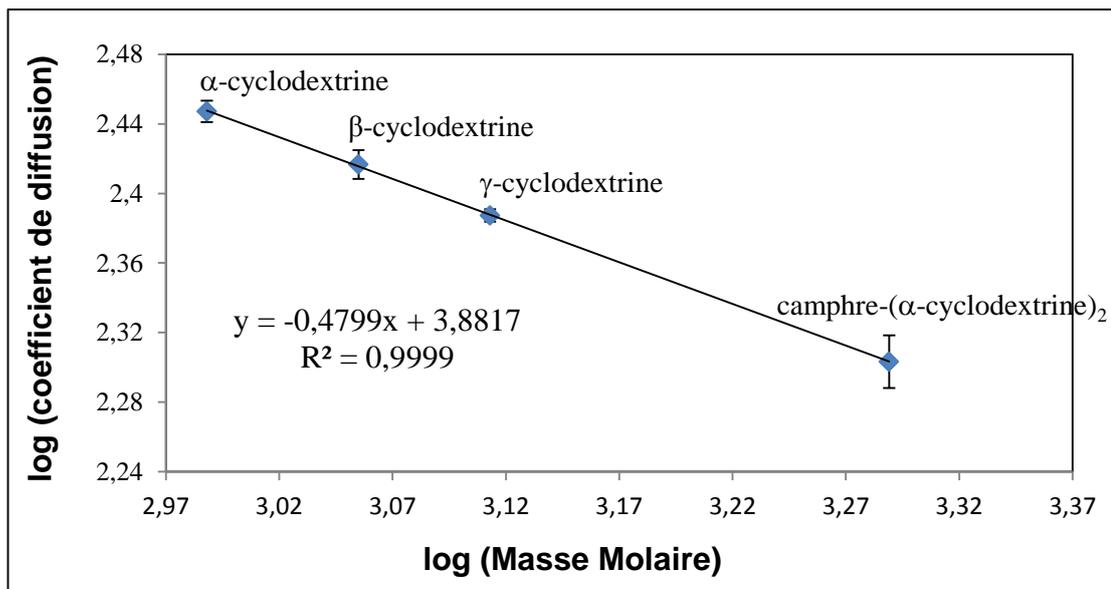


Figure 48. Tracé des coefficients de diffusion en fonction des masses molaires des cyclodextrines et du complexe camphre- α -cyclodextrine de stœchiométrie 1 : 2.

La relation de proportionnalité du logarithme du coefficient de diffusion en fonction du logarithme de la masse moléculaire du système est maintenue lorsqu'on ajoute les valeurs obtenues pour le complexe camphre-(α -cyclodextrine)₂, Figure 48. Il s'agit d'un complexe de stœchiométrie 1 : 2. Le coefficient de détermination (R^2) est égal à 0,9999.

Des essais ont également été réalisés avec un ratio 1 : 2 de camphre et de cyclodextrine. Le spectre DOSY ^1H du complexe superposé aux spectres DOSY ^1H du camphre libre (en vert) et de l' α -cyclodextrine libre est représenté Figure 49.

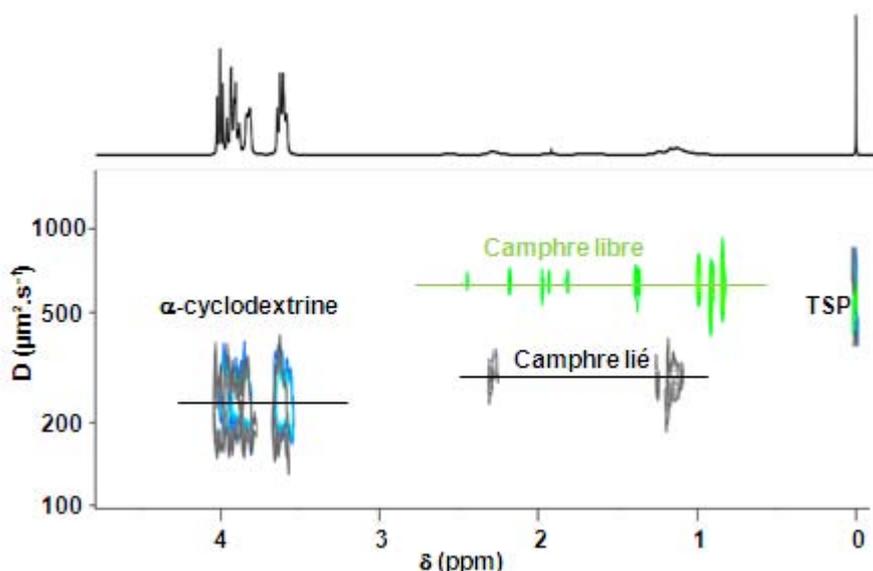


Figure 49. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H du camphre, de l' α -cyclodextrine et du complexe camphre-(α -cyclodextrine) réalisé sans excès d' α -cyclodextrine.

Le coefficient de diffusion du camphre mesuré dans le complexe est égal à $313 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Par rapport au coefficient de diffusion du camphre libre ($D = 642 \pm 10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), il a diminué. Cependant il reste supérieur au coefficient de diffusion de l' α -cyclodextrine libre ($D = 280 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Deux paramètres sont à prendre en compte :

- La stœchiométrie du complexe

D'après la littérature, un complexe principe actif-cyclodextrine de stœchiométrie 1 : 1 a un coefficient de diffusion qui peut être apparenté à celui de la cyclodextrine seule, cette dernière ayant une masse molaire bien supérieure au principe actif (Bakkour, et al., 2006).

Un complexe principe actif-cyclodextrine de stœchiométrie 1 : n, avec n supérieur à 1, a une masse moléculaire supérieure à celle de la cyclodextrine seule. Et d'après la relation qui existe entre la masse moléculaire du complexe et le coefficient de diffusion, ce dernier est inférieur à celui de la cyclodextrine seule (Simova, et al., 2005).

- Le taux d'encapsulation

Nous avons vu que le coefficient de diffusion observé par RMN DOSY ^1H est une moyenne entre le coefficient de diffusion de la molécule à l'état libre et le coefficient de diffusion de la molécule à l'état lié.

Ainsi, lorsque le camphre est encapsulé dans la cyclodextrine avec un taux d'encapsulation à 100 % et une stœchiométrie 1 : 2, son coefficient de diffusion est de $201 \pm 7 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Celui-ci augmentera proportionnellement avec la diminution de son taux d'encapsulation jusqu'à atteindre le coefficient de diffusion du camphre libre à $642 \pm 10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ lorsque le taux d'encapsulation est de 0 %. Le raisonnement est le même pour le coefficient de diffusion de la cyclodextrine.

Si la stœchiométrie est de 1 : 1, le coefficient du camphre sera égal à celui de la cyclodextrine libre (soit de $280 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) pour un taux d'encapsulation de 100 %. Celui-ci augmentera proportionnellement avec la diminution de son taux d'encapsulation jusqu'à atteindre le coefficient de diffusion du camphre libre à $642 \pm 10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ lorsque le taux d'encapsulation est de 0 %. Le coefficient de diffusion de la cyclodextrine variera peu quel que soit le pourcentage de cyclodextrine complexée (Laverde, et al., 2002).

Le coefficient de diffusion du camphre mesuré dans le complexe est égal à $313 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Deux hypothèses sont alors possibles :

- La stœchiométrie du complexe est 1 : 1 et le taux d'encapsulation apparent est de 91 ± 4 % selon l'Équation 24.
- La solution est composée d'un mélange de complexes de stœchiométrie 1 : 1, de stœchiométrie 1 : 2 et de camphre libre. Le coefficient de diffusion observé pour le camphre est une moyenne des différentes espèces en solution.

Néanmoins le coefficient de diffusion de l' α -cyclodextrine observé pour le complexe ne varie pas. N'étant pas en excès, si un complexe de stœchiométrie 1 : 2 se forme en concentration suffisamment importante par rapport à la concentration d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1 ou d' α -cyclodextrine libre, son coefficient de diffusion devrait diminuer. Or ce n'est pas le cas ce qui par conséquent montre ici qu'il n'y a pas ou très peu de complexes de stœchiométrie 1 : 2.

III.2.2.4) Mesure du taux d'encapsulation

Le complexe ICL est annoncé avec un taux d'encapsulation à 100 %. La stœchiométrie et le ratio utilisés pour sa formation sont de 1 : 1 : 1. On peut donc supposer qu'un excès d'ibuprofène rajouté au complexe ne s'encapsulera pas. L'ibuprofène seul à son pH naturel n'étant pas soluble dans D_2O , un mélange ibuprofène-lysine (IL) soluble dans l'eau est donc utilisé pour ce test. L'expérience consiste alors à mélanger une solution d'ICL à 5 mM à une solution d'IL à 5 mM avec des ratios différents afin d'obtenir des taux d'encapsulation connus et maîtrisés et de les vérifier par un calcul à l'aide des coefficients de diffusion mesurés sur ces solutions modèles par RMN DOSY 1H . Ainsi, cinq solutions avec des taux d'encapsulation variant de 0 à 100 % sont analysées par RMN DOSY 1H . La superposition des spectres obtenus est présentée Figure 50.

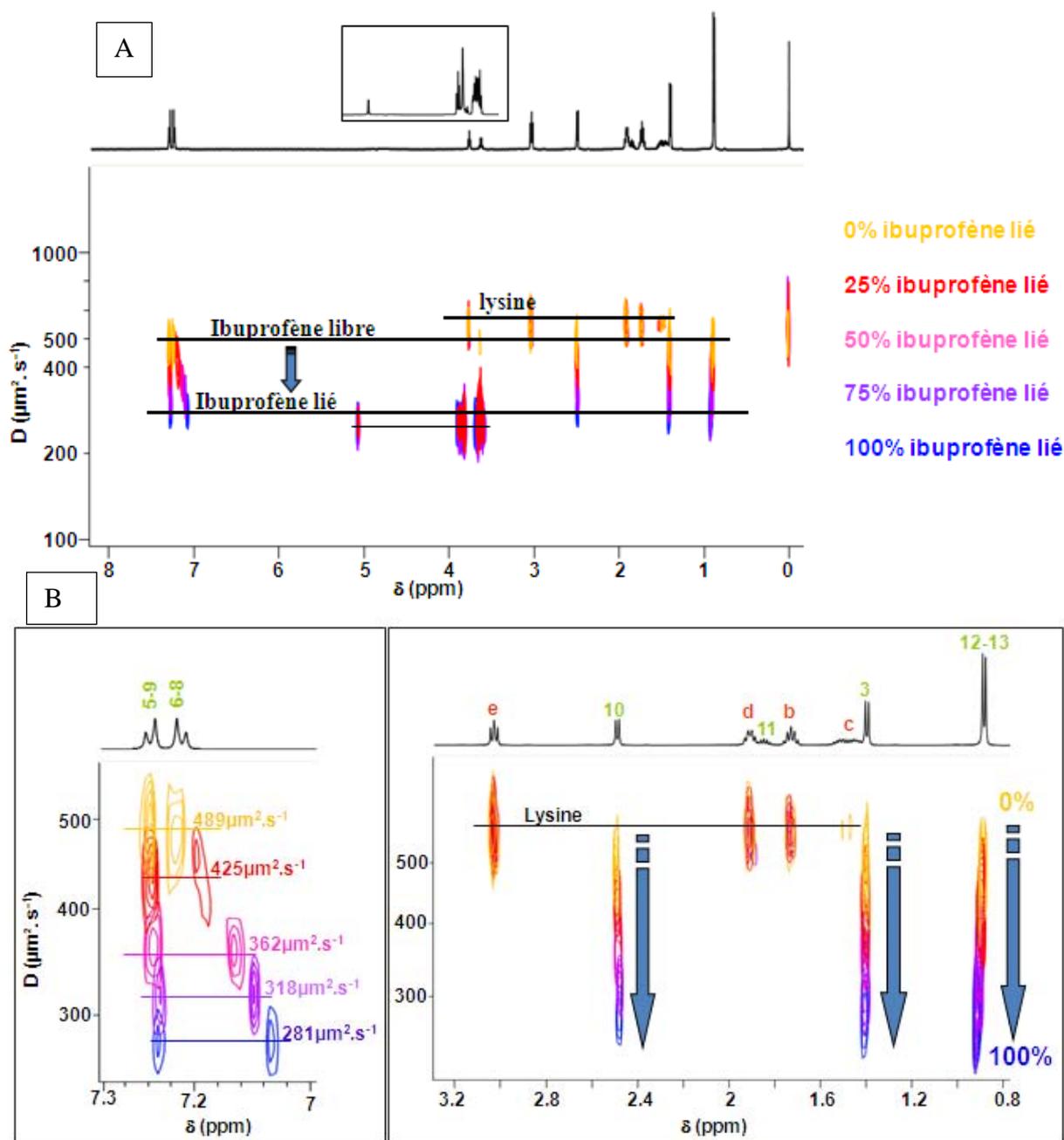


Figure 50. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H obtenus à partir de solutions de complexes ICL de concentration fixe en ibuprofène (5mM) et en lysine (5mM) et une concentration en cyclodextrine variant de 0 à 5 mM. Spectres entiers (A) et étalement de 0,8 à 3,2 ppm et de 7 à 7,3 ppm (B).

Dans cette série de spectres, les coefficients de diffusion de la lysine et de la β -cyclodextrine ne varient pas, par contre le coefficient de diffusion de l'ibuprofène augmente avec l'augmentation de la concentration en ibuprofène libre. Le taux d'encapsulation est calculé selon l'équation 24 et les résultats sont présentés dans le Tableau 13.

N° Solution	[ICL]	[ibuprofène] totale	D (ibuprofène) en $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$	Taux d'encapsulation calculé	Taux d'encapsulation théorique	Ecart relatif
1	0 mM	5 mM	489	-	-	-
2	1,25 mM	5 mM	425	28 %	25 %	12 %
3	2,50 mM	5 mM	362	56 %	50 %	12 %
4	3,75 mM	5 mM	318	75 %	75 %	0 %
5	5 mM	5 mM	281	91 %	100 %	10 %

Tableau 13. Les taux d'encapsulations calculés et estimés pour chaque solution

Nous constatons que les taux d'encapsulation calculés à l'aide des coefficients de diffusion mesurés sur les spectres DOSY ^1H sont proches des valeurs théoriques. Cette méthode permet ainsi d'évaluer l'inclusion d'un principe actif dans une cyclodextrine.

III.2.3) Etude de l'ibuprofène

III.2.3.1) Etude des complexes IC, ICA et ICL

Les complexes IC, ICA et ICL ont été analysés par RMN ROESY. Les mêmes taches de corrélation ROESY ont été retrouvées pour chaque échantillon. La présence d'agent ternaire ne modifie donc pas la géométrie du complexe. La Figure 51 montre le spectre ROESY obtenu pour le complexe ICL.

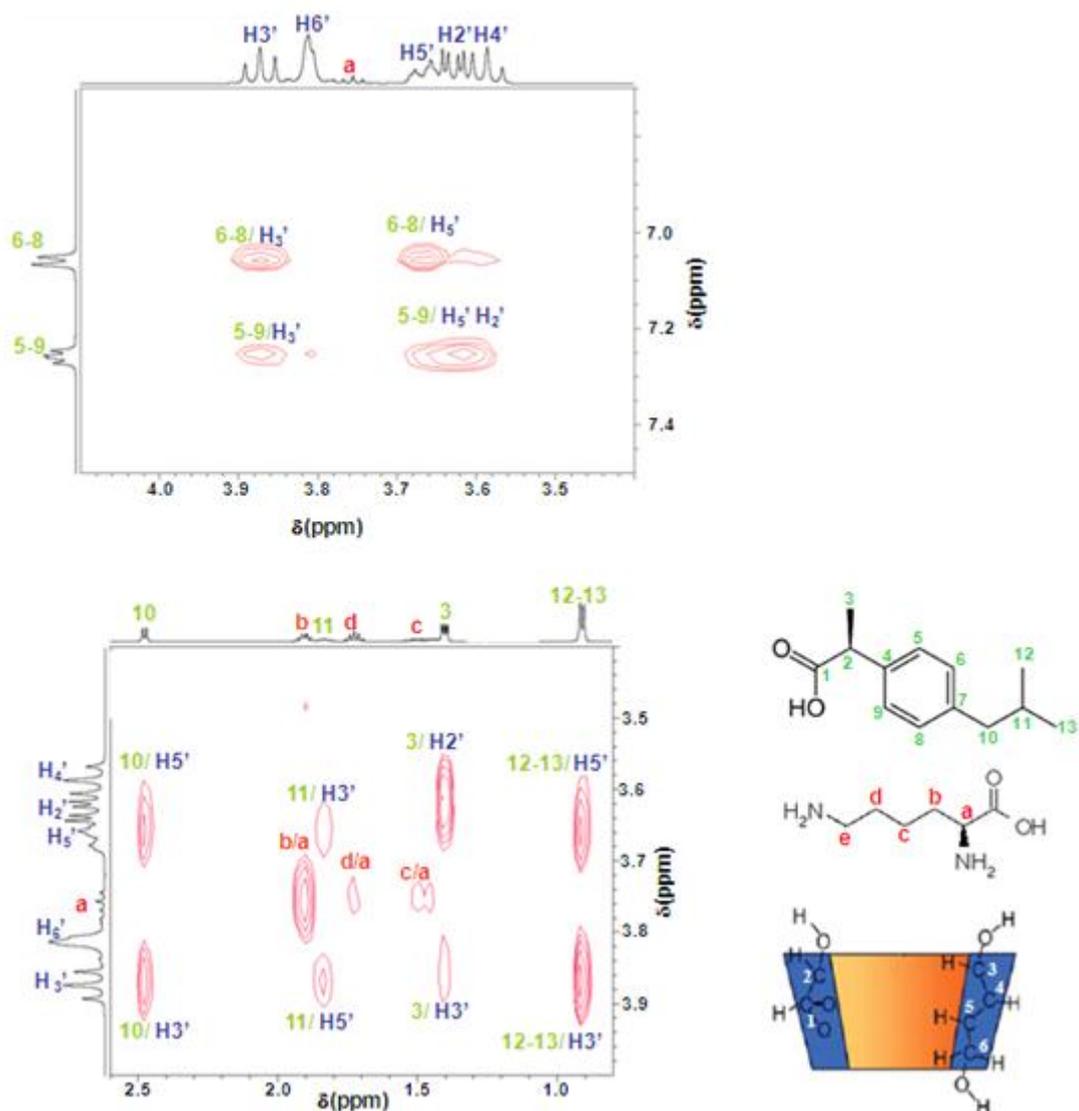


Figure 51. Spectre ROESY du complexe ICL à 5mM enregistré dans D₂O à pH 7,2.

Les protons 5, 6, 8 et 9 correspondent aux protons aromatiques de l'ibuprofène. Ils corrélient avec les protons H₅' et H₃' qui sont les protons intérieurs de la β-cyclodextrine ce qui suggère que la zone aromatique de l'ibuprofène est encapsulée dans la β-cyclodextrine. Les protons 5 et 9 de l'ibuprofène corrélient également avec un proton extérieur de la β-cyclodextrine, H₂'. Ce proton est du côté large de la β-cyclodextrine, donc les protons 5 et 9 de l'ibuprofène se situent dans la cavité de la β-cyclodextrine et à proximité de la grande base du tronc de cône. Les protons 10, 11, 12 et 13 de la chaîne aliphatique de l'ibuprofène corrélient eux aussi avec les protons intérieurs H₃' et H₅'. Quant aux protons 3 de l'ibuprofène, ils corrélient avec un seul proton intérieur, le proton H₃' et avec un proton extérieur, H₂'. Il est donc positionné au niveau de la grande base du tronc de cône. D'après ces corrélations, la géométrie du complexe peut être déterminée. Le groupement COOH étant hydrophile, il n'est

pas encapsulé. Le groupe isobutyl et le cycle aromatique sont encapsulés et les protons H₃ se situent à la limite de la cavité de la β-cyclodextrine. Plusieurs auteurs ont également étudié la géométrie de ce complexe. Di Cagno et al concluent à la même géométrie après une étude des variations des déplacements chimiques en RMN ¹H (Di Cagno, et al., 2011). Xing et al concluent que le groupe isobutyl est encapsulé avec une partie du cycle aromatique à l'aide des variations des déplacements chimiques ¹H (Xing, et al., 2009). Al Omari et al ont étudié la géométrie du complexe par modélisation. Ils concluent à l'encapsulation du cycle aromatique. Pour les parties isobutyl et isopropionate, ils les décrivent à proximité des groupes hydroxyles situés à chaque extrémité de la cavité de la β-cyclodextrine (Al Omari, et al., 2009).

On peut donc supposer, au vu de la géométrie, que l'ibuprofène pénètre dans la β-cyclodextrine par son coté large et qu'ils forment un complexe de stœchiométrie 1 : 1 (Figure 52). Ce qui est en accord avec la bibliographie.

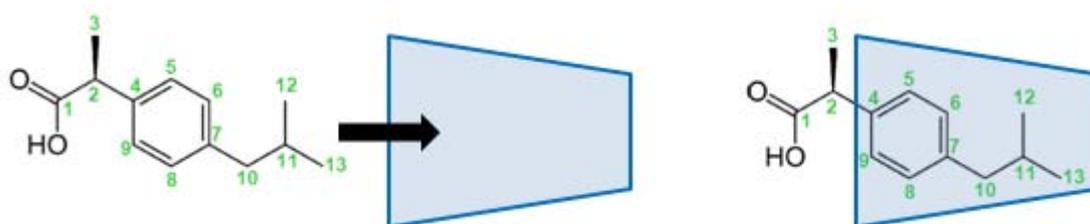
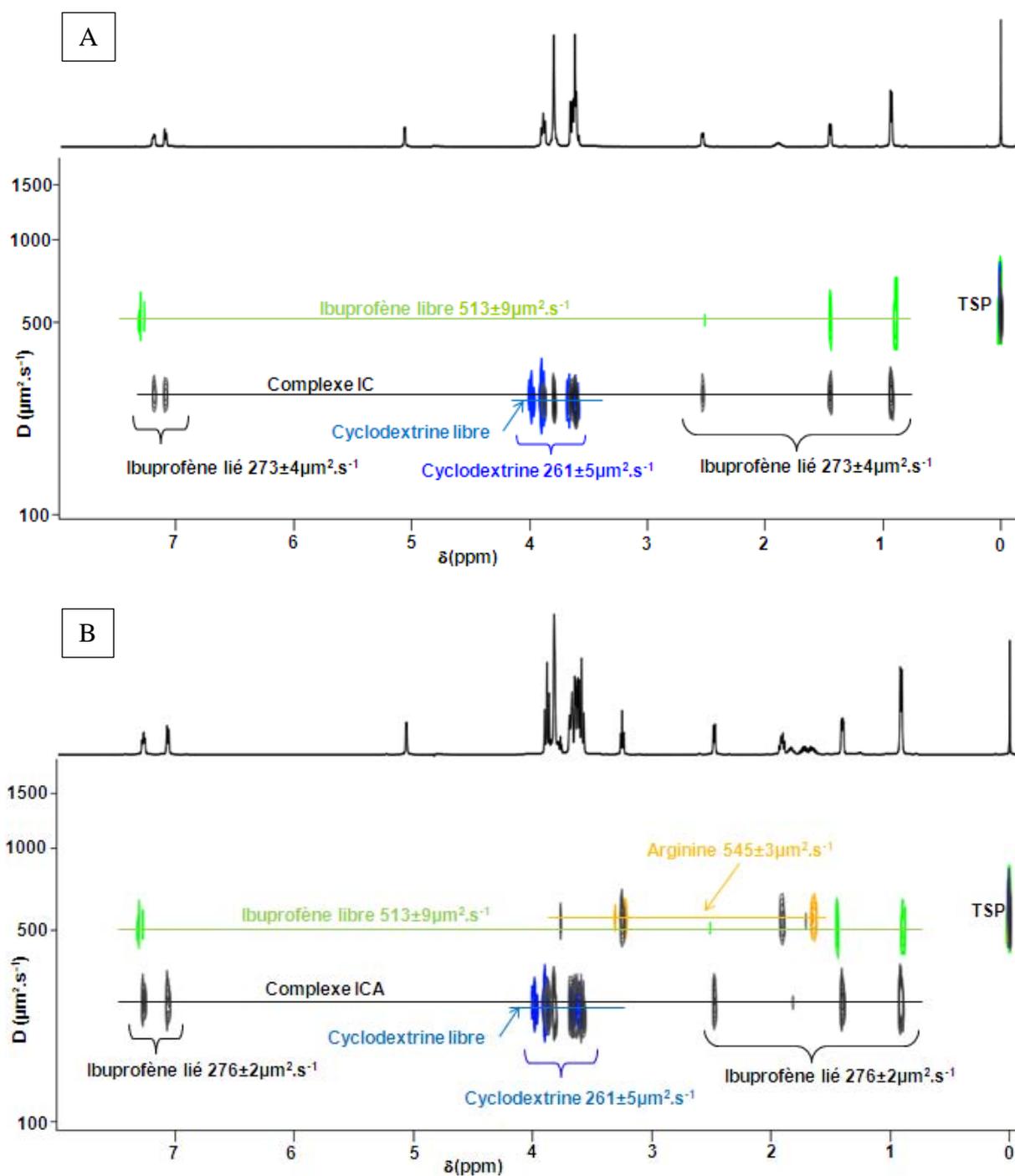


Figure 52. Schématisation de l'encapsulation de l'ibuprofène dans la β-cyclodextrine

Les signaux correspondant à la lysine n'ont aucune corrélation avec la β-cyclodextrine, l'agent ternaire n'est donc pas encapsulé. Afin d'observer de possibles interactions entre les agents ternaires et la cyclodextrine ou entre les agents ternaires et l'ibuprofène différents mélanges ont été réalisés par CO₂ supercritique : arginine/β-cyclodextrine, lysine/β-cyclodextrine, arginine/ibuprofène et lysine/ibuprofène. Ces mélanges sont faits avec un ratio 1 : 1 et dans les mêmes conditions que la préparation des complexes. Les analyses ROESY de ces mélanges ne montrent pas d'interactions, il n'y a pas de taches de corrélation entre les différents composés des mélanges. D'après la littérature, l'agent ternaire forme des liaisons hydrogènes avec la cyclodextrine et crée des interactions électrostatiques avec le principe actif (Redenti, et al., 1999) (Ribeiro, et al., 2005) (Redenti, et al., 2000) (Mura, et al., 2003). Etant en solution aqueuse, les interactions ne sont pas visibles. Ces mélanges ont été analysés par RMN DOSY ¹H. Les coefficients de diffusion des composés des mélanges ne semblent pas être modifiés par rapport aux coefficients de diffusion des composés analysés individuellement. L'absence de modification des coefficients de diffusion

semblent indiquer qu'il n'y a pas d'interactions visibles entre la cyclodextrine et l'agent ternaire et entre l'ibuprofène et l'agent ternaire en solution aqueuse à 25 °C.

Les complexes IC, ICA et ICL ont également été analysés par RMN DOSY ^1H . Les spectres des complexes superposés avec les spectres DOSY ^1H des standards sont présentés Figure 53.



C

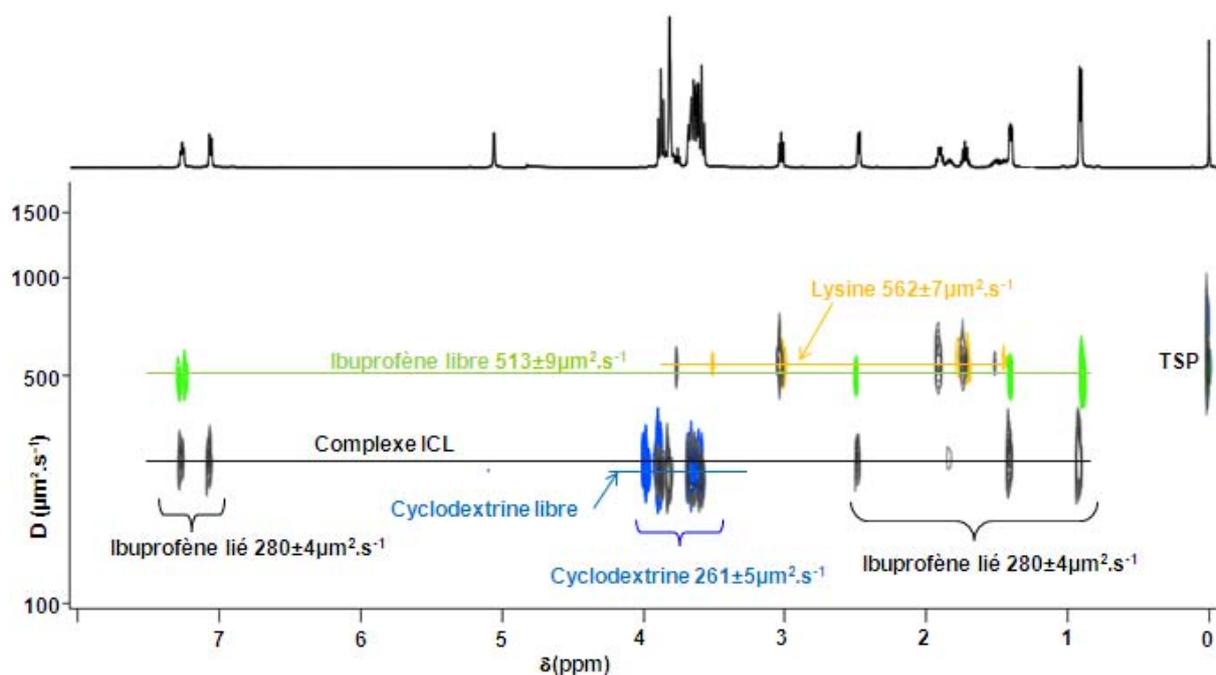


Figure 53. Superpositions des spectres RMN DOSY ^1H de l'ibuprofène (en vert), de l'arginine (en orange, spectre B), de la lysine (en orange, spectre C), de la β -cyclodextrine (en bleu) et des complexes IC (en noir, spectre A), ICA (en noir, spectre B) et ICL (en noir, spectre C) enregistrés dans D_2O .

Les spectres DOSY ^1H ont été enregistrés pour des solutions à 5 mM à leur pH naturel après une heure d'agitation à 25 °C. Les signaux en vert correspondent au spectre de l'ibuprofène libre. Son coefficient de diffusion est égal à $513 \pm 9 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Les signaux en noir correspondent aux spectres des complexes (Figure 53 A : complexe IC, figure B : complexe ICA et figure C : complexe ICL). Le coefficient de diffusion de l'ibuprofène a fortement diminué avec des valeurs égales à $273 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour le complexe IC, à $276 \pm 2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour le complexe ICA et à $280 \pm 4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour le complexe ICL. La diminution du coefficient de diffusion de l'ibuprofène confirme la formation d'un complexe. Des variations des déplacements chimiques des signaux sont également visibles surtout pour les protons aromatiques de l'ibuprofène. Ces variations sont d'autant plus visibles sur les spectres 1D ^1H . La Figure 54 montre le spectre 1D ^1H du complexe ICL (en noir) à pH naturel superposé aux spectres 1D ^1H des standards (en vert : l'ibuprofène, en bleu : la β -cyclodextrine et en orange : la lysine).

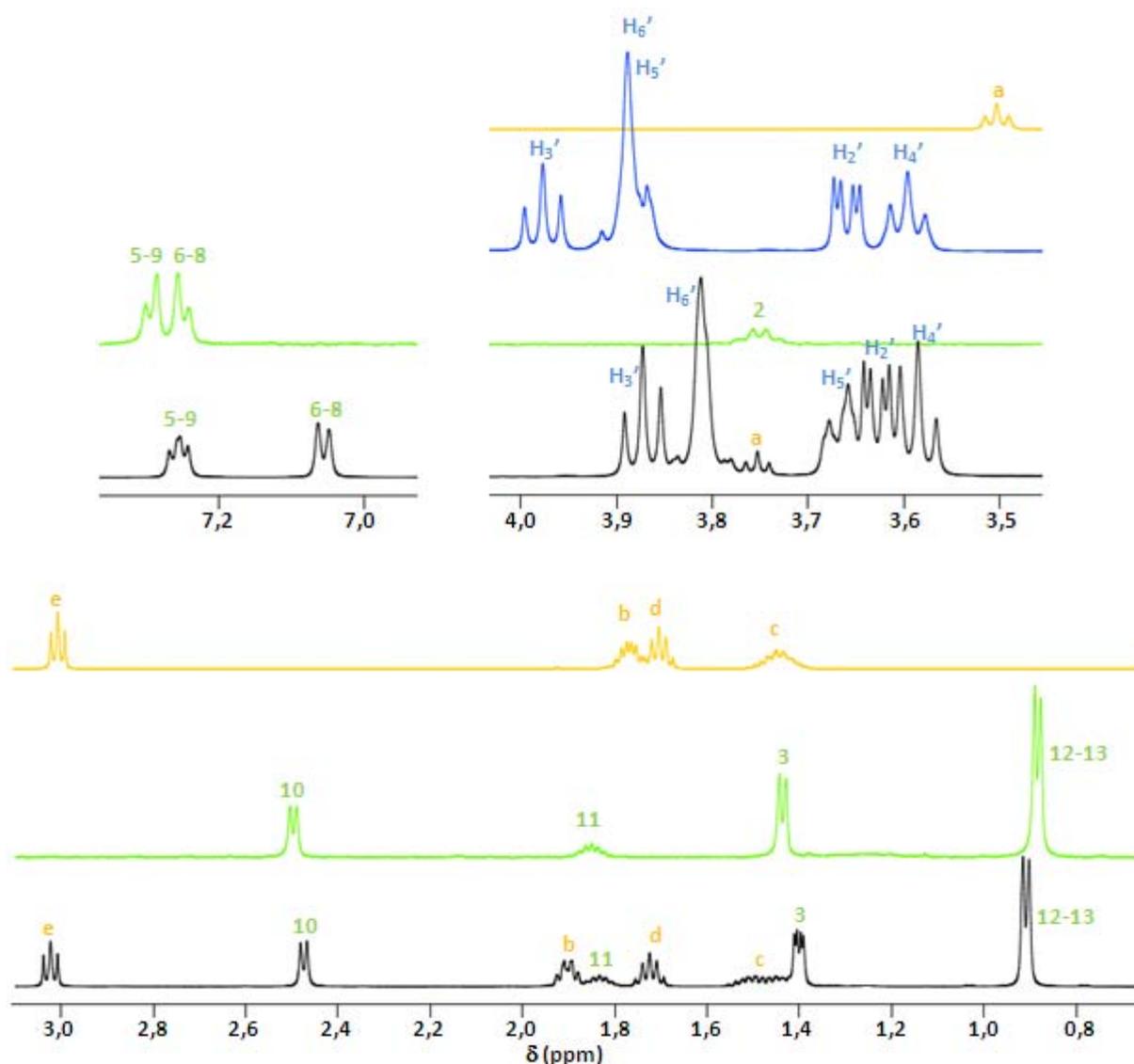


Figure 54. Superpositions des spectres RMN $1D^1H$ de l'ibuprofène (en vert), de la lysine (en orange), de la β -cyclodextrine (en bleu) et du complexe ICL (en noir, spectre C) enregistrés dans D_2O .

Sur cette figure, en plus des variations des déplacements chimiques des signaux, on remarque des changements de multiplicité de certains signaux. C'est notamment le cas pour les protons aromatiques de l'ibuprofène. Ces protons forment un système $AA'BB'$ lorsque l'ibuprofène est seul (en vert). En présence de cyclodextrine, la partie AA' du système $AA'BB'$ correspondant aux protons 5 et 9 de l'ibuprofène devient un système plus complexe. De même le proton 3 de la chaîne aliphatique de l'ibuprofène forme un doublet lorsque que l'ibuprofène est seul alors qu'en présence de cyclodextrine il apparaît sous la forme de deux doublets. Ces changements de multiplicité sont observables lors de l'analyse des trois complexes. Des changements de multiplicité peuvent être observés lors d'un changement de pH ou d'une encapsulation. Cependant, vu qu'ils sont également observables pour le complexe IC où le pH varie peu par rapport à l'ibuprofène seul (Tableau 16), on peut dire

qu'ils témoignent de l'encapsulation du principe actif. L'ensemble des variations des déplacements chimiques de chaque complexe est répertorié dans le tableau ci-dessous :

complexe	molécule	proton	δ (ppm)	multiplicité	Δ (δ) (ppm)
complexe IC	ibuprofène	5,9	7,182	AA'	-0,112
		6,8	7,082	BB'	-0,168
		10	2,528	d(7,0)	0,032
		11	1,886	m	0,037
		3	1,446	d(7,0) d(7,0)	0,010
		12,13	0,929	d(6,5)	0,046
	Cyclodextrine	H1'	5,054	d(3,4)	-0,027
		H3'	3,879	t(9,5)	-0,098
		H6'	3,789	large s	-0,099
		H5'	3,611	m	-0,277
		H2'	3,639	dd(3,5/9,9)	-0,021
H4'	3,597	t(9,0)	0,001		
complexe	molécule	proton	δ (ppm)	multiplicité	Δ (δ) (ppm)
complexe ICA	ibuprofène	5,9	7,256	AA'	-0,038
		6,8	7,052	BB'	-0,198
		10	2,474	d(6,7)	-0,022
		11	1,833	m	-0,016
		3	1,401	d(7,0) d(7,0)	-0,035
		12,13	0,910	d(6,4)	0,027
	cyclodextrine	H1'	5,054	d(3,4)	-0,027
		H3'	3,877	t(9,5)	-0,100
		H6'	3,815	large s	-0,073
		H5'	3,676	m	-0,212
		H2'	3,630	dd(3,5/10)	-0,030
	H4'	3,586	t(9,5)	-0,010	
	arginine	a	3,764	t(6,1)	0,468
		d	3,246	t(7,0)	0,035
b		1,907	m	0,280	
c		1,687	m	0,060	
complexe	molécule	proton	δ (ppm)	multiplicité	Δ (δ)
complexe ICL	ibuprofène	5,9	7,256	AA'	-0,038
		6,8	7,056	BB'	-0,194
		10	2,475	d(6,7)	-0,021
		11	1,833	m	-0,016
		3	1,401	d(7,0) d(7,0)	-0,035
		12,13	0,909	d(6,6)	0,026
	cyclodextrine	H1'	5,053	d(3,5)	-0,028
		H3'	3,873	t(9,5)	-0,104
		H6'	3,812	large s	-0,076
		H5'	3,670	m	-0,218
		H2'	3,630	dd(3,5/9,9)	-0,030
	H4'	3,587	t(9,5)	-0,010	
	lysine	a	3,753	t(6,1)	0,251
		e	3,023	t(7,7)	0,022
		d	1,725	quint(7,7)	-0,034
b		1,902	m	0,204	
c		1,487	m	0,049	

Tableau 14. Déplacements chimiques des complexes IC, ICA et ICL. La variation des déplacements chimiques $\Delta(\delta)$ est définie comme étant la différence entre les déplacements chimiques observés et les déplacements chimiques des espèces libres à leur pH naturel ($\Delta(\delta) = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{libre}}$). (d : doublet, dd : doublet dédoublé, t : triplet, s : singulet, quint : quintuplet, m : multiplet).

On remarque une très forte variation des déplacements chimiques vers les champs forts des protons aromatiques de l'ibuprofène et des protons intérieurs de la β -cyclodextrine. D'un autre côté, les protons a et b des agents ternaires subissent un déblindage en présence du complexe. Ces variations témoignent à la fois de la formation d'un complexe d'inclusion et d'un changement de pH entre les différentes solutions, ce qui rend difficile leur interprétation.

D'après la littérature, la stœchiométrie du complexe est 1 : 1 (Xing, et al., 2009) (Di Cagno, et al., 2011) (Al Omari, et al., 2009). Il est alors possible de calculer le taux d'encapsulation du complexe selon l'Équation 24.

Les taux d'encapsulation apparents sont répertoriés dans le Tableau 15. Ils sont au-dessus de 90 % pour les trois complexes. Cependant, la RMN DOSY ^1H permet de mesurer le taux d'encapsulation de la partie soluble du complexe. La solubilité des complexes a donc été analysée par RMN ^1H en intégrant l'aire des signaux des protons aromatiques de l'ibuprofène et en spectrométrie UV. Les complexes ICL et ICA ont un taux de solubilité supérieur à 95 % alors que le complexe IC possède un taux de solubilité plus faible, autour de 63 %. La présence de l'agent ternaire améliore donc la solubilité du complexe. Si l'on considère que la partie non soluble de l'échantillon est l'ibuprofène non encapsulé, on peut calculer le taux d'encapsulation réel de l'échantillon en multipliant le taux d'encapsulation apparent par le taux de solubilité. Les valeurs obtenues pour les complexes ICA et ICL sont présentées dans le Tableau 15. Le taux d'encapsulation des complexes ICA et ICL sont autour de 90 %.

Complexe	Taux d'encapsulation apparent	Solubilité mesurée en RMN	Solubilité mesurée en UV	Taux d'encapsulation réel mesuré par RMN	Taux d'encapsulation réel mesuré par UV
IC	95 ± 3 %	61 ± 1 %	66 ± 2 %	-	-
ICA	94 ± 3 %	95 ± 0.1 %	98 ± 1 %	89 ± 3 %	92 ± 4 %
ICL	92 ± 3 %	102 ± 2 %	97 ± 1 %	95 ± 4 %	90 ± 4 %

Tableau 15. Mesures des taux de solubilité et des taux d'encapsulation des complexes par RMN ^1H et spectroscopie UV à pH naturel.

D'après la bibliographie, le diagramme de solubilité d'un complexe IC est de type Bs selon la classification d'Higuchi et Connor (Al Omari, et al., 2009). En présence d'un agent

ternaire, le complexe possède un diagramme de solubilité de type A_L (Salústio, et al., 2009) (Al Omari, et al., 2009). Un diagramme de solubilité B_s signifie que l'ajout de cyclodextrine à une solution de principe actif, ici l'ibuprofène, permet d'augmenter la solubilité de celui-ci jusqu'à un certain point. Ensuite le complexe atteint sa solubilité maximale et l'ajout de cyclodextrine entraîne une précipitation du complexe. Alors qu'un diagramme de type A_L signifie que la solubilité du principe actif augmente linéairement avec l'ajout de cyclodextrine. La solubilité de la β -cyclodextrine dans les complexes IC, ICA et ICL a donc été mesurée par RMN 1H en intégrant les protons H_3' de la β -cyclodextrine. Dans les complexes ICA et ICL, la solubilité de la β -cyclodextrine est de 100 % ($99,9 \pm 0,8$ % pour le complexe ICA et $101,8 \pm 1,6$ % pour le complexe ICL). Mais dans le complexe IC, la solubilité de la β -cyclodextrine n'est que de $86,0 \pm 0,8$ %. Une partie de la β -cyclodextrine n'est donc pas soluble. La β -cyclodextrine libre dans les concentrations utilisées est soluble dans l'eau. La partie non soluble est donc complexée. Il est alors plus difficile d'estimer le taux d'encapsulation réel du complexe IC car une partie n'est pas solubilisée.

Si l'on considère que le taux d'encapsulation du complexe non solubilisé est le même que celui du complexe solubilisé, on peut tenter d'estimer un taux d'encapsulation réel du complexe IC. Le taux d'encapsulation apparent est de 95 %. La proportion du complexe dans l'échantillon est de 61 % de soluble plus 14 % de non solubilisé soit un total de 75 %. Le taux d'encapsulation réel du complexe IC est obtenu en multipliant le taux d'encapsulation apparent par la proportion de complexe dans l'échantillon, il serait donc d'environ 71 %. Il ne s'agit que d'une approximation du taux d'encapsulation puisque une partie du complexe, n'étant pas soluble, est supposée être encapsulée avec le même taux d'encapsulation que la partie soluble du complexe.

III.2.3.2) Comparaison des mélanges physiques et des complexes obtenus par CO_2 supercritique.

Des mélanges physiques, obtenus par malaxage, ont été analysés par RMN DOSY 1H et comparés aux spectres des complexes obtenus par CO_2 supercritique. Les spectres DOSY 1H sont superposables. Les taux d'encapsulation apparents, c'est-à-dire de la partie soluble de l'échantillon, sont identiques.

La solubilité des mélanges physiques a été mesurée par RMN 1H en intégrant les protons aromatiques de l'ibuprofène et comparée à la solubilité des complexes obtenus par CO_2 supercritique. Les données sont reportées sur le graphe Figure 55. Les mélanges

physiques sont représentés par des bâtonnets striés. En présence d'agent ternaire (bâtonnets rose et jaune) la solubilité des mélanges physiques est aux alentours de 100 %. Par contre en absence d'agent ternaire (bâtonnet vert) la solubilité de l'échantillon est inférieure à 40 %. Les bâtonnets unis représentent la solubilité des complexes obtenus par CO₂ supercritique. Dans ce cas et en présence d'agent ternaire, la solubilité des complexes est proche de 100 %. Alors qu'en absence d'agent ternaire, la solubilité est $60,5 \pm 1,1$ %. Donc en présence d'un agent ternaire, la solubilité des complexes obtenus par CO₂ supercritique et la solubilité des mélanges physiques obtenus par malaxage après une heure d'agitation à 25°C sont identiques et proches de 100 %. Par contre, lorsqu'il n'y a pas d'agent ternaire, la complexation par CO₂ supercritique permet d'obtenir une meilleure solubilité du complexe.

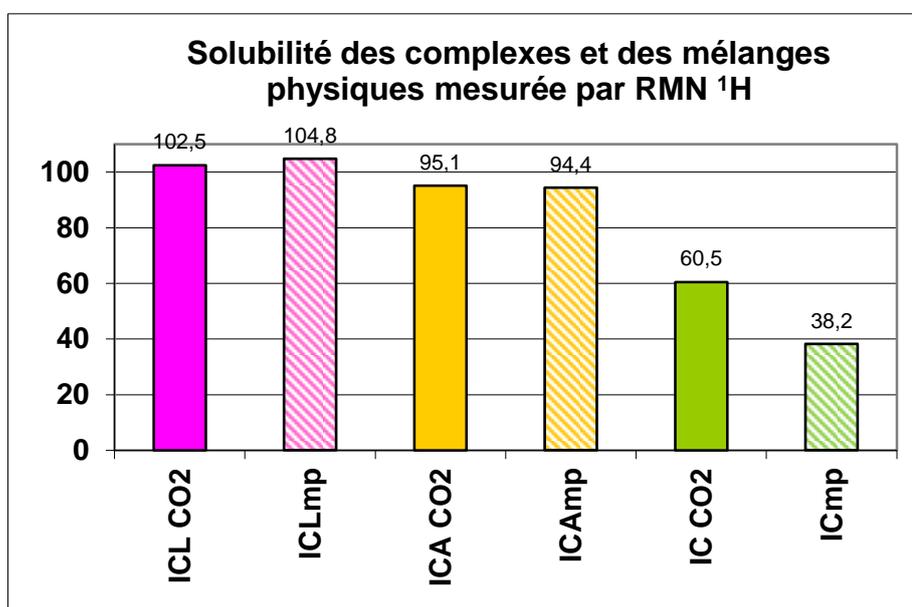


Figure 55. Graphe des taux de solubilité des complexes obtenus par CO₂ supercritique et des mélanges physiques obtenus par malaxage mesurés par RMN ¹H à pH naturel.

III.2.3.3) Etude de l'effet pH lors de l'ajout d'agents ternaires

Le pH des solutions des complexes et des différents standards est présenté dans le tableau ci-dessous.

échantillon	ibuprofène	cyclodextrine	arginine	lysine	IC	ICA	ICL
pH	$4,6 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,5$	$10,7 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$

Tableau 16. pH des solutions des complexes et des différents standards

L'ibuprofène a un pH naturel de $4,6 \pm 0,2$. L'ajout de cyclodextrine modifie peu le pH de la solution. Par contre, l'ajout d'agents ternaires provoque une hausse du pH à $7,2 \pm 0,1$ pour la solution du complexe ICL et à $7,4 \pm 0,1$ pour la solution du complexe ICA.

Sur les spectres RMN 1D ^1H des complexes, nous avons observé certaines variations des déplacements chimiques des composés par rapport aux spectres RMN 1D ^1H de leurs standards. Ces variations des déplacements chimiques sont dues à l'encapsulation de l'ibuprofène dans la cyclodextrine et à la variation du pH relativement importante pour les complexes en présence d'agent ternaire. L'ensemble des standards a donc été analysé par RMN DOSY ^1H et par RMN 1D ^1H au pH des complexes afin d'observer les variations des déplacements chimiques exclusivement dues à l'encapsulation. La Figure 56 montre le spectre RMN 1D ^1H du complexe ICL (en noir) superposé aux spectres RMN 1D ^1H des standards au pH du complexe (en vert : l'ibuprofène, en bleu : la β -cyclodextrine et en orange : la lysine).

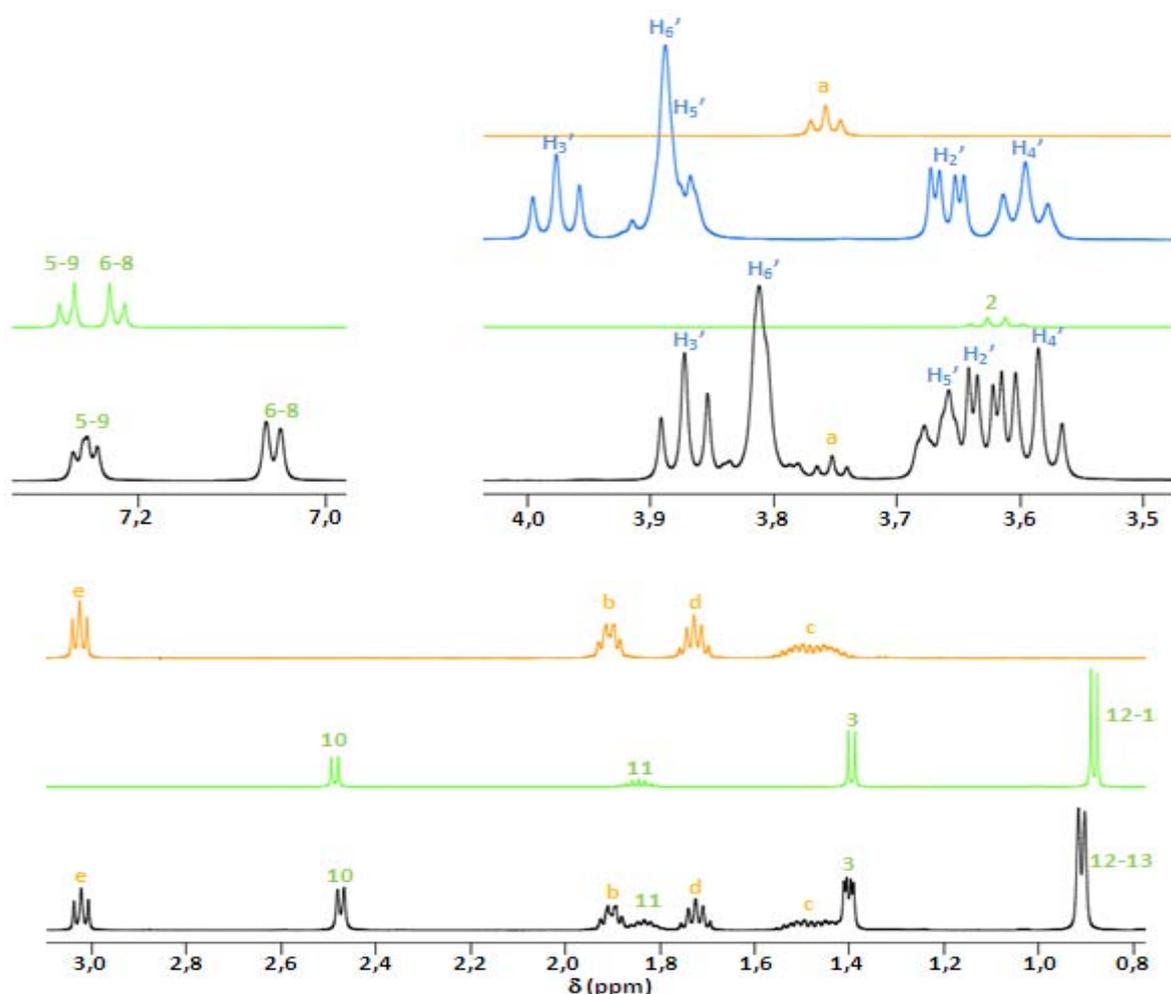


Figure 56. Superpositions des spectres RMN 1D ^1H de l'ibuprofène avec un pH réajusté à 7,2 (en vert), de la lysine avec un pH réajusté à 7,2 (en orange), de la β -cyclodextrine avec un pH réajusté à 7,2 (en bleu) et du complexe ICL (en noir) enregistrés dans D_2O .

Sur cette figure, les changements de multiplicité des signaux des protons 5, 9 et 3 de l'ibuprofène sont toujours visibles. En présence de cyclodextrine, la partie A du système AA'BB' correspondant aux protons 5 et 9 de l'ibuprofène change de multiplicité. De même le

proton 3 de la chaîne aliphatique de l'ibuprofène forme un doublet lorsque que l'ibuprofène est seul alors qu'en présence de cyclodextrine il apparaît sous la forme de deux doublets. Ces changements de multiplicité témoignent donc de l'encapsulation du principe actif. Les variations des déplacements chimiques de chaque complexe sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

complexe	molécule	proton	δ (ppm)	multiplicité	Δ (δ) (ppm)
complexe ICA	ibuprofène	5,9	7,256	AA'	-0,020
		6,8	7,052	BB'	-0,170
		10	2,474	d(6,7)	-0,013
		11	1,833	m	-0,012
		3	1,401	d(7,0) d(7,0)	0,006
		12,13	0,910	d(6,4)	0,027
	cyclodextrine	H1'	5,054	d(3,4)	-0,027
		H3'	3,877	t(9,5)	-0,100
		H6'	3,815	large s	-0,073
		H5'	3,676	m	-0,212
		H2'	3,630	dd(3,5/10)	-0,030
		H4'	3,586	t(9,5)	-0,010
	arginine	a	3,764	t(6,1)	-0,003
		d	3,246	t(7,0)	-0,004
b		1,907	m	-0,003	
c		1,687	m	-0,003	

complexe	molécule	proton	δ (ppm)	multiplicité	Δ (δ) (ppm)
complexe ICL	ibuprofène	5,9	7,256	AA'	-0,020
		6,8	7,056	BB'	-0,166
		10	2,475	d(6,7)	-0,012
		11	1,833	m	-0,012
		3	1,401	d(7,0) d(7,0)	0,006
		12,13	0,909	d(6,6)	0,026
	cyclodextrine	H1'	5,053	d(3,5)	-0,028
		H3'	3,873	t(9,5)	-0,104
		H6'	3,812	large s	-0,076
		H5'	3,670	m	-0,218
		H2'	3,630	dd(3,5/9,9)	-0,030
		H4'	3,587	t(9,5)	-0,010
	lysine	a	3,753	t(6,1)	-0,005
		e	3,023	t(7,7)	-0,003
d		1,902	m	-0,004	
b		1,725	quint(7,7)	-0,003	
c		1,486	m	0,009	

Tableau 17. Déplacements chimiques des complexes IC, ICA et ICL. La variation des déplacements chimiques Δ (δ) est définie comme étant la différence entre les déplacements chimiques observés et les déplacements chimiques des espèces libres au pH des complexes (Δ (δ) = δ_{obs} - δ_{libre}). (d : doublet, dd : doublet dédoublé, t : triplet, s : singulet, quint : quintuplet, m : multiplet).

Les complexes ICA et ICL semblent se comporter de la même manière. Lors de l'encapsulation de l'ibuprofène, l'ensemble des signaux de la β -cyclodextrine subissent un blindage. Les variations les plus importantes sont observées pour les protons intérieurs de la

cyclodextrine, H₅' , H₃' et H₆'. Ils interagissent donc fortement avec l'ibuprofène. D'un autre côté, les protons extérieurs de la β-cyclodextrine ont des variations de déplacements chimiques plus faibles. Les interactions avec le principe actif sont donc plus faibles.

Pour l'ibuprofène, les protons aromatiques montrent une forte variation des déplacements chimiques vers les champs forts. Ces variations sont plus appuyées pour les protons aromatiques 6 et 8 que pour les protons aromatiques 5 et 9 ce qui montre que les protons 6 et 8 sont plus profondément encapsulés dans la cyclodextrine. Les protons aliphatiques révèlent également des variations de déplacements chimiques, ils sont donc encapsulés. Par contre les protons 3 montrent une très faible variation, ils ne sont donc pas inclus dans la cyclodextrine.

Les signaux correspondant aux protons des agents ternaires subissent une très faible variation des déplacements chimiques. Ils ne sont donc pas inclus dans la cyclodextrine et les variations des déplacements chimiques observées étaient donc dues aux variations de pH.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Al Omari, et al., 2009) (Di Cagno, et al., 2011). Ils confirment les conclusions obtenues à l'aide de l'analyse des spectres ROESY et DOSY ¹H, à savoir que les protons aromatiques et la chaîne aliphatique de l'ibuprofène sont inclus dans la cyclodextrine et que l'agent ternaire n'est pas encapsulé.

Les solubilités de l'ibuprofène et du complexe IC ont été mesurées par RMN ¹H à pH 7,2, c'est-à-dire au même pH que les complexes en présence d'agent ternaire. Les résultats obtenus sont comparés à la solubilité des complexes ICL, IC, ICA et à l'ibuprofène à leur pH naturel sur l'histogramme Figure 57.

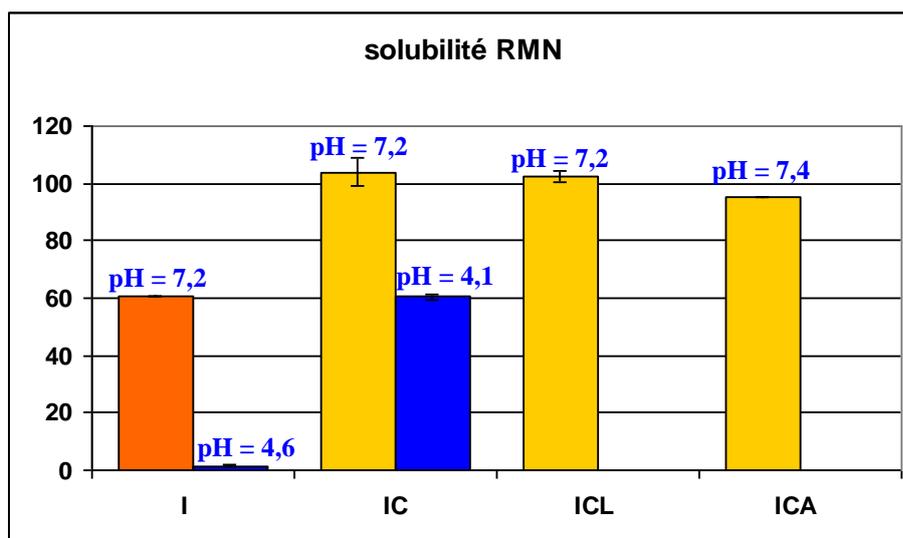


Figure 57. Histogramme des taux de solubilité de l'ibuprofène et des complexes à leur pH naturel et à un pH de 7,2.

La solubilité de l'ibuprofène est pH dépendant. Au pH naturel, c'est à dire à 4,6, l'ibuprofène est peu soluble, sa solubilité atteint à peine $1,6 \pm 0,2$ %. Le pKa de l'ibuprofène est de 4,41. Lorsque le pH est augmenté à l'aide d'une solution de soude à un pH de 7,2 (pH mesuré dans les solutions des complexes ICL et ICA) l'ibuprofène est ionisé et sa solubilité augmente jusqu'à atteindre $60,4 \pm 4,1$ %. La solubilité du complexe IC est également pH dépendant. Au pH naturel, c'est à dire à 4,1, elle est égale à $60,5 \pm 1,1$ %. Par contre, lorsque le pH est augmenté à 7,2, la solubilité du complexe IC atteint les 100 %. La solubilité du complexe IC est alors équivalente à celle des complexes ICL et ICA. Les agents ternaires jouent donc un rôle important de pH. Dans les complexes ICA et ICL, l'ibuprofène est donc sous une forme ionisée. D'après la bibliographie, l'affinité d'un principe actif pour la cage hydrophobe de la β -cyclodextrine diminue lorsque celui-ci est ionisé. La perte d'affinité se traduit par une constante d'association plus faible mais elle ne semble pas diminuer le taux d'encapsulation car, comme nous l'avons vu, le taux d'encapsulation est proche de 100 % en présence d'agent ternaire. Plusieurs auteurs suggèrent également que l'agent ternaire forme des liaisons hydrogènes avec la cyclodextrine. Les interactions entre l'agent ternaire et la cyclodextrine ainsi que les interactions électrostatiques avec le principe actif forment une sorte de verrou au complexe. La ROESY ne nous permet pas de voir ces liaisons hydrogènes car le complexe est en solution aqueuse. Cependant, nous avons vu que dans le DMSO- d_6 le complexe en présence d'agent ternaire était plus stable que le complexe IC ce qui irait dans le sens de cette hypothèse.

III.2.4) Etude de la molécule X

Partie confidentielle

III.2.5) Conclusion

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont une faible biodisponibilité liée directement à leur faible solubilité aqueuse. L'encapsulation des principes actifs dans des cyclodextrines est alors utilisée pour augmenter leur solubilité. L'objectif de cette étude était d'utiliser la RMN et plus particulièrement la RMN DOSY ^1H pour caractériser ces complexes. Le coefficient de diffusion d'une molécule à l'état libre ou complexé est différent. Par conséquent nous avons utilisé la RMN DOSY ^1H pour calculer le taux d'encapsulation des complexes de stœchiométrie 1 : 1.

Suite à une étude sur des complexes de camphre, nous avons montré que le coefficient de diffusion est proportionnel à la taille du système étudié. Par conséquent, le coefficient de diffusion d'un complexe de stœchiométrie 1 : 2, encapsulé à 100 %, est inférieur à celui d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1. Cependant cette valeur dépend également du taux d'encapsulation, c'est pourquoi il est difficile de conclure sur la stœchiométrie d'un complexe à l'aide d'une seule analyse RMN DOSY ^1H .

La RMN DOSY ^1H a également permis de prouver que l'agent ternaire ne s'encapsule pas. Cette technique analytique n'avait, à ma connaissance, jamais été utilisée pour le démontrer auparavant.

Des études de solubilité ont mis en lumière que l'agent ternaire améliore la solubilité du complexe grâce notamment à un effet pH. Ces études ont également confirmé qu'en absence d'agent ternaire un complexe réalisé par CO_2 supercritique a une meilleure solubilité qu'un complexe formé par malaxage. Enfin des études ROESY ont permis de faire des hypothèses sur la géométrie des complexes.

Cette étude montre la difficulté de caractériser ces entités en solution, puisque leurs caractéristiques varient suivant le pH de la solution. Des méthodes de caractérisation en phase solide pourraient alors sembler plus adaptées, pourtant la mise en solution de ces complexes nous semble plus proche de la réalité dans la mesure où c'est une étape qui se rapporte directement aux conditions d'utilisation de ces médicaments lors de l'administration aux patients.

III.3) Matériels et méthodes

III.3.1) Matières premières utilisées

III.3.1.1) Les principes actifs :

Le mélange racémique d'ibuprofène et la molécule X ont été fournis par les laboratoires Pierre Fabre, Plantes et Industrie, (Gaillac). Le camphre provient des laboratoires Sigma-Aldrich.

III.3.1.2) Les complexes :

Différents complexes d'ibuprofène réalisés par CO₂ supercritique à l'état statique ont été fournis par les laboratoires Pierre Fabre. Les ratios et les conditions de pression, de température et de temps utilisés pour réaliser ces complexes sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Complexe	PA	CD	AT	Ratio PA/CD/AT	P (bar)	T (°C)	Temps (h)	lot
IC	ibuprofène	β-CD	-	1 : 1 : 0	150	60	2	TNT-04131B
ICA			arginine	1 : 1 : 1	150	60	2	TNT-04131F
ICL			lysine	1 : 1 : 1	150	60	2	LP 4.0

Tableau 18. Conditions de préparation des complexes par CO₂ supercritique.

III.3.1.3) Les mélanges :

Pour étudier les interactions entre l'agent ternaire et la β-cyclodextrine ainsi que les interactions entre l'agent ternaire et l'ibuprofène, plusieurs mélanges ont été réalisés par CO₂ supercritique. Les mélanges et les conditions de préparation sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Mélange	Composé 1	AT	Ratio 1 /AT	P (bar)	T (°C)	Temps (h)	lot
CA	β-CD	arginine	1 : 1	150	60	2	TNT-08083A
CL		lysine	1 : 1	150	60	2	TNT-08083B
IA	ibuprofène	arginine	1 : 1	150	60	2	TNT-08083C
IL		lysine	1 : 1	150	60	2	TNT-08083D

Tableau 19. Conditions de préparation des mélanges par CO₂ supercritique.

Des mélanges physiques ont également été préparés. La complexation qui se crée peut alors être retranchée à la complexation par CO₂ supercritique. Les mélanges physiques sont réalisés par malaxage avec les mêmes ratios qui sont utilisés pour les complexes par CO₂ supercritique. Les conditions de mise en solution et d'analyse sont identiques pour les mélanges physiques et pour les complexes.

III.3.1.4) Les cyclodextrines et les agents ternaires :

Echantillons	Fournisseur	Masse molaire	Formule brute	Lots
α-cyclodextrine	Sigma-Aldrich	972,86	(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₆	019K1090
δ-cyclodextrine	Sigma-Aldrich	1297,15	(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₈	099K1468
β-cyclodextrine	Laboratoires Pierre Fabre	1134,98	(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₇	MP 11661
Arginine		174,20	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	A0230418
Lysine hydrate		164,21	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ (H ₂ O)	MP11677

Tableau 20. Liste des cyclodextrines et agents ternaires utilisés.

III.3.1.5) Autres produits :

Les solvants (le D₂O à 99,9 % et le DMSO à 99,8 %) ont été fournis par Euriso-top, le TSP par Alfa Aesar et les produits utilisés pour l'ajustement des pH (NaOD et DCL) viennent des laboratoires Sigma-Aldrich.

III.3.2) Préparation des échantillons

Les solutions sont laissées une heure sous agitation magnétique à 25 °C (bain thermostaté) afin que l'équilibre soit atteint. Elles sont ensuite filtrées sur un filtre 0,45 µm. Les filtrats sont analysés et leur pH sont mesurés (le pH lu n'est pas corrigé de l'effet isotopique du deutérium).

Choix du solvant

2 mL de solution d'ibuprofène, de β-cyclodextrine, du complexe IC, du complexe ICA et du complexe ICL sont préparés à 15 mM dans du DMSO-d₆. 500 µL de filtrat sont analysés par RMN DOSY ¹H.

2 mL de solution d'ibuprofène, de β -cyclodextrine, d'arginine, de lysine, du complexe IC, du complexe ICA et du complexe ICL sont préparés à 5 mM dans du D₂O. 500 μ L de filtrat sont analysés par RMN DOSY ¹H.

Mesure de la viscosité

3 mL de solutions aqueuses d'ibuprofène, de complexe ICL, de complexe ICA, de complexe IC et de β -cyclodextrine sont préparés à 5 mM. 3 mL de solution aqueuse de β -cyclodextrine sont également préparés à 10 mM. Les filtrats sont ensuite analysés sur un rhéomètre.

Trois solutions ont été préparées dans D₂O et 500 μ L de filtrat sont analysés par RMN DOSY ¹H sans présaturation de l'eau afin de prendre son signal comme référence.

Les trois solutions sont :

- 2 mL de lysine à 5 mM (pH : 9,8)
- Un mélange de lysine et de β -cyclodextrine à 5 mM (pH : 9,9)
- Un mélange de lysine et de β -cyclodextrine à 5 mM et 10 mM respectivement (pH : 9,9)

Vérification de la proportionnalité entre le coefficient de diffusion et la masse moléculaire

2 mL de solution aqueuse des cyclodextrines α , β , δ sont préparés à 5 mM. 500 μ L de filtrat sont analysés par RMN DOSY ¹H.

Complexes de Camphre

Une solution aqueuse de camphre est préparée et quantifiée par RMN ¹H à 7 mM. Une solution aqueuse de cyclodextrine α est préparée à 30 mM. A partir de ces deux solutions mères, trois mélanges sont préparés :

Mélange	Ratio	[camphre]	[α -CD]	pH
Camphre- α -cyclodextrine	1-18	1 mM	18 mM	7,2
	1-6	1 mM	6 mM	7,3
	1-2	3,5 mM	7 mM	7,2

Tableau 21. Mélanges camphre- α -cyclodextrine réalisés

500 μL de chaque filtrat sont ensuite analysés par RMN DOSY ^1H .

Préparation des mélanges ICL et IL pour obtenir différents taux d'encapsulation

- Solution ICL encapsulé à 100 % :

Une solution du complexe ICL, obtenu par CO_2 , est préparée dans D_2O à 5 mM (22,56 mg dans 3 mL, pH = 7,09).

- Solution IL encapsulé à 0 % :

Une solution de IL est préparée dans D_2O à 5 mM (7,38 mg dans 4 mL, le pH est réajusté au pH d'ICL à l'aide d'une solution de DCl. Le pH final obtenu est de 7,14).

Trois solutions filles sont réalisées à partir des solutions du complexe ICL et du mélange ibuprofène-lysine :

	Volume de la solution mère D'ICL	Volume de la solution mère D'IL	concentrations finales en ibuprofène et lysine	concentration finale en β -cyclodextrine
Solution ICL encapsulé à 25 %	125 μL	375 μL	5 mM	1,25 mM
Solution ICL encapsulé à 50 %	250 μL	250 μL	5 mM	2,5 mM
Solution ICL encapsulé à 75 %	375 μL	125 μL	5 mM	3,75 mM

Tableau 22. Solutions de complexe ICL et de mélange IL à différents ratios.

500 μL de chaque solution sont ensuite analysés par RMN DOSY ^1H .

Complexes, mélanges physiques, standards de la molécule X et d'ibuprofène à pH naturel

Des solutions aqueuses sont préparées à 5 mM pour chaque complexe, mélange physique et leurs standards. Une solution aqueuse de cyclodextrine à 10 mM est également préparée.

Les filtrats sont analysés par spectrométrie RMN ^1H et par spectrométrie UV.

III.3.3) Spectroscopie RMN

Les expériences RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 500 équipé d'une cryosonde 5 mm. Les spectres sont réalisés à 298 K sur 500 μ L de filtrat avec comme référence interne le sodium 3-(triméthylsilyl)tétradeutériopropionate (TSP). Les spectres protons sont calibrés par rapport à cette référence interne. Cependant pour éviter toute interaction entre le TSP et l'échantillon, un capillaire externe a été utilisé (Figure 58).

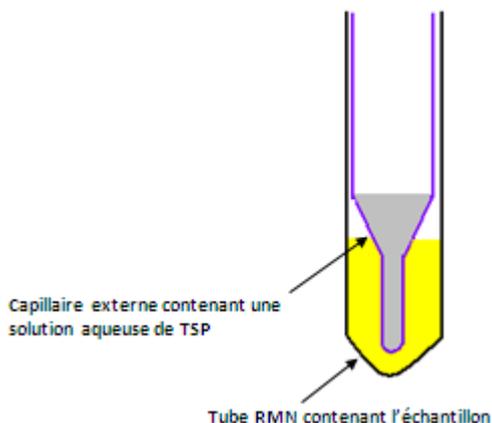


Figure 58. Schéma d'un capillaire externe placé dans un tube RMN

III.3.3.1) Spectres RMN ^1H

Les paramètres d'acquisition des spectres RMN ^1H sont :

- temps d'acquisition (AQ) : 2,72 s
- fenêtre spectrale (SW) : 6000 Hz
- taille de FID : 32 k
- délai de relaxation : 1 s
- accumulation : 16 scans
- durée d'impulsion : de 8 à 8,25 μ s (selon l'échantillon ce qui correspond à un angle de basculement d'environ 90°)

Le délai de relaxation est augmenté à 8 s avec une impulsion de 2,67 μ s (soit un angle de basculement d'environ 30°) pour les analyses quantitatives. Le nombre d'accumulation est augmenté à 128 scans. La référence quantitative utilisée est la solution de TSP du capillaire. Le capillaire externe a été calibré à l'aide de solutions contenant un mélange de succinate de sodium et de maléate de sodium à 5, 10 et 15 mM. La concentration apparente en TSP mesurée dans le capillaire est de 1,33 mM.

III.3.3.2) RMN DOSY ^1H

L'ensemble des échantillons a été analysé par RMN DOSY ^1H . La séquence utilisée est une LED-STE-Bipolaire Gradient Pulse avec des gradients de purge pour les spectres enregistrés dans le DMSO- d_6 et une présaturation du signal de l'eau est ajoutée pour les spectres enregistrés dans D_2O .

Une série de 40 expériences est enregistrée en faisant varier linéairement l'intensité du gradient de 5 à 95 % avec une intensité maximale du gradient de 46.25 G/cm^{-1} . Le délai de relaxation entre les impulsions est fixé à 2 s. Afin d'éliminer des artéfacts dus aux courants de Foucault, un délai LED est ajouté avant l'acquisition pendant une durée variant de 20 à 50 ms ainsi que des gradients de purge d'une durée d'une milliseconde avec une force de $-7,92$ et $-6,09 \text{ G.cm}^{-1}$. Après optimisation de la séquence DOSY, le délai de diffusion D20 varie de 100 ms à 155 ms et la durée du gradient P30 varie de 1,74 ms à 3,05 ms selon les échantillons. Les autres paramètres d'acquisitions sont identiques à ceux utilisés pour les expériences RMN 1D.

Les données spectrales sont traitées avec le logiciel Gifa 5.2® développé par M.A Delsuc et commercialisé par la société NMRtec (Illkirch, France). Ce logiciel utilise la méthode numérique d'optimisation par entropie maximum (MaxEnt) pour la transformée inverse de Laplace des spectres DOSY.

III.3.3.3) RMN ROESY ^1H - ^1H

Les spectres ROESY ^1H - ^1H sont enregistrés avec les paramètres suivants :

- temps d'acquisition (AQ) : 0,2 s
- fenêtre spectrale (SW) : 5500 Hz
- taille de FID : 2 k
- délai de relaxation : 1 s
- accumulation : 16 scans
- durée d'impulsion : de 8 à 8,25 μs (selon l'échantillon ce qui correspond à un angle de basculement d'environ 90°)
- temps de mélange : 1 s

III.3.3.4) Autres expériences RMN

L'attribution de chaque spectre a été vérifiée par un ensemble d'expérience RMN mono et bidimensionnelle (COSY ^1H - ^1H , Jmod ^{13}C , HSQC ^1H - ^{13}C et HMBC ^1H - ^{13}C). Les expériences ont été enregistrées avec les paramètres suivants :

COSY ^1H - ^1H :

- fenêtre spectrale (SW) : 5500 Hz (F1)* 5500 Hz (F2)
- taille de FID : (F1)* (F2) de 2 k * 256 k
- durée d'impulsion : de 8 à 8,25 μs (selon l'échantillon ce qui correspond à un angle de basculement d'environ 90°)
- délai de relaxation : 2 s
- accumulation : 4 scans

Jmod ^{13}C :

- fenêtre spectrale (SW) : 27 778 Hz
- taille de FID (F1) : 64 k
- Une durée d'impulsion : de 8 à 8,25 μs (selon l'échantillon ce qui correspond à un angle de basculement d'environ 90°)
- délai de relaxation : 2,5 s
- accumulation : 4000 scans

HSQC ^1H - ^{13}C

- fenêtre spectrale (SW) : 5500 Hz (F1)* 22 638 Hz (F2)
- taille de FID de (F1)* (F2) : 4 k * 256
- durée d'impulsion : de 8 à 8,25 μs (selon l'échantillon ce qui correspond à un angle de basculement d'environ 90°)
- délai de relaxation : 2 s
- accumulation : 16 scans

HMBC ^1H - ^{13}C

- fenêtre spectrale (SW) : 5500 Hz (F1)* 22 638 Hz (F2)
- taille de FID de (F1)* (F2) : 4 k * 256 k

- durée d’impulsion : de 8 à 8,25 μs (selon l’échantillon ce qui correspond à un angle de basculement d’environ 90°)
- délai de relaxation : 2 s
- accumulation : 16 scans

III.3.4) Spectroscopie UV

Pour le complexe de la molécule X, 100 μL du filtrat sont dilués dans 4,5 mL d’eau milliQ puis 2 mL sont analysés par spectroscopie UV. Pour les complexes d’ibuprofène, 70 μL du filtrat sont dilués dans 3,9 mL d’eau milliQ puis 2 mL sont analysés par spectrométrie UV. Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre UV SPECORD, piloté par le logiciel WinASPECT. Les spectres sont enregistrés de 190 nm à 600 nm avec un pas de 1 nm. La vitesse de défilement est de $50 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ et le changement de lampe se fait à 320 nm.

Des courbes de calibration ont été faites pour chaque complexe et pour les mélanges IA et IL. Des solutions mères des complexes ICA et ICL et des mélanges IA et IL sont préparés dans D_2O à 0,35 mM. La concentration de la solution mère du complexe IC est de 0,175 mM pour éviter des problèmes de solubilité. Les solutions sont mises sous agitation magnétique à 25°C pendant une heure. Une série de solutions filles présentées dans le Tableau 23 est analysée.

Solution	a	b	c	d	e	f	g	h	i
Volume d’échantillon (mL)	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9	1	1,5	2,5
Volume total (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentration finale (mM)	0,009	0,018	0,026	0,044	0,061	0,079	0,088	0,131	0,175

Tableau 23. Solutions préparées pour chaque complexe et mélange d’ibuprofène pour réaliser les courbes de calibrations UV.

Une solution mère du complexe de la molécule X est préparée dans D_2O à 0,09 mM. La solution est mise sous agitation magnétique à 25°C pendant une heure. Une série de solutions filles présentées dans le Tableau 24 est analysée.

Solution	a	b	c	d	e	f	g
Volume d’échantillon (mL)	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1	1,3
Volume total (mL)	4	4	4	4	4	4	4
Concentration finale (mM)	0,002	0,005	0,007	0,011	0,016	0,023	0,029

Solution	h	i	j	k	l	m	n
Volume d'échantillon (mL)	1,5	2	2,5	3	3,2	3,5	4
Volume total (mL)	4	4	4	4	4	4	4
Concentration finale (mM)	0,034	0,045	0,056	0,068	0,072	0,079	0,090

Tableau 24. Solutions préparées pour chaque complexe et mélange d'ibuprofène pour réaliser les courbes de calibrations UV.

Les analyses sont réalisées trois fois (triplicate). Les courbes de calibration sont réalisées à partir des valeurs de l'absorbance de l'ibuprofène à 224 nm et des valeurs de l'absorbance de la molécule X à 355 nm. Les équations des courbes d'étalonnage obtenues sont :

- Pour le complexe ICA : $y = 7737,4x + 0,0004$ avec un $R^2 = 1$
- Pour le complexe ICL : $y = 8311,9x + 0,0028$ avec un $R^2 = 1$
- Pour le complexe IC : $y = 7021,7x + 0,0254$ avec un $R^2 = 0,9984$
- Pour le mélange IA : $y = 8661,4x - 0,0006$ avec un $R^2 = 0,9999$
- Pour le mélange IL : $y = 8241,6x + 0,0025$ avec un $R^2 = 1$

III.3.5) Rhéomètre

Les mesures ont été réalisées à 25°C sur un rhéomètre Anton Paar, physica MCR 301 (Modular Compact Rheometer) équipé de double cylindres coaxiaux ou géométrie couette.

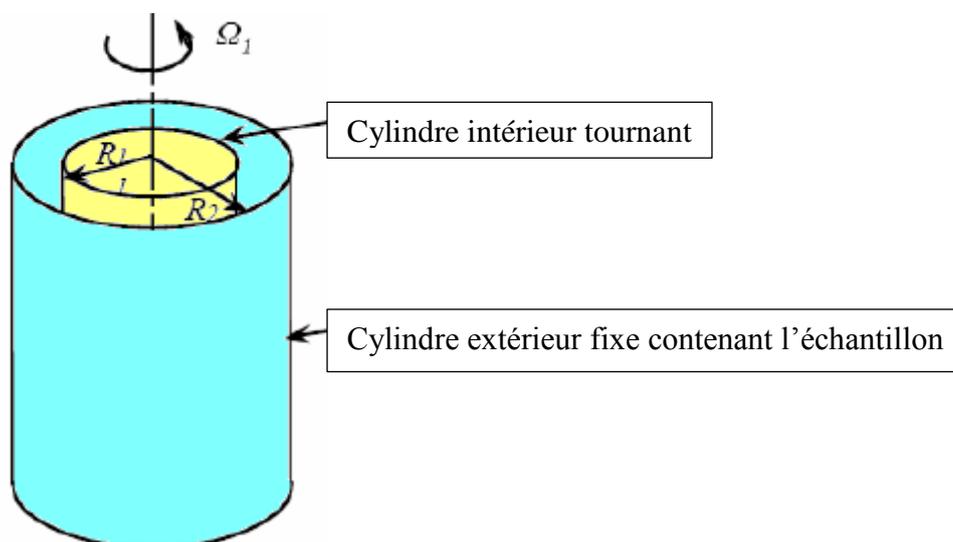


Figure 59. Schéma de la géométrie couette.

L'échantillon est compris entre deux cylindres coaxiaux. Le cylindre intérieur tourne à une vitesse angulaire donnée et le cylindre extérieur est fixe (Figure 59).

L'analyse a été réalisée en deux passages avec un taux de cisaillement variant de 10 à 1000 s^{-1} . La mesure de viscosité a été faite avec un taux de cisaillement égal à 1000 s^{-1} en effectuant une montée en vitesse et une décélération du mobile.

Partie II - Analyse d'extraits de plantes par RMN métabolomique

I) Etat de l'art

I.1) Introduction

Les plantes sont considérées comme source d'une multitude de composés chimiques. Ces composés possèdent des propriétés physico-chimiques très variées et sont présents dans des concentrations très variables. Cette complexité est directement liée au fait que les plantes sont des organismes statiques qui ont dû développer une grande diversité métabolique et chimique pour se nourrir et se défendre. Les extraits naturels fournissent donc de nombreux principes actifs utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Mais la richesse des plantes complique singulièrement le projet d'analyse de l'ensemble du métabolome.

Le terme « métabolome » désigne l'ensemble des métabolites synthétisés par les cellules en fonction de leur mécanisme (Macel, et al., 2010). Les métabolites sont des petites molécules de faible poids moléculaire qui participent aux réactions métaboliques et qui sont nécessaires au fonctionnement normal, au maintien et à la croissance d'une cellule. Le métabolome peut être considéré comme le produit final de l'expression des gènes et des processus de régulation cellulaire. Il définit en partie le phénotype métabolique d'une cellule ou d'un tissu qui est le résultat final de l'interaction entre le génotype et l'environnement. Il représente donc l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, à une pathologie, à une exposition à un toxique ou tout autre facteur susceptible de perturber son fonctionnement. Il est important de comprendre que le métabolome est dynamique et changera donc au cours du temps (Van Der Kooy, et al., 2009).

Le nombre total de métabolites dans les plantes est inconnu. Il est estimé entre 100 000 et 200 000 et seulement 40 000 d'entre eux ont été identifiés (Macel, et al., 2010) (Hagel, et al., 2008). Etudier le métabolome d'une plante est un challenge vu le nombre de métabolites. L'analyse métabolomique a été introduite pour la première fois en 1998 par analogie avec les termes génomique, protéomique et transcriptomique déjà existants (Baker, 2011). Depuis les années 1990, les innovations technologiques ont provoqué une véritable révolution dans la manière dont les systèmes biologiques sont visualisés et investigués. La Figure 60 présente l'augmentation constante du nombre de publications traitant de la métabolomique depuis 1998.

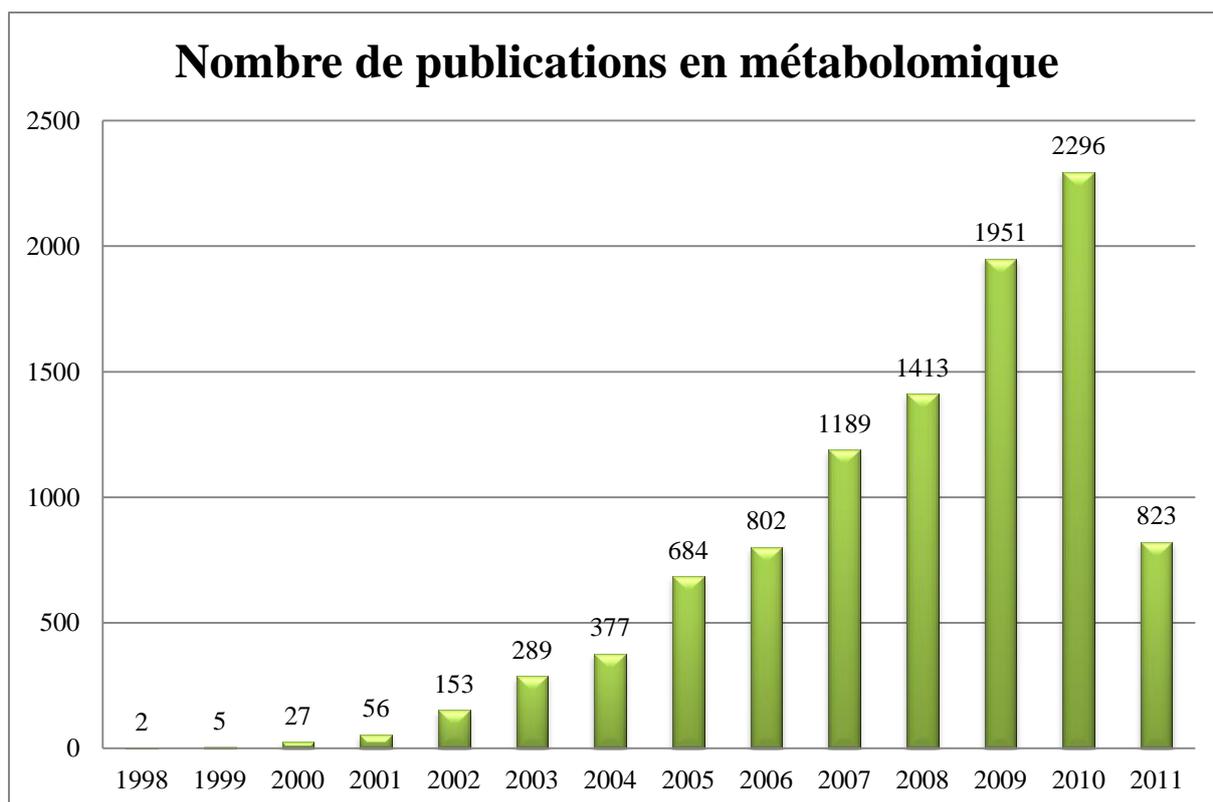


Figure 60. Nombre de publications par année consacrées à des études métabolomiques tout domaine confondu. Source SciFinder en utilisant le terme 'metabolomics' (date de consultation 25.05.2011).

I.2) Quelques définitions (Schripsema, 2010)

Dans la littérature, plusieurs termes sont utilisés pour l'analyse des métabolites. Dettmer et al. (2007) et Nicholson et Lindon (2008) ont présenté une série de définitions:

- Métabolome : Ensemble des métabolites d'un organisme.
- Métabolomique : Identification et quantification de tous les métabolites dans un système biologique.
- Métabonomique : Mesure de la réponse métabolique à un stimulus biologique ou une manipulation génétique.
- Profil métabolique : Analyse quantitative d'un jeu de métabolites d'une voie biochimique sélectionnée ou appartenant à une classe spécifique de composés. Cela inclut l'analyse ciblée et l'analyse d'un nombre limité de métabolites.
- Empreinte métabolique : Analyse globale et non biaisée dont l'objectif est de classer les échantillons par rapport à une variation dans les métabolites due à une maladie, une perturbation environnementale ou génétique dans le but suprême d'identifier des métabolites discriminants.

Ces termes sont arbitrairement définis et parfois utilisés par certains auteurs avec des sens légèrement différents. Beaucoup de publications font des empreintes métaboliques. A l'aide de méthodes analytiques rapides, ils détectent un maximum de métabolites puis ils recherchent des facteurs discriminants par des méthodes chimiométriques.

En pratique, il n'y a pas de réelles différences entre les termes métabolomique et métabonomique. Mais le terme métabonomique est traditionnellement plus utilisé dans la recherche biomédicale pour décrire l'empreinte des perturbations biochimiques causées par une maladie, des médicaments ou des toxines.

I.3) Préparation des échantillons (Verpoorte, et al., 2008)

La préparation d'échantillon est une étape primordiale des études métabolomiques, car la qualité des données, qui devront être traitées ultérieurement, en dépend dans une large mesure (Fiehn et al. 2008). Elle commence avec la culture et la récolte des plantes. Lorsque les échantillons sont collectés plusieurs paramètres sont à prendre en compte. La saison, l'année et le moment de la journée de la récolte ainsi que l'âge de la plante et les conditions environnementales sont des paramètres importants pour le métabolome. Ainsi, lorsqu'une feuille d'une plante est collectée, il est important de considérer sa position, si elle est exposée ou non aux rayons du soleil, à la pluie... Certains auteurs cultivent les plantes dans un environnement contrôlé en termes de température, humidité et lumière afin de réduire la variabilité biologique des individus.

La récolte signifie un stress et souvent une blessure pour la plante ce qui va entraîner des changements dans le métabolisme de la plante. Certains changements sont rapides, par exemple au bout de quelques minutes les glucosides s'hydrolysent. Le métabolisme des plantes doit donc être stoppé immédiatement après le prélèvement en congelant l'échantillon dans un bain d'azote liquide. Pour empêcher des changements du métabolome lors de la décongélation des échantillons deux protocoles sont préconisés. L'absence d'eau réduisant drastiquement l'activité enzymatique, la première solution est de lyophiliser les plantes. Le second protocole propose un passage au micro-onde qui détruit les enzymes (Verpoorte, et al., 2008).

Les solvants d'extraction sont sélectionnés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, en particulier leur polarité et leur sélectivité. Pour les méthodes ciblées dont l'objectif est d'analyser une classe particulière de métabolites, une extraction sélective peut

être réalisée (Hagel, et al., 2008) comme par exemple l'extraction des amidons en utilisant l'acide perchlorique ou encore l'extraction de caroténoïdes en utilisant des solvants apolaires. Une extraction sélective permet de réduire la complexité des spectres et les superpositions de signaux (Hagel, et al., 2008). Pour les analyses non ciblées le choix du solvant est souvent plus délicat. L'objectif utopique est d'extraire tous les métabolites présents dans l'échantillon. Or il n'existe pas de solvant d'extraction universel. Chaque solvant va extraire une gamme de métabolites selon sa polarité et les interactions. Il y a trois types de composés :

- les composés apolaires : la plupart de ces composés sont les terpénoïdes, les acides gras et leurs dérivés.
- les composés de polarité moyenne : la plupart de ces composés sont les métabolites secondaires. Ces composés traduisent les interactions existantes entre la plante et l'environnement (défense contre les animaux et les maladies). Ils sont souvent utilisés en phytothérapie.
- les composés polaires : la plupart de ces composés sont les métabolites primaires tels que les sucres.

Les alcools (méthanol ou éthanol) sont souvent utilisés pour une extraction non sélective. Des mélanges de solvant permettent d'extraire plus de métabolites. Les solvants les plus communs sont des mélanges de solvant polaire tels que le mélange méthanol/eau (50/50) ou acétonitrile/eau avec différents ratios selon les publications. Le mélange de deux solvants non miscibles comme par exemple un mélange chloroforme/méthanol-eau (2/1-1) permet d'extraire un grand nombre de métabolites, de réduire la complexité des spectres mais le temps d'analyse est alors plus long (Van Der Kooy, et al., 2009) (Hagel, et al., 2008). Pour des analyses RMN, l'extraction peut se faire directement dans un ou des solvants deutérés ce qui évite une étape d'évaporation de solvant non deutéré. Cependant avec un solvant deutéré, il est important d'être attentif aux échanges possibles entre les protons des composés et le deutérium du solvant. La Figure 61 montre un exemple dans lequel le stockage à 90°C dans un solvant deutéré réduit l'intensité des signaux H₆ et H₈ du spectre RMN ¹H de naringinine due à un échange des protons avec le deutérium du solvant (Verpoorte, et al., 2008).

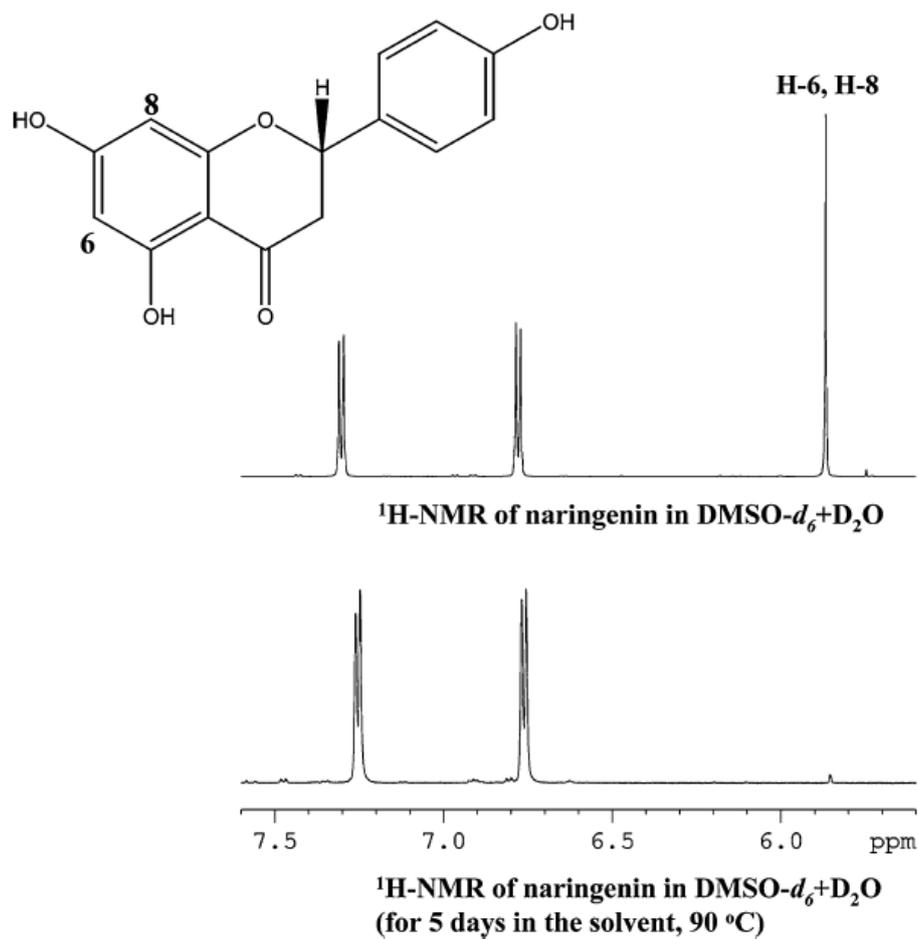


Figure 61. Structure chimique de la naringinine et les spectres RMN enregistrés dans DMSO-*d*₆/D₂O (Verpoorte, et al., 2008).

Pour éviter les variations des déplacements chimiques sur les spectres RMN causées par les variations de pH, les solvants aqueux sont tamponnés (Verpoorte, et al., 2008). Le tampon fréquemment utilisé est un tampon phosphate à pH 6. La force ionique des échantillons est également un paramètre important en RMN.

I.4) L'analyse RMN ¹H

Nous avons vu précédemment que la spectroscopie RMN est une méthode de choix pour la détermination structurale des composés. Avec l'aide des déplacements chimiques et des constantes de couplage, certains métabolites peuvent être facilement identifiés. Ne nécessitant pas de purification ni de dérivatisation des composés, la préparation des échantillons est simple ce qui permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en un temps restreint. Alors que la spectrométrie de masse est sélective de par l'ionisation, la spectroscopie RMN est un détecteur universel pour toutes les molécules contenant un proton. Par

conséquent, la spectroscopie RMN ^1H est largement employée pour des empreintes métaboliques.

Toute expérience en métabolomique demande une grande robustesse et reproductibilité des techniques analytiques. De plus, plusieurs articles proposent comme perspectives de créer des bases de données publiques pour la métabolomique (Verpoorte, et al., 2010). Il est alors nécessaire d'avoir une technique analytique reproductible sur du long terme, inter-laboratoire et donc pas forcément sur le même spectromètre. Ward et al ont démontré que pour les aspects cités ci-dessus la spectrométrie RMN ^1H est la technique à adopter. Les avantages de la spectrométrie RMN ^1H par rapport aux autres techniques utilisées en métabolomique sont résumés dans le Tableau 25.

	HPLC or TLC-UV	GC-MS	LC-MS	MS ⁿ	NMR
Sample preparation	++	–	–	+	+++
Reproducibility	–	+	–	+	+++
Absolute quantitation	–	–	–	–	+++
Relative quantitation	+	++	+	++	+++
Identity	+	++	++	++	++
Compound number	ca. 30	ca. 1000	ca. 200	ca. 1000	ca. 200
Sensitivity	+	++	++	+++	–

Tableau 25. Comparaison des méthodes analytiques couramment utilisées en métabolomique ou empreinte métabolomique. (Verpoorte, et al., 2008). La gamme de l'échelle est comprise entre «–» (pour le maximum d'inconvénients) et «+++» (pour le maximum d'avantages).

Le manque de sensibilité et la superposition des signaux sont souvent reprochés à la spectrométrie RMN. Mais avec la démocratisation des aimants supraconducteurs à plus haut champ magnétique, la généralisation des bobines de gradient de champs et plus récemment des cryosondes, la RMN a pris une grande importance pour l'analyse des métabolites. La superposition des signaux peut être diminuée en ayant recours à la spectrométrie RMN à deux dimensions et plus particulièrement à la spectrométrie RMN ^1H J résolue (J-res) grâce à son temps d'acquisition relativement court par rapport aux autres techniques à deux dimensions. Ces techniques sont plutôt réservées à l'identification des signaux inconnus. La Figure 62 montre une zone complexe d'un spectre ^1H classique d'un extrait polaire d'*Arabidopsis thaliana*. La projection provenant du spectre à deux dimensions ^1H J-res est découplée proton. Par exemple, le triplet du sucrose à 4,035 ppm apparaît alors dans la projection du spectre J-res comme un singulet. Ainsi, comme on peut le voir sur cette figure, le spectre obtenu est

moins complexe que le spectre proton classique. Cette technique est utilisée par Choi et al. pour étudier la réponse des plants de tabac à l'infection par le virus « mosaïque ». Les auteurs ont ainsi détecté l'augmentation de plusieurs composés dont l'acide 5-O-caféylquinique, des analogues de l'acide α -linoléinique et des diterpénoïdes qui doivent avoir un rôle dans la résistance de la plante (Ward, et al., 2007).

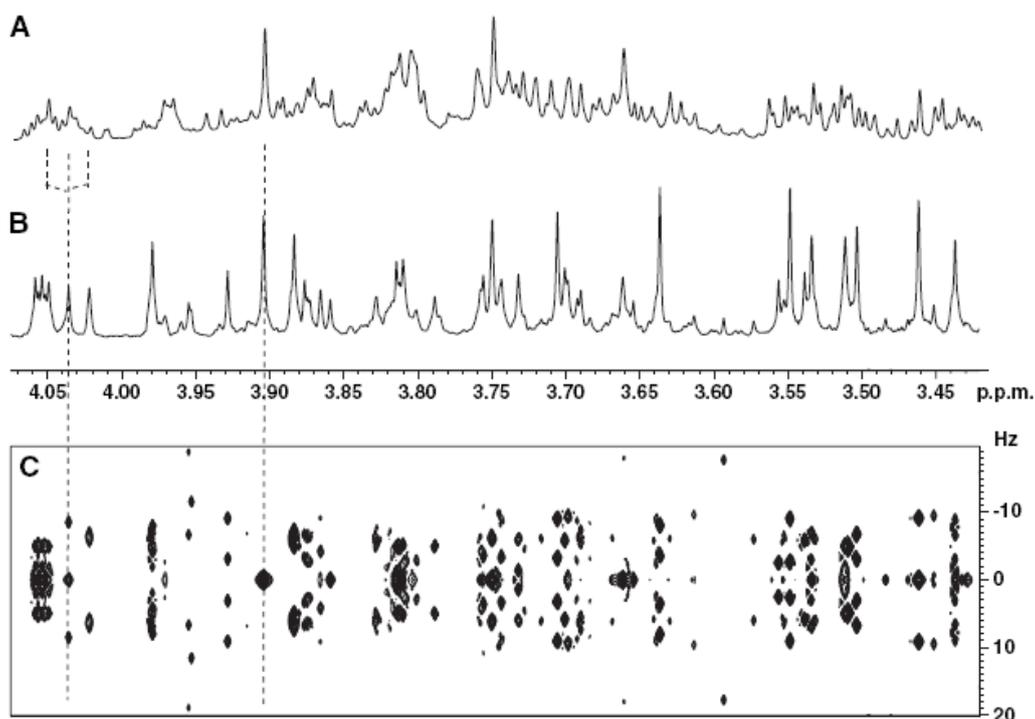


Figure 62. Spectre RMN ^1H d'une extraction $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ (8:2) de la plante *Arabidopsis thaliana* : le spectre $1\text{D}^1\text{H}$ conventionnel (A), la projection du spectre Jres 2D (B) et le spectre Jres 2D (C) (Ward, et al., 2007).

Le signal de l'eau résiduelle est souvent intense sur les spectres protons. Une technique de pré-saturation est utilisée pour supprimer ce signal. Malheureusement les intensités de signaux proches de cette région sont affectées et donc ces signaux ne pourront pas être pris en compte pour l'analyse chimométrique (Van Der Kooy, et al., 2009).

Selon la taille des molécules, des séquences spécifiques peuvent être appliquées. Par exemple, lorsque la matrice contient des macromolécules telles que les protéines, l'application d'une séquence spin-écho comme la séquence CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) diminue les résonances non désirées de ces macromolécules (Van Der Kooy, et al., 2009). Une fois la séquence choisie, elle est optimisée sur un échantillon puis les paramètres sont fixés pour l'ensemble des échantillons (Van Der Kooy, et al., 2009).

I.5) Le traitement des données

Les études métabolomiques génèrent une grande quantité de données souvent complexes à interpréter. L'extraction des informations pertinentes issues de ces données spectrales est alors réalisée à l'aide d'analyses chimiométriques, c'est-à-dire l'application d'outils statistiques à des données chimiques (Jansen, et al., 2010).

La première étape est la digitalisation des données RMN ^1H pour créer une matrice de données sur laquelle sera réalisée l'étude chimiométrique. Cette étape se nomme le « bucketing » ou réduction des données. Elle consiste à diviser le spectre en régions consécutives et non-chevauchantes appelées « buckets ». Les intensités ou les aires des signaux de chaque bucket seront les données de la matrice. La taille de la matrice de données est constituée de n lignes et p colonnes avec n qui représente le nombre d'individus (le nombre d'échantillons) caractérisés par p variables quantitatives (le nombre de buckets). Idéalement, il est préférable que les buckets soient fins pour observer les variations subtiles dans le métabolome. Cependant, à cause des légères variations des déplacements chimiques entre les spectres (malgré la température et le pH des solutions fixés), la largeur des buckets est généralement comprise entre 8 et 16 Hz (0,02 à 0,04 ppm pour un spectromètre 400MHz) (Van Der Kooy, et al., 2009) (Wolfender, et al., 2010). L'optique commune des méthodes multivariées est de présenter l'information contenue dans cette matrice de dimension importante sous forme simplifiée (graphique) (Jansen, et al., 2010).

L'analyse en composantes principales (ACP) est la technique la plus commune des analyses multivariées. Cette méthode consiste à considérer les échantillons comme étant des points dans un espace défini par des combinaisons de variables et que les coordonnées d'un individu sont données par ses valeurs pour chacune de ces variables. L'objectif de l'ACP est de décrire la variance dans un jeu de données multivariés en termes de graphique. Mathématiquement, l'ACP calcule des combinaisons linéaires des variables de départ donnant de nouveaux axes appelés composantes principales qui contiennent la plus grande partie de la variabilité de la matrice de données de départ. De plus, pour éviter d'avoir la même information dans plusieurs composantes principales, elles doivent toutes être orthogonales. L'ACP permet d'observer des groupes d'échantillon, des tendances et les individus aberrants. Une autre méthode populaire est la classification ascendante hiérarchique (HCA). La HCA est une technique de regroupement qui génère des suites de groupes emboîtés les uns dans les autres, allant du groupement individuel (chaque échantillon constitue un groupe distinct) à

celui contenant tous les échantillons. Entre ces deux extrêmes figurent de nombreux groupements plus ou moins réalistes entre lesquels l'analyste devra choisir. L'ACP et la HCA sont des méthodes non-supervisées, où aucune hypothèse n'est faite concernant des relations éventuelles entre les individus et entre les variables (Hagel, et al., 2008). Des modèles prédictifs peuvent également être construits grâce à l'utilisation d'outils supervisés comme la PLS-DA ('Partial Least Squares Discriminant Analysis') ou la plus récente O-PLS-DA ('Orthogonal-PLS-DA') (Hagel, et al., 2008). Les méthodes supervisées incorporent une variable qualitative préalablement spécifiée (par exemple : échantillon naturel ou génétiquement modifié) pour maximiser les différences entre les classes. Mathématiquement, la méthode PLS-DA repose sur la méthode PLS. La régression PLS produit itérativement une série de facteurs deux à deux orthogonaux. Ces axes factoriels sont calculés de manière à maximiser la covariance entre la variable qualitative et les variables quantitatives. Parallèlement aux graphes des échantillons, appelés score plots, des graphes contenant les variables sont générés : le loading plot, le VIP et le graphique des coefficients de la PLS-DA. Le loading plot est la représentation graphique des variables. Le graphique des VIP est un résumé des variables les plus discriminantes pour le modèle généré et le graphique des coefficients de la PLS-DA montre directement quelles sont les variables les plus discriminantes (Mannina, et al., 2010).

I.6) Les domaines d'application

La qualité des extraits de plantes peut dépendre de plusieurs facteurs tels que l'espèce, l'origine ou encore le stade de développement de la plante. L'empreinte métabolique peut alors être utilisée pour réaliser un suivi qualité sur les fruits, les extraits de plantes etc.

Ci-dessous sont présentés de façon non exhaustive des exemples extraits de la littérature qui est très riche dans ce domaine :

- Discrimination selon les espèces

Le maté ou Chimarrão est une infusion consommée en Amérique du sud aussi communément que le café ou le thé en Europe. La plante utilisée pour cette infusion est *Ilex Paraguariensis*. Malheureusement d'autres espèces d'*Ilex* sont utilisées comme adultérants dans les productions commerciales de maté. Kim et al ont utilisé l'empreinte métabolique par RMN ^1H pour discriminer 11 espèces d'*Ilex* (*Ilex Argentina*, *Ilex Brasiliensis*, *Ilex Brevicuspis*, *Ilex Dumosa* var. *Dumosa*, *Ilex Dumosa* var. *Guaranina*, *Ilex Integerrima*, *Ilex*

Microdonta, *Ilex Paraguariensis* var. *Paraguariensis*, *Ilex Pseudobuxus*, *Ilex Taubertiana*, et *Ilex Theezans*) et trouver des métabolites discriminants. La théobromine et la caféine sont uniquement présentes dans *Ilex Paraguariensis* alors que l'arbutine est spécifique aux autres espèces (Kim, et al., 2010).

- Discrimination selon l'origine géographique

L'huile d'olive de Ligurie a une importante valeur commerciale caractérisée par la douceur de son goût contrairement aux autres huiles d'olive italiennes venant de Toscane et de la région des Pouilles qui ont un goût fort et fruité. Mannina et al ont montré une possible traçabilité de l'huile d'olive selon son origine géographique par la RMN métabolomique. Ils ont ainsi mis en évidence plusieurs métabolites discriminants. Par comparaison de ces huiles, les auteurs ont montré que l'huile d'olive de Ligurie a généralement plus de terpènes et d'hexanal mais elle contient une plus faible quantité d'acides saturés et de β -sistérol (Mannina, et al., 2010).

- Discrimination selon le stade de développement

Shuib et al ont montré que l'empreinte métabolomique RMN ^1H permettait de différencier les feuilles jeunes des matures de *Melicope Ptelefolia*. Les jeunes feuilles de cette plante sont largement utilisées dans le « Ulam » un plat typique de la Malaisie. Les analyses révèlent que les jeunes feuilles sont riches en acides gras, acide p-O-géranylcoumarique, 2,4,6-trihydroxy-3-géranylacétophénone alors que les feuilles matures contiennent davantage de sucres et de composés glycosidiques (Shuib, et al., 2011).

- Réponse de la plante soumise à différents stress environnementaux

Les plantes sont constamment soumises à de nombreux facteurs de stress durant leur existence. Les hautes et basses températures, les périodes de sécheresse ou d'inondation, le stress oxydatif, la pollution, les attaques par divers organismes allant des pathogènes aux insectes et mammifères herbivores sont autant de défis qu'elles doivent relever pour assurer leur survie. La réponse à différents types de stress a depuis quelques années été abordée par des approches métabolomiques. Ahuja et al ont récemment publié un article de revue sur le sujet (Ahuja, et al., 2010). Le tableau ci-dessous montre différents exemples d'application en métabolomique dans ce domaine. L'adaptation de la plante soumise à différents stress environnementaux se traduit par une augmentation ou une diminution de certains métabolites comme décrit dans ce tableau :

Plant	Plant parts	Metabolites	Levels	Refs
Drought				
<i>Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)</i> wt and mutants (<i>alx8</i> , <i>fry1-1</i> , <i>nc3-2</i> , <i>msi-cs</i>)	Leaves, aerial parts	ABA, amino acids, carbohydrate derivatives, organic acids, polyamine putrescine, sugar metabolites, carbon metabolites (starch, hexoses, sucrose, fumarate, malate, proline and total amino acids)	Accumulated/increased	[38,50,54,92]
Wheat (<i>Triticum aestivum</i> and <i>Aegilops</i>)	Seedlings, leaves, mature grains	ABA, fumaric acid, proline	Accumulated/increased/higher	[11,49]
Maize (<i>Zea mays</i>)	Xylem sap	ABA, phaseic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, 6-benzylaminopurine	Increased	[33]
Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Leaves	trans-zeatin, trans-zeatin riboside, ferulic acid	Decreased	[33]
		Proline, free amino acids, total and reducing sugars, polyphenol contents	Increased	[93]
Pea (<i>Pisum sativum</i>)	Leaf	Chlorophylls, carotenoids, protein, starch	Decreased	[93]
Transgenic P _{SARK} -IPT (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Leaf	Proline, valine, threonine, homoserine, myoinositol, aminobutyrate, trigonelline (nicotinic acid betaine)	Higher	[39]
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Nodules	Glycerate	Increased	[94]
<i>Brassica (Brassica napus)</i>	Leaf	Succinate, sucrose, chlorophylls, carotenoids, oxidised lipids, ABA	Accumulated	[57]
		ABA	Highest	[95]
Black poplar (<i>Populus nigra</i>)	Saplings	Isoprene	Decreased	[58]
C ₄ grasses (<i>Cynodon dactylon</i> and <i>Zoysia japonica</i>)	Leaves	5-hydroxyvaline	Increased	[48]
Elevated temperature				
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)	Seedlings	Chicoric acid, chlorogenic acid	Increased	[43]
St. John's wort (<i>Hypericum perforatum</i>)	Shoots, flowers, flower buds	Quercetin-3-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoside	Accumulated	[43]
		Secondary metabolites (hyperforin, pseudohypericin and hypericin)	Increased	[34]
<i>Arabidopsis</i> and rice	Seedlings	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidic acid	Accumulated	[25]
Salinity				
Maize (<i>Z. mays</i>)	Leaf blade	Polyamines (apoplastic spermine and spermidine)	Increased	[69]
<i>Brassica oleracea</i>	Leaves, roots	Fatty acids (linoleic, linolenic and stigmaterol), aquaporins of PIP1 and PIP2 subfamilies, glucosinolates	Increased	[68]
		Fatty acids (palmitoleic, oleic and sitosterol)	Decreased	[68]
Elevated [CO₂]				
<i>Arabidopsis</i>	Leaves	Starch, glucose, galactose, maltose, malic acid, histidine, tryptophan, phenylalanine	Increased	[19]
<i>B. napus</i>	Leaves	other amino acids	Decreased	[19]
		Chlorophyll a, chlorophyll b	Higher	[95]
Cassava (<i>Manihot esculenta</i>)	Leaves	ABA, indolic glucosinolate	Decreased	[95,96]
Maritime (<i>Plantago maritima</i>)	Foliage, roots	Cyanogenic glycosides	Increased	[97]
Sugarcane (<i>Saccharum</i> ssp.)	Leaves	Caffeic acid, p-coumaric acid, verbascoside	Increased	[37]
Soybean (<i>Glycine max</i>)	Leaves	Sucrose	Increased	[98]
Soybean (<i>Glycine max</i>)	Leaves	Hexose, sucrose, starch, ureides, amino acids	Increased	[36]
Multiple environmental stresses				
<i>Arabidopsis</i>	Leaf	Cuticular lipids	Increased	[99]
<i>B. napus</i>	Leaf	Chlorophylls a and b, carotenoids, ABA	Increased	[95]
<i>Arabidopsis (lew1)</i>	Seedlings	Dolichol	Reduced	[22]

Tableau 26. Les résultats des différentes études métabolomiques sur la réponse des plantes à différents stress (Ahuja, et al., 2010)

Quelques exemples supplémentaires plus récents sont présentés ici :

- Pollution

L'industrialisation, l'utilisation de nombreux insecticides ou pesticides peuvent polluer les sols par des métaux lourds tels que le cadmium. Ce métal peut être facilement assimilé par les plantes. Hédiji et al ont étudié par RMN métabolomique l'effet de l'exposition à long terme de cadmium sur des plantations de tomates. Leurs résultats montrent une claire séparation entre les échantillons traités et les échantillons contrôles. Les feuilles de tomates traitées au cadmium ont un taux élevé d' α -tocophérol, d'asparagine et de tyrosine mais ont une concentration plus faible en proline que les feuilles non traitées (Hédiji, et al., 2010). Les effets phytotoxiques des polluants ne sont pas toujours observables au niveau

macroscopique. L’empreinte métabolique par RMN est une méthode potentielle pour enquêter sur l’effet toxicologique des xénobiotiques, comprendre leur interaction avec les plantes et à terme trouver des alternatives (Aliferis, et al., 2009).

- Pathogène

L’esca est une maladie qui cause des dommages importants à la vigne. Cette maladie est provoquée par la combinaison de plusieurs champignons pathogènes antagonistes. Fréquemment, la maladie est détectée uniquement lorsque les symptômes extérieurs apparaissent en particulier dans les feuilles. Cependant les plantes peuvent être infectées pendant de longues périodes avant que les symptômes externes deviennent visibles. Malgré l’importance économique de la viticulture et les effets négatifs des maladies de la vigne, leurs mécanismes de défense contre les agents pathogènes sont encore mal compris. Lima et al ont étudié par RMN métabolomique l’effet de cette maladie sur des vignes (*Vitis. Vinifera cv. Alvarinho*) afin d’identifier des métabolites discriminants les feuilles saines et les feuilles malades. L’étude a révélé une augmentation significative des composés phénoliques chez les feuilles malades par rapport aux feuilles saines, accompagnée d’une diminution en glucides ce qui suggère que la plante favorise la synthèse de métabolites secondaires à la synthèse de métabolites primaires. L’étude des métabolites permet de mieux comprendre le fonctionnement de la plante face à la maladie et devrait aider à en limiter les dégâts (Lima, et al., 2010).

- Les organismes génétiquement modifiés

Les organismes génétiquement modifiés améliorent la résistance des plantes aux pesticides, aux insectes... De ce fait, ils sont largement cultivés depuis 1996 (Ren, et al., 2009). Le nombre de variétés commercialisées augmente rapidement. Les produits végétaux issus de plantes transgéniques arrivent sur le marché mondial du fait des échanges internationaux. La question se pose de savoir quels sont les risques encourus. La problématique des cultures transgéniques est caractérisée par une importante controverse scientifique. Pour certains, les cultures transgéniques ne représentent pas de danger mais une solution pour améliorer l’agriculture et éradiquer la faim dans le monde. D’autres mettent en garde contre les risques des OGM tels que les pertes de patrimoine génétique (la FAO estime que depuis 1900, 75 % de la diversité génétique des cultures agricoles a disparu), l’uniformisation des espèces cultivées (qui nous rend plus vulnérable aux pathogènes), la

mutation des gènes avec des effets nocifs et le transfert du gène résistant aux insectes ravageurs plus tous les effets sur la santé de l'homme (FAO, 2003).

Ren et al. proposent d'utiliser l'empreinte métabolique par RMN pour discriminer les plantes d'*Arabidopsis* transgéniques et non transgéniques. Ils ont montré que les plantes transgéniques se différencient des plantes sauvages par certains acides aminés. En effet leurs résultats montrent que la thréonine et l'alanine sont présentes en plus grande quantité chez les plantes d'*Arabidopsis* transgéniques que chez les plantes d'*Arabidopsis* non transgéniques (Ren, et al., 2009).

II) Evaluation de la qualité du *Magnolia officinalis cortex* par une analyse RMN métabolomique.

Le *Magnoliae officinalis Cortex* est utilisé depuis plus de 2000 ans dans la médecine traditionnelle chinoise pour le traitement de vomissement, diarrhée, constipation, toux, dépression... La composition des phytomédicaments est complexe, par conséquent le contrôle qualité est souvent restreint à quelques composés. Dans le cas du *Magnoliae officinalis Cortex*, le contrôle qualité peut être réalisé par une analyse de deux composés phénoliques, le magnolol et l'honokiol, par CCM ou HPLC (Pharmacopoeia, 2005) (Huang, et al., 2005) (Maruyama, et al., 2002).

L'empreinte métabolique par RMN ^1H constitue un excellent outil pour le contrôle qualité des médicaments à base de plantes. Dans cette étude, nous avons analysé différents extraits de *Magnoliae officinalis Cortex* par RMN ^1H combinée à l'approche statistique pour discriminer les extraits selon la variété de l'espèce (*Magnoliae officinalis* et *Magnoliae officinalis var. biloba*), la partie de la plante (tige, branche et racine) ou encore selon son origine géographique (différentes régions de Chine).

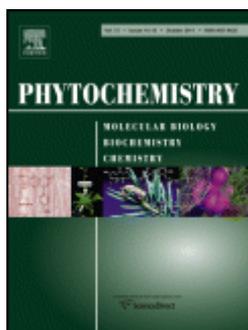
Après avoir éliminé les individus aberrants à l'aide d'une analyse ACP, une première classification a été observée par une analyse HCA puis confirmée par une analyse PLS-DA. Les résultats montrent que l'honokiol et le magnolol sont des métabolites discriminants. Ces deux composés ont également été quantifiés par HPLC. Les données obtenues ont été couplées avec les données RMN à l'aide du logiciel mixOmics. Les résultats révèlent une bonne corrélation entre les deux jeux de données. L'analyse de l'honokiol et du magnolol pour réaliser un contrôle qualité est donc un choix judicieux. Une analyse PLS-DA a été réalisée sur les lots afin de les discriminer selon l'origine géographique mais les résultats ne montrent pas de séparation concluante selon ce critère.

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication :

Publication 3 :

**Quality analysis of *Magnoliae officinalis* by ^1H NMR based metabolomics
and HPLC methods.**

Publication acceptée dans le journal Phytochemical Analysis.



Quality Assessment of Commercial *Magnoliae officinalis* Cortex by $^1\text{H-NMR}$ -based Metabolomics and HPLC Methods

Yong Jiang,^{a*} Julie Vaysse,^c Véronique Gilard,^c Stéphane Balayssac,^c Sébastien Déjean,^d Myriam Malet-Martino,^{c*} Bruno David,^b Christel Fiorini^b and Yves Barbin^b

ABSTRACT:

Introduction – The quality control of *Magnoliae officinalis* Cortex, a commonly used traditional Chinese medicine, is currently based on the assay of the two active compounds, honokiol and magnolol, by TLC or HPLC.

Objective – To compare $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics with the HPLC method for controlling the quality of *Magnoliae officinalis* Cortex. To identify the metabolites contributing to the differences between the samples and to discriminate different medicinal parts and geographic origins of these samples by $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics.

Methodology – $^1\text{H-NMR}$ and several multivariate analysis techniques were applied to analyse the extracts of 18 batches of *Magnoliae officinalis* Cortex commercial samples, and the contents of honokiol and magnolol in these samples were determined by HPLC. The correlation analysis between the data from $^1\text{H-NMR}$ and HPLC was performed with the mixOmics software based on an unsupervised method.

Results – Honokiol and magnolol were the main compounds responsible for the discrimination of samples from different batches, thus proving that the choice of these two compounds as markers for quality assessment by HPLC is relevant. The two sources of *Magnoliae officinalis* Cortex recorded in the Chinese Pharmacopoeia, *Magnolia officinalis* and *Magnolia officinalis* var. *biloba*, could be differentiated from $^1\text{H-NMR}$ data, but the pattern recognition analysis by PLS-DA was unsuccessful in discriminating samples from various geographical origins.

Conclusion – The combination of $^1\text{H-NMR}$ that gives a comprehensive profile of the metabolites and HPLC that targets two biomarkers is an efficient means for a better quality control of *Magnoliae officinalis* Cortex. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: $^1\text{H-NMR}$; HPLC; metabolomics; quality control; *Magnoliae officinalis* Cortex

INTRODUCTION

The quality of traditional Chinese medicines (TCMs) and other herbal drugs is still an appealing analytical challenge owing to their complex chemical constitution. Chromatographic methods (thin layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography) are primarily used for the quality assessment of TCMs (Jiang *et al.*, 2010). In general, the analysis targets one or two biomarkers useful for identifying and authenticating the herbal products. However, this approach does not provide information on the overall chemical composition of the plant extract, which is known to vary widely according to geographical origin, source, cultivar condition, harvesting and processing methods, storage, etc. In recent years, the coupling of proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) and multivariate statistical analysis has led to the development of a metabolomics approach in the field of quality control of herbal medicines and food products (Pauli *et al.*, 2005; Gilard *et al.*, 2010). It has been applied successfully to the chemotaxonomical analyses of different *Ilex* (Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010), *Ephedra* (Kim *et al.*, 2005) and *Echinacea* (Frédérich *et al.*, 2010) species, the quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Tarachiwin *et al.*, 2008) and chamomile flowers (Wang *et al.*, 2004), the

discrimination of ginseng roots of different ages or origins (Yang *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2009), of *Cannabis sativa* from different cultivars (Choi *et al.*, 2004), of

* Correspondence to: Yong Jiang, State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing, 100191, China. E-mail: yongjiang@bjmu.edu.cn

Myriam Malet-Martino, Université de Toulouse; UPS; Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), Groupe de RMN Biomédicale; 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France. E-mail: martino@chimie.ups-tlse.fr

^a State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing, 100191, China

^b Pôle Actifs Végétaux, Branche Sourcing R&D et Botanique, Institut de Recherche Pierre Fabre, 3 Avenue Hubert Curien, 31035 Toulouse cedex 1, France

^c Université de Toulouse; UPS; Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), Groupe de RMN Biomédicale; 118 route de Narbonne, 31062, Toulouse cedex 9, France

^d Institut de Mathématiques de Toulouse, UMR 5219, Université de Toulouse, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France

concentrated tomato pastes from different geographical regions (Consonni *et al.*, 2009), and of commercially available feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) samples from different suppliers (Bailey *et al.*, 2002).

Principal component analysis (PCA) was until recently the statistical tool most commonly used in plant metabolomics (Bailey *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004, 2005; Wang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2009; Frédérick *et al.*, 2010). It is an unsupervised clustering method requiring no prior knowledge of the data set that condenses the multivariate data into a reduced number of variables called principal components that describe the greatest amount of variance. Principal component analysis is very useful for outlier detection and for finding patterns and trends. This first overview can be also completed by performing hierarchical clustering analysis (HCA), another unsupervised clustering statistical approach that highlights homogeneous patterns of samples or metabolites (Kim *et al.*, 2010). However, these unsupervised methods cannot assign the class membership of unknown test samples. So, the current trend is the treatment of data using supervised methods, such as partial least squares projections to latent structures (PLS) or orthogonal projection to latent structures (OPLS) discriminant analysis (DA) (Chen *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008b; Tarachiwin *et al.*, 2008; Consonni *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). PLS-DA correlates NMR data with certain properties, such as classes of the samples (from country 1 or country 2 for instance). OPLS-DA is similar to PLS-DA but with an orthogonal signal correction (OSC) filter to limit the impact of NMR data variation that is unrelated to sample class (e.g. age of the plant).

Magnoliae officinalis Cortex (Houpo) is the dried stem bark, root bark or branch bark of *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. or *Magnolia officinalis* var. *biloba* Rehd. et Wils. (Magnoliaceae). It has been used as a TCM for more than 2000 yr for the treatment of epigastric stuffiness, vomiting and diarrhea, abdominal distention and constipation, cough and dyspnea, etc. (Chinese Pharmacopoeia Committee, 2005). The quality control of this herbal medicine is currently based on the assay of two active biphenolic compounds, namely magnolol (M) and honokiol (H) by TLC or HPLC (Chinese Pharmacopoeia Committee, 2005; Huang *et al.*, 2005). In the present study, a metabolomics approach combining ¹H-NMR and several statistical tools such as PCA, HCA, PLS-DA as well as statistical total correlation spectroscopy (STOCSY; Cloarec *et al.*, 2005) aiding in signal identification, was developed for discriminating different varieties, medicinal parts and geographical origins of commercial samples of *Magnoliae officinalis* Cortex and identifying the metabolites underlying the differences between groups.

EXPERIMENTAL

Plant material, solvents and chemicals

All plant samples were purchased from commercial crude drug companies, and information on their sources and habitats was supplied by the vendor. The samples were authenticated by Professor I. Fourasté (Faculty of Pharmacy, Toulouse, France). Voucher specimens were preserved in the Laboratoire des Produits Végétaux of the Pierre Fabre Research Institute. Specifications of plant materials evaluated in this study are shown in Table 1.

Methanol and acetonitrile were purchased from Carlo Erba Réactifs SDS (Val de Reuil, France) and acetic acid 100% from VWR International (France). CD₃OD (99.8%) was obtained from Euriso-top (France). Honokiol was from ChromaDex (Irvine, CA). Magnolol and 2,2,3,3-d₄-3-(trimethylsilyl) propionic acid sodium salt (TSP), the internal ¹H-NMR reference used for two-dimensional diffusion ordered spectroscopy (DOSY) ¹H-NMR experiments, were from Sigma (St Louis, MO).

Sample extraction for NMR

Powdered crude plant material (300.0 mg) was sonicated for 30 min after addition of 5 mL of methanol. The mixture was filtered, and the filtrate was evaporated to dryness under vacuo. One millilitre of CD₃OD was then added.

Sample extraction for HPLC

Powdered crude plant material (500.0 mg) suspended in 80 mL of methanol was heated at reflux for 30 min. After cooling, the solution was diluted to 100.0 mL with methanol. Before injection into the HPLC column, the solution was filtered through a nylon membrane filter (nominal pore size 0.45 µm).

NMR spectroscopy

¹H-NMR spectra of the extracts from the 18 batches of *Magnoliae officinalis* Cortex were recorded in triplicate at 302 K on a Bruker Avance II 500 NMR instrument operating at a proton NMR frequency of 500.13 MHz and equipped with a 5-mm dual ¹H-¹³C TCI cryoprobe. For each sample, 128 scans were collected into 64 k data points over a spectral width of 7500 Hz (15 ppm), a pulse width of 3.4 µs (flip angle ≈ 30°) and a relaxation delay of 10 s. Flame ionisation detectors (FIDs) were processed using the Bruker TopSpin software 2.1 with one level of zero-filling and a line broadening of 0.2 Hz. Spectra were referenced to the signal of CHD₂OD at δ 3.31 ppm.

Two-dimensional DOSY ¹H-NMR experiments were performed at 298 K. Stimulated echo bipolar gradient pulse experiments were used with a pulse field gradient length of 1.55 ms, a delay of 2 ms after each gradient and a diffusion delay of 100 ms. Sequence parameters were optimised in order to have the intensity of the main signals of the spectrum in the aromatic region strongly decreased (at least divided by 50) at 95% of the full gradient strength. The longitudinal eddy current delay was 20 ms, and spoiler gradients were 1 ms long with a field strength of -7.92 and -6.09 G/cm. The other acquisition parameters were the same as those reported above for one-dimensional ¹H-NMR except 32 k data points for acquisition and 2 s for the relaxation delay. Forty experiments were recorded with gradient intensity linearly sampled from 5 to 95%. The gradient system had been calibrated to 46.25 G/cm at maximum intensity.

The two-dimensional DOSY ¹H-NMR data were processed using the Gifa 5.2 software (NMRTEC, Illkirch-Graffenstaden, France) with the inverse Laplace transform method using the maximum entropy (MaxEnt) algorithm. The processing parameters were 2048 points along the Laplace spectrum diffusion axis and 40000 MaxEnt iterations. The inverse Laplace transform was computed only on the columns presenting a signal 32 times greater than the noise level of the experiment. The DOSY spectra

Table 1. Commercial samples of *Magnoliae officinalis* Cortex analysed in this study and contents of honokiol and magnolol measured by HPLC

Number	Name	Part	Habitat	Honokiol (mg/g)	Magnolol (mg/g)	Sum of honokiol and magnolol ^a (mg/g)
5794	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Mianyang, Sichuan	6.05	9.34	15.39 (1.54%)
5795	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Yinshan, Hubei	0.08	0.05	0.13 (0.01%)
5796	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Hanzhong, Shaanxi	2.69	4.54	7.23 (0.72%)
5797	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Sichuan	0.70	5.99	6.69 (0.67%)
5798	<i>Magnolia officinalis</i> var. <i>biloba</i>	Stem bark	Zhejiang	3.18	25.13	28.31 (2.83%)
5800	<i>Magnolia officinalis</i> var. <i>biloba</i>	Stem bark	Anhua, Hunan	13.12	18.97	32.09 (3.21%)
5801	<i>Magnolia officinalis</i> var. <i>biloba</i>	Stem bark	Ruanlin, Hunan	18.37	31.94	50.31 (5.03%)
5802	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Huaihua, Hunan	4.60	5.85	10.45 (1.05%)
5803	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Xupu, Hunan	2.40	25.10	27.50 (2.75%)
5804	<i>Magnolia officinalis</i>	Branch bark	Xupu, Hunan	6.64	24.00	30.64 (3.06%)
5807	<i>Magnolia officinalis</i>	Root bark	Yuanling, Hunan	96.51	90.52	187.03 (18.70%)
5808	<i>Magnolia officinalis</i>	Root bark	Xiangxi, Hunan	87.56	91.91	179.47 (17.95%)
5809	<i>Magnolia officinalis</i> var. <i>biloba</i>	Stem bark	Jingzhou, Hubei	8.80	17.94	26.74 (2.67%)
5810	<i>Magnolia officinalis</i> var. <i>biloba</i>	Stem bark	District Nan, Hunan	3.37	9.37	12.74 (1.27%)
5811	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Sichuan	29.68	22.92	52.60 (5.26%)
5812	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Zhejiang	35.28	14.83	50.11 (5.01%)
5813	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Enshi, Hubei	0.07	0.84	0.91 (0.09%)
5814	<i>Magnolia officinalis</i>	Stem bark	Shuangpai, Hunan	0.38	0.25	0.63 (0.06%)

^aThe value in brackets corresponds to the percentage of the sum of honokiol and magnolol in the plant.

are presented with chemical shifts on the horizontal axis and diffusion coefficients expressed in $\mu\text{m}^2/\text{s}$ on the vertical axis.

Chemometric analysis of the data

Each NMR spectrum was transferred to the KnowItAll[®] software (Bio-Rad) where baseline correction was performed. Spectra were segmented with the variable size intelligent bucketing tool included in the KnowItAll[®] package, with bucket sizes ranging from 0.01 to 0.14 ppm. The NMR spectral regions containing water (δ 4.95–4.53 ppm) and methanol (δ 3.35–3.30 ppm) were removed. A total of 67 variables were considered for statistical analysis. Each spectrum was normalised to the sum of all integrals. Data were preprocessed by mean-centring, and the unit variance (UV) scaling method was applied prior to analysis.

Principal components analyses and PLS-DA were performed with the SIMCA-P+ 12.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden) and an in-house package developed with the R software (R Development Core Team, 2010) was used for HCA. The predictive ability of the PLS-DA models was assessed from the values of Q^2 , R^2Y and R^2X parameters. The statistical significance of R^2Y and Q^2 parameters was also estimated through response permutation testing where the Y matrix was 999 times randomly permuted when the X matrix was fixed. Finally, a p value was generated from a cross-validated analysis of variance (CV-ANOVA). For the identification of discriminating variables, loading plot, coefficient plot and variable importance in the projection (VIP) were used. STOCYSY was employed for aiding in the identification of markers (Cloarec *et al.*, 2005). A combined analysis of NMR and HPLC data sets was performed using the R package mixOmics (Cao *et al.*, 2009), and a PLS-like algorithm was applied. A graphical output (loading plot) similar to PCA and a relevance network were produced to make the interpretation easier.

HPLC analysis

A Waters HPLC system equipped with a 600 controller, a 600 quaternary pump, a 717 plus autosampler, and a 996 photodiode array detector (Waters, Milford, MA) was used for the assay of honokiol and magnolol. The column was a Waters symmetry C_{18} -column (250×4.6 mm i.d., $5 \mu\text{m}$) with a Lichrospher 100 RP-18 guard column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.5% acetic acid aqueous solution (60:40), and the flow rate was 1.2 mL/min. The detected wavelength was set at 290 nm. The injection volume was 10 μL .

RESULTS AND DISCUSSION

¹H and two-dimensional DOSY ¹H-NMR spectra

Figure 1 shows the ¹H-NMR spectra of three representative commercial samples of *Magnoliae officinalis* Cortex (5795, 5800, and 5807). The signals at δ 4.88 and 3.31 ppm correspond to those of residual H₂O in the sample and of CHD₂OD. The assignment of honokiol and magnolol signals was achieved by adding pure standard compounds to the extract solutions. Several signals from fatty acids (FA) were observed. Obvious differences between batches can be observed. For example honokiol and magnolol are the main constituents of the root bark sample of 5807 (Fig. 1C), whereas these two compounds are almost undetected in sample 5795 (Fig. 1A).

Two-dimensional DOSY ¹H-NMR spectra were recorded on two representative samples (5796 and 5808). They are presented in Fig. 2 with their corresponding one-dimensional ¹H-NMR spectrum. The DOSY method allows measuring the translational self-diffusion of molecules in a solution. Based on the analysis of mono- and multi-exponential decays, spectra of mixture components can be separated depending on the values of their

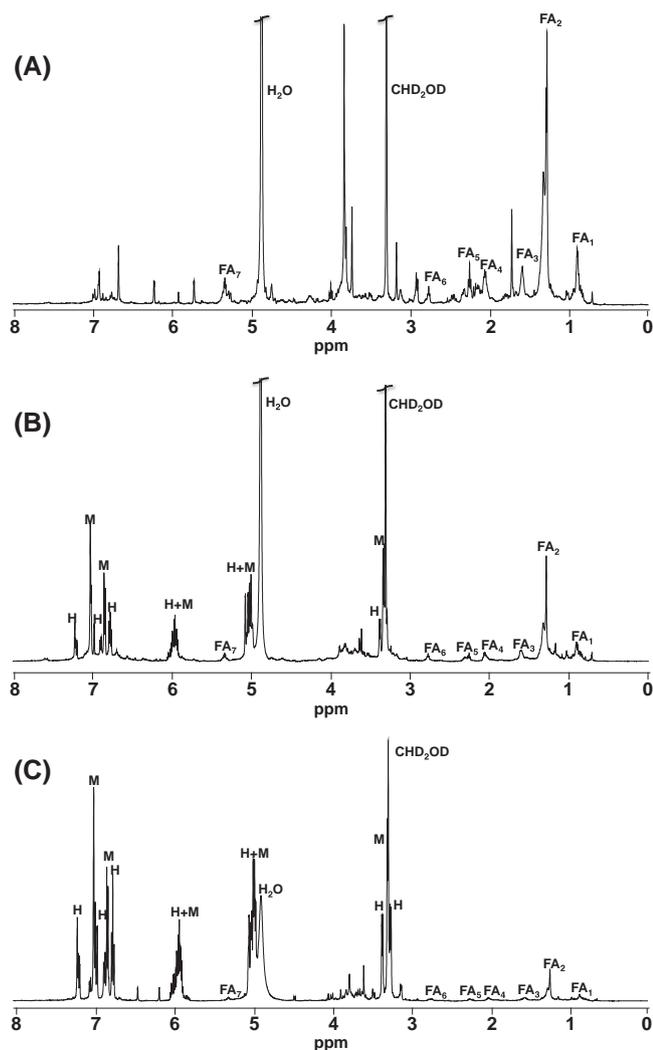


Figure 1. Representative ^1H NMR spectra of extracts from three representative commercial samples of *Magnoliae officinalis* Cortex: samples (A) 5795, (B) 5800 and (C) 5807. H: honokiol, M: magnolol, FA: fatty acids (FA₁: $-\text{CH}_3$; FA₂: $-(\text{CH}_2)_n-$; FA₃: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$; FA₄: $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$; FA₅: $-\text{CH}_2-\text{COO}-$; FA₆: $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$; FA₇: $-\text{CH}=\text{}$).

apparent diffusion coefficients (D). The value of D generally decreases as the molecular weight increases. All the peaks of a same compound are lined up, which allows more accurate identification of various components in a complex mixture. Protons of residual H_2O and CHD_2OD are detected in the upper parts of both DOSY spectra with $D \approx 1900 \mu\text{m}^2/\text{s}$. The signals from honokiol and magnolol that have the same molecular weight ($266.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) are aligned at $D = 711 \pm 34 \mu\text{m}^2/\text{s}$. In the DOSY spectrum of sample 5808 (Fig. 2B), the main signals arise from honokiol and magnolol, whereas most of the signals of the aromatic region in the spectrum of sample 5796 (Fig. 2A) are those of an unknown compound with a lower D ($429 \pm 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$) than that of honokiol and magnolol. These two samples also differ in their FA contents: sample 5796 contains FA of various molecular weights with D ranging from $708 \pm 17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ to $448 \pm 17 \mu\text{m}^2/\text{s}$, while in sample 5808, FA content is lower with only some FA signals at $D \approx 501 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Two-dimensional DOSY ^1H -NMR is an interesting tool for a preliminary analysis of plant extracts as it gives a comprehensive overview of their chemical

composition. In the field of plant analysis, two-dimensional DOSY ^1H -NMR has been used for the analysis of complex vegetable food matrixes such as lettuce (Sobolev *et al.*, 2005), mango juice (Duarte *et al.*, 2005), and black tea infusions of *Camellia sinensis* leaves (Balayssac *et al.*, 2009; Couzinet-Mossion *et al.*, 2010), for the differentiation of ginseng roots from various origins (Kang *et al.*, 2008a), and for the characterisation of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea* (Rodrigues *et al.*, 2009). The main advantage of this technique is to provide both comprehensive information on the chemical composition of the sample and a virtual separation of the components of the mixture.

Multivariate statistical analyses of ^1H -NMR data

An unsupervised approach by PCA was first applied to the ^1H -NMR data set. The results showed that sample 5796 was an outlier (data not shown). It has thus been excluded for further statistical treatment. Although the PCA score plot gives some clues for grouping, it is not the purpose of the method. So, HCA was performed on both NMR variables (Fig. 3, dendrogram on top) and samples (Fig. 3, dendrogram on the left). Results are jointly presented around a cluster image map (Fig. 3) commonly used to deal with data from microarray experiments (Eisen *et al.*, 1998). Rows and columns are reordered according to some hierarchical clustering method to identify interesting patterns. The left dendrogram allows separating the root bark samples 5807 and 5808 from the other stem bark and branch bark samples. The top dendrogram demonstrates that this separation is caused by an atypical content, particularly in honokiol and magnolol. Moreover, the left dendrogram shows that the remaining samples are divided into two groups (green and blue, Fig. 3).

A PLS-DA on these two groups shows a clear separation (Fig. 4A). The PLS-DA model was quite good (Q^2 0.95, R^2X 0.67, R^2Y 0.98) as values close to 1 for both R^2Y and Q^2 indicate a very good model with an excellent predictive power. The significance of the PLS-DA model was also established through (i) the CV-ANOVA test that led to a highly significant p value of 1.5×10^{-19} and (ii) the response permutation test. For the latter, the separation was subjected to 'Y-scrambling' statistical validation to test the possibility of chance correlation. We randomly permuted the Y variable 999 times, re-built the statistical model, and observed the trend of the predictive power and the fitness at each step. Figure 4B shows that the separation model is statistically sound, and that its high predictability is not due to overfitting of the data.

After analysis of the coefficient plot and the VIP of the PLS-DA, only seven variables were found to carry the class separation: two multiplets (m) in the low field region from both honokiol and magnolol (δ 6.02–5.92 and 5.09–4.97 ppm), two multiplets and one doublet from magnolol (δ 7.05–6.99; 6.87–6.82; 3.33 ppm, d, $J = 6.6$ Hz), one doublet from honokiol (δ 3.28 ppm, d, $J = 6.6$ Hz) and one unassigned singlet at δ 3.61 ppm. We also performed a STOCSY analysis on all samples except the outlier 5796 and the root bark samples 5807 and 5808 (Fig. 5). STOCSY is useful for determining relationships between signals as well as for structural assignment of individual molecules in complex mixtures. It shows the modelled correlation as NMR lines, enabling straightforward interpretation of the variable contributions (Cloarec *et al.*, 2005). The STOCSY plots were correlated to the resonance of honokiol at δ 7.22 ppm (m) (Fig. 5A) or to the signal of magnolol at δ 6.85 ppm (d) (Fig. 5B). High correlations (red or orange lines; $r > 0.873$) were observed with other

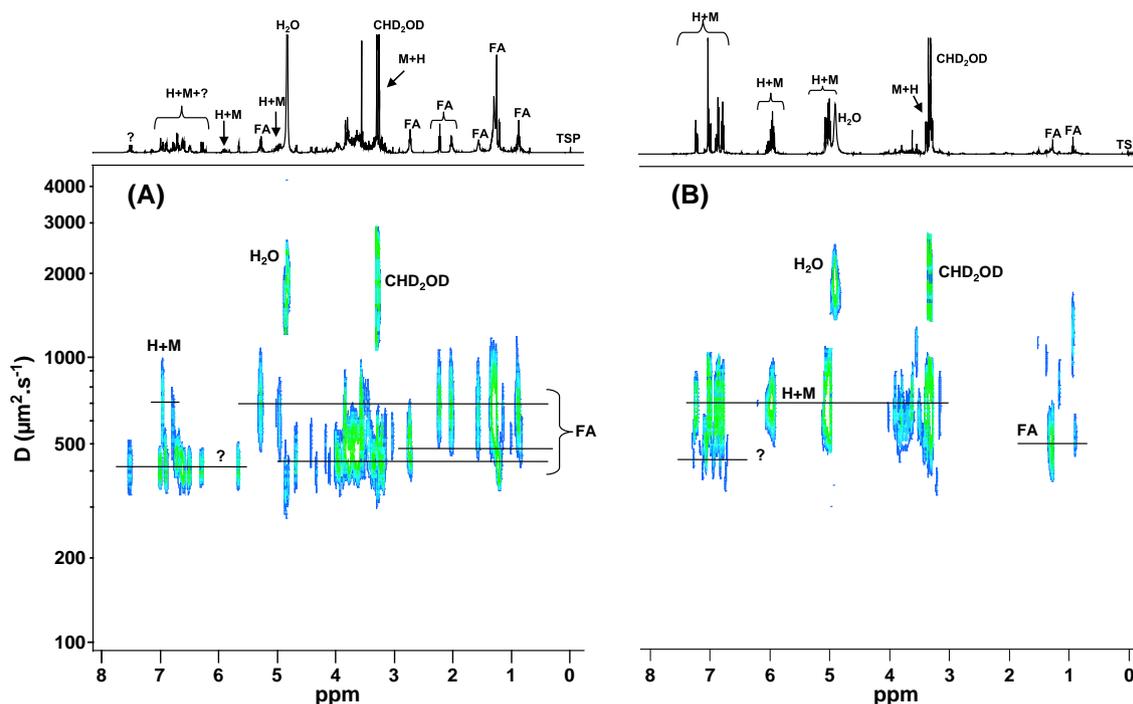


Figure 2. Two-dimensional DOSY ¹H-NMR spectra of samples (A) 5796 and (B) 5808. H: honokiol; M: magnolol; FA: fatty acids; ?: unknown; TSP: 2,2,3,3-d₄-3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium salt (internal reference).

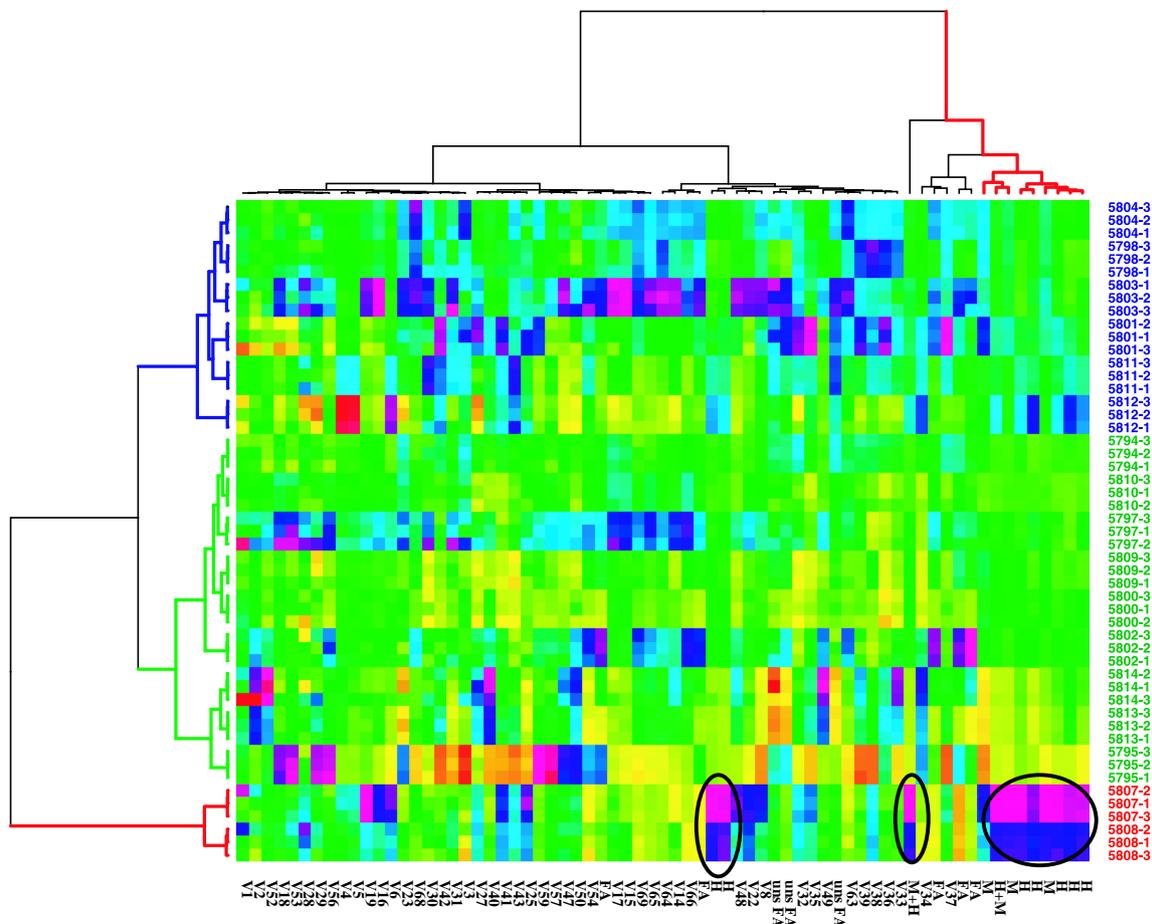


Figure 3. Matrix clustered image map based on a hierarchical clustering algorithm using Euclidean distance and Ward criterion of samples (left) and variables (top) applied to the ¹H-NMR data set without sample 5796. Colour code: green (similar), blue or red (different). FA: fatty acids; uns FA: unsaturated fatty acids.

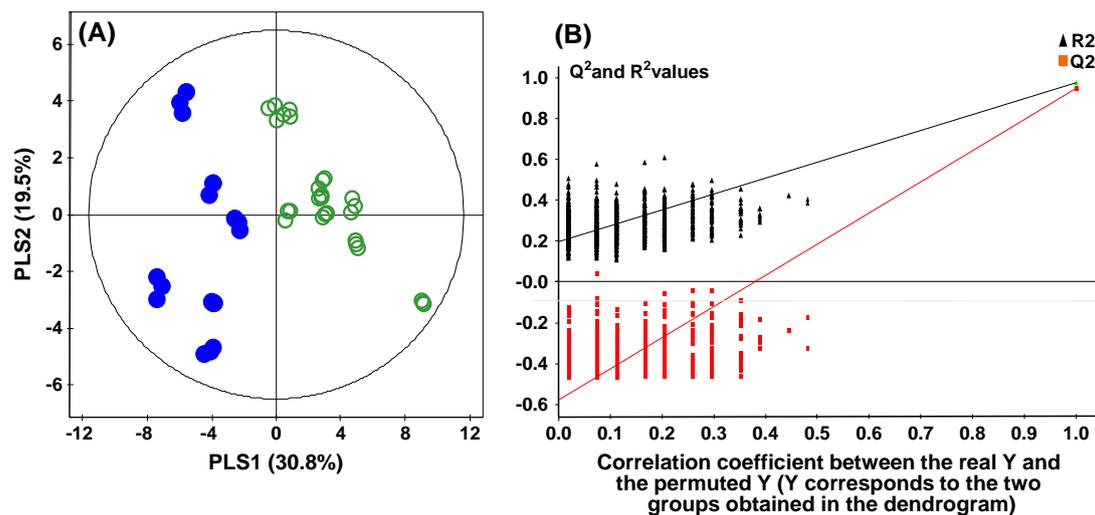


Figure 4. (A) Score plot (PLS1, PLS2) of a partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) applied to the ¹H-NMR data of samples 5798, 5801, 5803, 5804, 5811, 5812 (blue dots) and samples 5794, 5795, 5797, 5800, 5802, 5809, 5810, 5813, 5814 (green circles); (B) Results from the response permutation test with 999 permutations.

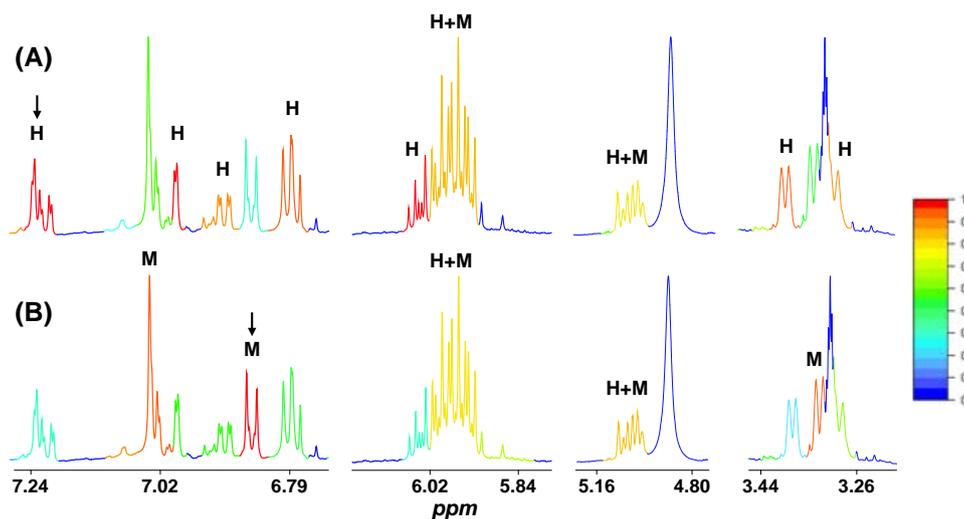


Figure 5. One-dimensional STOCSY analysis of (A) the multiplet at δ 7.22 ppm and (B) the doublet at δ 6.85 ppm corresponding to honokiol (H) and magnolol (M), respectively. The degree of correlation is colour-coded and projected on the spectrum of sample 5811. STOCSY was achieved on 45 samples (the sample 5796 (outlier) and the two root bark samples 5807 and 5808 were not included).

resonances from the same compound. However, lower correlations (yellow lines, $r \approx 0.75$) were measured for areas of the spectrum where signals of honokiol and magnolol were overlapped with resonances from other compounds.

HPLC determination of honokiol and magnolol

From the above HCA and PLS-DA results, honokiol and magnolol were found to be the two main discriminating compounds driving the separation of samples from different sources. This finding supports the choice of these two compounds to evaluate the quality of *Magnoliae officinalis* Cortex with chromatographic techniques (Chinese Pharmacopoeia Committee, 2005; Huang *et al.*, 2005). The amounts of honokiol and magnolol were thus determined by HPLC on the same plant samples (see experimental section above). The results show a large variability

among the samples (Table 1) in agreement with previous reports (Tsai and Chen, 1992; Kotani *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). Some samples have atypically low or high contents of honokiol and magnolol. For instance, the percentage of honokiol and magnolol in the root bark samples 5807 and 5808 is more elevated than that measured in the stem bark or branch bark samples. This explains why the stem bark and root bark samples were firstly separated from the others in the HCA analysis. The Chinese Pharmacopoeia (2005 edition) requires the total content of honokiol and magnolol in crude *Magnoliae officinalis* Cortex to be no less than 2.0%. Eight of the 18 samples analysed do not meet this specification. All samples were thus classified into qualified ($\geq 2.0\%$) and unqualified ($< 2.0\%$) groups according to their contents of honokiol and magnolol. Interestingly, this classification is the reflection of those obtained from HCA and PLS-DA analyses of the ¹H-NMR data. Indeed, all the unqualified

samples are classified into the green group, while qualified samples except two (5800 and 5809) belong to the blue group (Figs 3 and 4A).

The proportions of honokiol and magnolol were also measured with $^1\text{H-NMR}$ on extracts prepared for NMR analysis (see experimental section above). Data were similar to those obtained with HPLC. However, the concentrations of both compounds in samples 5795 and 5814 and of honokiol in sample 5813 could not be measured in our experimental conditions. This underlines the main limitation of $^1\text{H-NMR}$, that is, its low intrinsic sensitivity, as these three samples contained the lowest amounts of honokiol and/or magnolol as measured by HPLC (Table 1).

Multivariate analysis combining HPLC and NMR data

The mixOmics package, originally designed to unravel relationships between two omics data sets (Cao *et al.*, 2009), was applied to the data set composed of 67 variables detected by $^1\text{H-NMR}$ on one hand and the measurements of honokiol and magnolol by HPLC on the other hand. This unsupervised method clearly highlighted a good correlation between HPLC and $^1\text{H-NMR}$ results (Fig. 6). The loading plot (Fig. 6A) is horizontally structured by the high values of honokiol and magnolol (both from $^1\text{H-NMR}$ and HPLC) on the right. The vertical axis is characterised by the opposition between honokiol-related variables (top) and magnolol-related ones (bottom). We focused on the highest correlations between $^1\text{H-NMR}$ and HPLC measurements to generate a relevance network (Fig. 6B). Using a threshold of 0.74, the correlations of honokiol from HPLC (cyan circle node) were observed with eight variables from $^1\text{H-NMR}$ (violet rectangle nodes): six correspond to honokiol and one to honokiol and magnolol. The other one was also in the network around magnolol from HPLC along with six other variables: 3 correspond to magnolol and one to honokiol and magnolol. Thus, the $^1\text{H-NMR}$ holistic data analysis can achieve almost the same interpretation as the representative markers honokiol and magnolol assayed with HPLC.

Discrimination of samples from different sources and habitats

There are two official sources of *Magnoliae officinalis* Cortex recorded in the Chinese Pharmacopoeia, i.e. *Magnolia officinalis* and *Magnolia officinalis* var. *biloba*. They are not easy to discriminate due to their similar appearance and close contents of honokiol and magnolol (Table 1). Moreover, they were not distinguished in the HCA analysis of the $^1\text{H-NMR}$ data (Fig. 3). In order to determine whether the metabolic fingerprints of the extracts could facilitate the identification of biomarkers of the *biloba* variety, a PLS-DA analysis was performed on the $^1\text{H-NMR}$ data set. A good separation was achieved (Q^2 0.65, R^2X 0.68, R^2Y 0.80; Fig. 7A) nevertheless based on complex regions of the spectra that are likely to contain several metabolites that were not identified (a singlet at δ 3.18 ppm and signals between δ 3.81–3.88, 3.41–3.44 and 2.88–3.12 ppm). Lee *et al.* (2009) compared several ginseng varieties grown in Korea and found some amino acids, sugars and unidentified metabolites contributing to the separation after a PLS-DA analysis. Conversely, a PLS-DA analysis did not distinguish extracts of *Angelica acutiloba* Kitagawa (yamato-toki) and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sukiyamae* Hikino (hokkai-toki) (Tarachiwin *et al.*, 2008) due to the great influence of the cultivation region on the metabolite profiles, thus masking a possible separation due to the different toki varieties.

In an attempt to observe metabolic differences related to the geographical origin of the samples collected from five regions of China (Sichuan, Hunan, Zhejiang, Hubei and Shaanxi provinces, but mostly from Hunan; Table 1), a PLS-DA analysis was conducted on the $^1\text{H-NMR}$ data of samples from Hunan versus other samples. No discrimination could be obtained (Q^2 0.28, R^2X 0.55, R^2Y 0.55). However, when we restricted the comparison to samples in which the sum honokiol+magnolol was superior to 2.0%, a better discrimination could be achieved (Q^2 0.52, R^2Y 0.88, R^2X 0.66; Fig. 7B), although the predictive quality of the model given by the value of Q^2 is at the limit of reliability. This result is surprising as several authors have previously reported a clear separation of samples from various geographical origins for chamomile flowers (Wang *et al.*, 2004), ginseng roots (Kang *et al.*, 2008a), *Scutellaria baicalensis* roots (Kang *et al.*, 2008b) and *Angelica acutiloba*

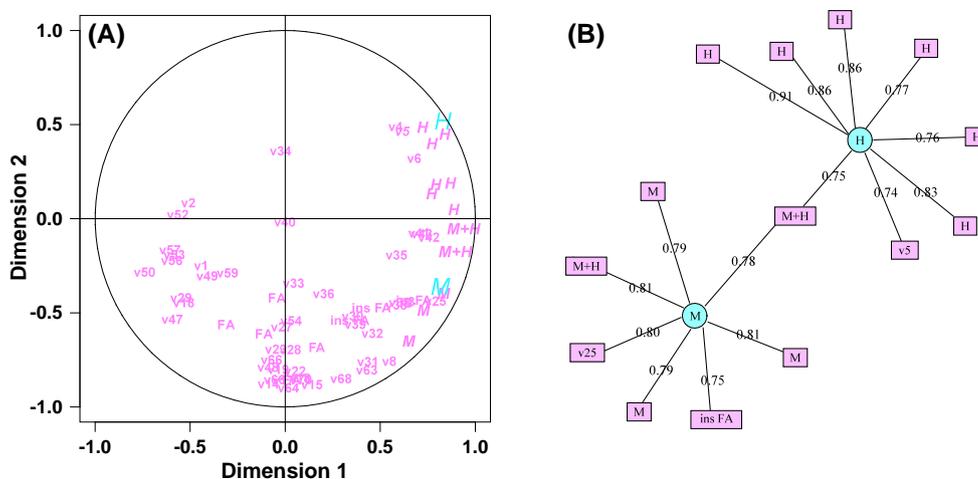


Figure 6. (A) Loading plot and (B) relevance network of a PLS2 generated with the mixOmics package with $^1\text{H-NMR}$ (67 variables) and HPLC (2 variables) data. In the loading plot, HPLC variables are indicated in cyan and NMR variables in violet. The network was produced using a threshold of 0.74. The sample 5796 (outlier) and the two root bark samples 5807 and 5808 were not included. FA: fatty acids, uns FA: unsaturated fatty acids.

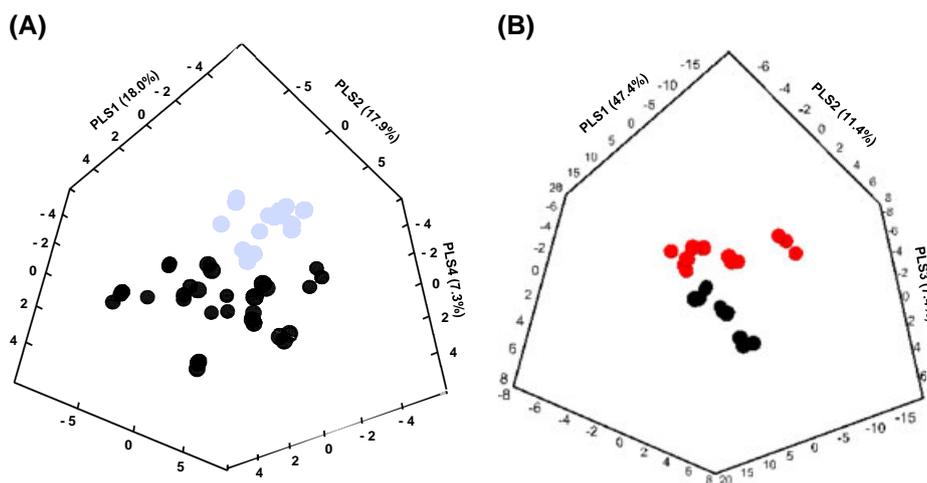


Figure 7. Three-dimensional score plots of (A) a PLS-DA performed to discriminate *Magnolia officinalis* (black) and *Magnolia officinalis* var. *biloba* (grey). Sample 5796 (outlier) and the two root bark samples 5807 and 5808 were not included; (B) a PLS-DA performed to discriminate samples from different geographical origins: Hunan (red) versus other regions (black). Only samples with a sum honokiol + magnolol $\geq 2.0\%$ (except the two root bark samples 5807 and 5808) were considered.

Kitagawa roots (Tarachiwin *et al.*, 2008) for instance after unsupervised or supervised statistical treatments. The fact that the samples analysed in this study were commodities, and the information on their sources and habitats supplied by the vendors therefore could be inaccurate, might explain our data. Consequently, it will be necessary to conduct further experiments with better characterised samples to assess the influence of the geographical environment on the metabolic profiles.

CONCLUSION

Several blind chemometric analyses with PCA, HCA and PLS-DA applied to $^1\text{H-NMR}$ -based metabolite fingerprints of the extracts of various *Magnoliae officinalis* Cortex commercial samples proved that the Chinese Pharmacopoeia method for the quality control of this TCM focusing on the two phenolic lignans honokiol and magnolol is adequate because they are indeed the main discriminating metabolites. Moreover, this conclusion is reinforced by the concordance obtained by analysing both the NMR data set and the HPLC assay of honokiol and magnolol with the mixOmics package based on an unsupervised method. Moreover, the two sources of *Magnoliae officinalis* Cortex recorded in the Chinese Pharmacopoeia, *Magnolia officinalis* and *Magnolia officinalis* var. *biloba*, can be differentiated by their $^1\text{H-NMR}$ profiles although only four samples of the latter were analysed. However, the pattern recognition analysis by PLS-DA was unsuccessful in discriminating samples from various geographical origins.

$^1\text{H-NMR}$ has many assets for metabolomics studies. It is a high-throughput, quantitative, robust and highly reproducible analytical technique requiring simple sample preparation. It reveals in a single analysis a significant amount of structural information along with a comprehensive view of the sample in terms of its chemical composition as it is non-selective. However, its low sensitivity prevented its use for assaying honokiol and magnolol in the samples containing very low amounts of these compounds, leading us to resort to HPLC, a more conventional but more sensitive technique. Our study thus showed that the

complementarity of both techniques can be usefully exploited to achieve a better quality control of herbal medicines.

Acknowledgements

The first author appreciated the fellowships from Fondation Franco-Chinoise pour la Science et ses Applications (FFCSA) and China Scholarship Council (CSC) for her post-doctoral in France. Julie Vaysse acknowledges Conseil Régional Midi-Pyrénées and Laboratoires Pierre Fabre for financial support.

REFERENCES

- Bailey NJC, Sampson J, Hylands PJ, Nicholson JK, Holmes E. 2002. Multi-component metabolic classification of commercial feverfew preparations via high-field $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and chemometrics. *Planta Med* **68**: 734–738.
- Balayssac S, Delsuc MA, Gilard V, Prigent Y, Malet-Martino M. 2009. Two-dimensional DOSY experiment with Excitation Sculpting water suppression for the analysis of natural and biological media. *J Magn Reson* **196**: 78–83.
- Cao LKA, Gonzalez I, Déjean S. 2009. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. *Bioinformatics* **25**: 2855–2856.
- Chen G, Xu XJ, Zhu YZ, Zhang LY, Yang PY. 2006. Determination of honokiol and magnolol in Cortex *Magnoliae Officinalis* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* **41**: 1479–1484.
- Chen Y, Zhu SB, Xie MY, Nie SP, Liu W, Li C, Gong XF, Wang YX. 2008. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal Chim Acta* **623**: 146–156.
- Chinese Pharmacopoeia Committee Editing. 2005. *Chinese Pharmacopoeia* (part I, 2005 edition). Chinese Medicine and Pharmaceutical Publisher: Beijing; 176.
- Choi YH, Kim HK, Hazekamp A, Erkelens C, Lefeber AWM, Verpoorte R. 2004. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ^1H NMR spectroscopy and principal component analysis. *J Nat Prod* **67**: 953–957.
- Choi YH, Sertic S, Kim HK, Wilson EG, Michopoulos F, Lefeber AWM, Erkelens C, Kricun SDP, Verpoorte R. 2005. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *J Agric Food Chem* **53**: 1237–1245.

- Cloarec O, Dumas ME, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, Blancher C, Gauguier D, Lindon JC, Holmes E, Nicholson J. 2005. Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ^1H NMR data sets. *Anal Chem* **77**: 1282–1289.
- Consonni R, Cagliani LR, Stocchero M, Porretta S. 2009. Triple concentrated tomato paste: discrimination between Italian and Chinese products. *J Agric Food Chem* **57**: 4506–4513.
- Couzinet-Mossion A, Balayssac S, Gilard V, Malet-Martino M, Potin-Gautier M, Behra P. 2010. Interaction mechanisms between caffeine and polyphenols in infusions of *Camellia sinensis* leaves. *Food Chem* **119**: 173–181.
- Duarte IF, Goodfellow BJ, Gil AM, Delgadillo I. 2005. Characterization of mango juice by high-resolution NMR, hyphenated NMR, and diffusion-ordered spectroscopy. *Spectrosc Lett* **38**: 319–342.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14863–14868.
- Frédérich M, Jansen C, Tullio de P, Tits M, Demoulin V, Angenot L. 2010. Metabolomic analysis of *Echinacea* spp. by ^1H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate data analysis technique. *Phytochem Anal* **21**: 61–65.
- Gilard V, Balayssac S, Malet-Martino M, Martino R. 2010. Quality control of herbal medicines assessed by NMR. *Curr Pharm Anal* **6**: 234–245.
- Huang XY, Wei YF, Zhang YJ, Li LY, Wang XH, Wang MY. 2005. Determination of magnolol and honokiol in the leaves of *Magnoliae officinalis* from different collecting times. *China J Chin Mater Med* **30**: 717.
- Jiang Y, David B, Tu PF, Barbin Y. 2010. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—a review. *Anal Chim Acta* **657**: 9–18.
- Kang J, Lee S, Kang S, Kwon HN, Park JH, Kwon SW, Park S. 2008a. NMR-based metabolomics approach for the differentiation of ginseng (*Panax ginseng*) roots from different origins. *Arch Pharm Res* **31**: 330–336.
- Kang J, Choi MY, Kang S, Kwon HN, Wen H, Lee CH, Park M, Wiklund S, Kim HJ, Kwon SW, Park S. 2008b. Application of a ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approach combined with orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis as an efficient tool for discriminating between Korean and Chinese herbal medicines. *J Agric Food Chem* **56**: 11589–11595.
- Kim HK, Choi YH, Erkelens C, Lefeber AW, Verpoorte R. 2005. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using ^1H -NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chem Pharm Bull* **53**: 105–109.
- Kim HK, Saifullah, Khan S, Wilson EG, Kricun SDP, Meissner A, Goral S, Deelder AM, Choi YH, Verpoorte R. 2010. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry* **71**: 773–784.
- Kotani A, Kojima S, Hakamata H, Jin D, Kusu F. 2005. Determination of honokiol and magnolol by micro HPLC with electrochemical detection and its application to the distribution analysis in branches and leaves of *Magnolia obovata*. *Chem Pharm Bull* **53**: 319–322.
- Lee EJ, Shaykhtudinov R, Weljie AM, Vogel HJ, Facchini PJ, Park SU, Kim YK, Yang TJ. 2009. Quality assessment of ginseng by ^1H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis. *J Agric Food Chem* **57**: 7513–7522.
- Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC. 2005. Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod* **68**: 133–149.
- R Development Core Team. 2010. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org>
- Rodrigues ED, Brentan da Silva D, Rodrigues de Oliveira DC, Jose da Silva GV. 2009. DOSY NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*. *Magn Reson Chem* **47**: 1095–1100.
- Shin YS, Bang KH, In DS, Kim OT, Hyun DY, Ahn IO, Ku BC, Kim SW, Seong NS, Cha SW, Lee D, Choi HK. 2007. Fingerprinting analysis of fresh ginseng roots of different ages using ^1H -NMR spectroscopy and principal components analysis. *Arch Pharm Res* **30**: 1625–1628.
- Sobolev AP, Brosio E, Gianferri R, Segre AL. 2005. Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magn Reson Chem* **43**: 625–638.
- Tarachiwin L, Katoh A, Ute K, Fukusaki E. 2008. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by ^1H NMR-based metabolic fingerprinting. *J Pharm Biomed Anal* **48**: 42–48.
- Tsai TH, Chen CF. 1992. Identification and determination of honokiol and magnolol from *Magnoliae Officinalis* by high-performance liquid chromatography with photodiode UV-array detection. *J Chromatogr A* **598**: 143–146.
- Wang Y, Tang H, Nicholson JK, Hylands PJ, Sampson J, Whitcombe I, Stewart CG, Caiger S, Oru I, Holmes E. 2004. Metabolomic strategy for the classification and quality control of phytomedicine: a case study of chamomile flower (*Matricaria recutita* L.). *Planta Med* **70**: 250–255.
- Yang SY, Kim HK, Lefeber AWM, Erkelens C, Angelova N, Choi YH, Verpoorte R. 2006. Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to quality control of ginseng commercial products. *Planta Med* **72**: 364–369.

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'évaluer l'apport de méthodes de RMN comme outil de contrôle qualité des formulations pharmaceutiques.

Dans l'étude que nous avons menée sur l'analyse des contrefaçons de médicaments et de compléments alimentaires, nous avons analysé par RMN DOSY ^1H des formulations pharmaceutiques de différentes spécialités (Sibutral®, Cialis®, Viagra®...). Classiquement, les méthodes de prédilection pour l'analyse de mélanges sont les méthodes chromatographiques, en général couplées pour la détection à des méthodes spectroscopiques en particulier la spectroscopie UV-Visible ou la spectrométrie de masse. Cependant la RMN DOSY ^1H présente l'avantage de fournir une vue globale de l'échantillon. En effet, tout ingrédient d'une formulation pharmaceutique (principe actif, excipient ou adjuvant) peut être détecté à condition qu'il contienne des protons et qu'il soit soluble dans le solvant d'analyse. Le spectre DOSY ^1H fournit ainsi une signature spectrale qui permet de caractériser le mélange complexe que constitue une préparation pharmaceutique. Et à l'inverse des méthodes chromatographiques, l'analyse par RMN DOSY ^1H ne nécessite aucune mise au point complexe préalable et peut être facilement standardisée et automatisée. Par ailleurs, elle est non destructive. La seconde dimension de la RMN DOSY ^1H crée une séparation virtuelle des composés en fonction de leur coefficient de diffusion. Cette séparation apporte une plus grande lisibilité aux spectres par rapport aux autres techniques analytiques globales telles que la diffraction des rayons X ou la spectroscopie infra-rouge.

Le manque de sensibilité de la RMN n'est pas vraiment gênant dans le cas de la recherche de contrefaçons ou d'adultération car dans la grande majorité des cas, les adultérants sont présents en grande quantité. Le principal inconvénient qui fait que la RMN est peu utilisée pour le contrôle des médicaments est probablement le prix des spectromètres et donc l'utilisation non routinière de la spectroscopie RMN. Dans de nombreux articles, les auteurs préfèrent des méthodes simples, rapides, peu onéreuses pouvant être utilisées sur le terrain. C'est pourquoi la chromatographie sur couche mince et les techniques de colorimétrie sont encore largement utilisées. La RMN DOSY ^1H peut être considérée comme une technique supplémentaire pour des investigations plus approfondies sur des médicaments suspectés de contrefaçon.

La RMN DOSY ^1H est également une méthode bien adaptée pour caractériser les interactions entre les molécules telles que l'inclusion d'un principe actif dans une cyclodextrine. Les coefficients de diffusion étant différents pour les molécules libres et pour les molécules liées, elle permet de calculer facilement le taux d'encapsulation.

La RMN DOSY ^1H , malgré des limites en termes de sensibilité, est l'une des rares techniques non destructives permettant de caractériser des structures moléculaires en mélange et des phénomènes d'association.

Pour la dernière étude consacrée à l'analyse d'extraits de plantes, nous avons opté pour une approche métabolomique par RMN ^1H . L'utilisation de la spectrométrie RMN pour réaliser des empreintes métaboliques présente plusieurs avantages. Certes moins sensible que l'HPLC ou la spectrométrie de masse, la RMN offre une excellente reproductibilité. De plus, la préparation d'échantillon et l'acquisition des spectres sont simples. Couplé à des techniques chimiométriques, elle permet de traiter un nombre élevé de spectres, offrant des perspectives prometteuses pour la comparaison et la discrimination d'échantillons de compositions proches.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont mis en lumière la diversité des études réalisables et des informations accessibles par RMN à différents niveaux de complexité de mélange et de structuration. Ils ont ainsi permis de montrer que la RMN est un outil analytique performant pour la caractérisation des formulations pharmaceutiques.

Références bibliographiques

Acerbi D et al. Biopharmaceutical optimisation of beta-cyclodextrins inclusion compounds. Drug investment 2. (1990) 2. 29-36.

Afssaps 21/01/2010. -<http://www.afssaps.fr/Infos-de-securite/Communiqués-Points-presse/Sibutramine-Sibutral-R-Suspension-de-l-autorisation-de-mise-sur-le-marche-Communiqué>.

Agnamey P. et al. Un foyer de paludisme multi-résistant en zone forestière au Cameroun revisité 14 ans après. Médecine tropicale. (2002) 62. 141-144.

Ahuja Ishita et al. Plant molecular stress responses face climate change Trends in Plant Science. (2010) 15. 664-674.

Al Omari M.M. et al. Novel inclusion complex of ibuprofen tromethamine with cyclodextrins : Physico-chemical characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (2009) 50. 449-458.

Aliferis K.A. et al. Lemna minor L. as a model organism for ecotoxicological studies performing ¹H NMR fingerprinting. Chemosphere. (2009) 76. 967-973.

Baker M. Metabolomics : From small molecules to big ideas. Nature Methods. (2011) 8. 117-121.

Bakkour Y. et al. Formation of Cyclodextrin Inclusion Complexes with Doxycyclin-Hyclate: NMR Investigation of Their Characterisation and Stability. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. (2006) 54. 109-114.

Balayssac S. et al. 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (2009) 50. 602-612.

Balayssac S. et al. Two-dimensional DOSY experiment with Excitation Sculpting water suppression for the analysis of natural and biological media. Journal of Magnetic Resonance. (2009) 196. 78-83.

Banerjee R., Chakraborty H. et Sarkar M. Host-guest complexation of oxicam NSAIDs with beta-cyclodextrin. Biopolymers. (2004) 75. 355-365.

Barillaro V. et al. Theoretical and experimental investigations on miconazole/cyclodextrin/acid complexes: Molecular modeling studies. International Journal of Pharmaceutics. (2007) 342. 152-160.

Bogusz M.J. et al. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. Journal of Pharmaceutical Analysis. (2006) 41. 554-564.

Cabaleiro-Lago C., Nilsson M. et Soederman O. Self-diffusion NMR studies of the host-guest interaction between β -cyclodextrin and alkyltrimethylammonium bromide surfactants. Langmuir. (2005) 21. 11637-11644.

Cameron K.S. et Fielding L. NMR Diffusion Spectroscopy as a Measure of Host-Guest Complex Association Constants and as a Probe of Complex Size. Journal of Organic Chemistry. (2001) 66. 6891-6895.

Canzi G., Mrse A.A. et Kubiak C.P. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy as a Reliable Alternative to TEM for Determining the Size of Gold Nanoparticles in Organic Solutions. Journal of Physical Chemistry C. (2011) A-G.

Charoenchaitrakool M., Dehghani F. et Foster N.R Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin. International journal of pharmaceutics. (2002) 239. 103-112.

Cianchino V. et al. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*. (2008) 108. 1075-1081.

Cobas J.C. et al. New applications, processing methods and pulse sequences using diffusion NMR. *Current Analytical Chemistry*. (2005) 1. 289-305.

Dall'Asta C. et al. Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified β -cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*. (2009) 64. 331-340.

Davis M.E. et Brewster M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. (2004) 3. 1023-1035.

De Saint Pol T. Surpoids, normes et jugements en matière de poids : comparaisons européennes. *Population & Sociétés*. (2009) 455. 1-4.

De Veij M. et al. Detection of counterfeit Viagra with Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2008) 46. 303-309.

Deisingh A.K. Pharmaceutical counterfeiting. *Analyst*. (2004) 130. 271-279.

Delattre L. Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. (2007) 65. 58-67.

Delsuc M.A et Malliavin T.E Maximum entropy processing of DOSY NMR spectra. *Analytical Chemistry*. (1998) 70. 2146-2148.

Denkova P.S. et al. Self-Aggregation and Supramolecular Structure Investigations of Triton X-100 and SDP2S by NOESY and Diffusion Ordered NMR Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*. (2008) 112. 10935-10941.

Di Cagno M et al. Solubilization of ibuprofen with β -cyclodextrin derivatives: energetic and structural studies. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*. (2011) 55. 446-451.

Doijad R.C., Kanakal M.M. et Manvi F.V. Effect of processing variables on dissolution and solubility of piroxicam: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2007) 69. 323-326.

Du L. et al. A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane. *Electrochimica acta*. (2006) 51. 5754-5760.

Duchene D., Bochot A. et Loftsson T. Cyclodextrins and their use in pharmacy and cosmetology. *STP Pharma Pratiques*. (2009) 19. 15-27.

Durand E. et al. ^1H Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as a Powerful Tool for the Analysis of Hydrocarbon Mixtures and Asphaltenes. *Energy & Fuels*. (2008) 22. 2604-2610.

Evans R. et al. Isomer resolution by micelle-assisted diffusion-ordered spectroscopy. *Analytical Chemistry* (Washington, DC, United States). (2009) 81. 4548-4550.

FAO Peser le pour et le contre des OGM : le contre. 03/2003. <http://www.fao.org/french/newsroom/focus/2003/gmo8.htm>.

Fauvelle F. et Debouzy J.C. What can we do with cyclodextrins? *Annales pharmaceutiques francaises*. (2001) 59. 363-5.

Fernandez F.M., Green M.D. et Newton P.N. Prevalence and Detection of Counterfeit Pharmaceuticals: A Mini Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. (2008) 47.

Freiss B., Marciacq F. et Lochard H. Inclusion complexes obtained by using a process with supercritical carbon dioxide and an agent for interaction with the complex. [Brevet] : 2005097201. - WO, 2005.

Doijad R.C., Kanakal M.M. et Manvi F.V. Effect of processing variables on dissolution and solubility of piroxicam: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2007) 69. 323-326.

Galhena A.S. et al. Enhanced direct ambient analysis by differential mobility-filtered desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry (Washington, DC, United States)*. (2010) 82. 9159-9163.

Gibaud S. et al. Melarsoprol-cyclodextrins inclusion complexes. *International journal of pharmaceutics*. (2005) 306. 107-121.

Gierczyk B. et al. The diffusion NMR studies of crown ethers-cyclodextrin complexation process. *Magnetic Resonance in Chemistry*. (2010) 48. 471-475.

Gilard V. et al. Quality control of herbal medicines assessed by NMR. *Current Pharmaceutical Analysis*. (2010) 6. 234-245.

Goldman M. Histoire de la RMN : Autour de ses premiers acteurs... et après. *L' Actualité chimique*. (2004) 273. 57-60.

Grillo R. et al. Hydroxymethylnitrofurazone:dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complex: a physical-chemistry characterization. *Journal of biological physics*. (2007) 33. 445-53.

Guerrero-Martinez A. et al. Inclusion Complexes between β -Cyclodextrin and a Gemini Surfactant in Aqueous Solution: An NMR Study. *Journal of Physical Chemistry B*. (2006) 110. 13819-13828.

Haaz S. et al. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obesity reviews*. (2006) 7. 79-88.

Hagel J. M. et Facchini P.J. Plant metabolomics: analytical platforms and integration with functional genomics. *Phytochemistry Reviews*. (2008) 7. 479-497.

Hédiji H. et al. Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (2010) 73. 1965-74.

Higuchi T. et Connors K.A. Phase-solubility techniques. *Advantage Analytical Chemistry Instrument*. (1965) 4. 117-212.

Hu C.Q. et al. Establishment of a Fast Chemical Identification System for screening of counterfeit drugs of macrolide antibiotics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. (2006) 40. 68-74.

Huang X.Y et al. Determination of magnolol and honokiol in the leaves of *Magnolia officinalis* from different collecting times. *China Journal of Chinese Materia Medica*. (2005) 30. 717.

Huo R., Wehrens R. et Buydens L.M.C. Robust DOSY NMR data analysis. (2007) 85. 9-19.

Jahnke R., Kusters G. et Fleischer K. Low-cost quality assurance of medicines using the GPHF-Minilab®. *Drug information journal*. (2001) 35. 903-919 et 941-945.

James W.T.P. The SCOUT study: risk-benefit profile of sibutramine in overweight high-risk cardiovascular patients. *The European Society of Cardiology*. (2005) 7. L44-L48.

Jansen J.J. et al. The photographer and the greenhouse: how to analyse plant metabolomics data. *Phytochemical Analysis*. (2010) 21. 48-60.

- Jiang Y. et al.** Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines-A review. *Analytica Chimica Acta*. (2010) 657. 9-18
- Johnson C. S., Jr.** Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. (1999) 34. 203-256.
- Kim HK et al.** Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*. (2010) 71. 773-784.
- Kralj B., Smidovnik A. et Kobe J.** Mass spectrometric investigations of alpha- and beta-cyclodextrin complexes with ortho-, meta- and para-coumaric acids by negative mode electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. (2009) 23. 171-180.
- Lau Aik-Jiang, Holmes Michael J et Woo Soo-On, Koh, Hwee-Ling** Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2003) 31. 401-406.
- Laverde A., Jr. et al.** An NMR tool for cyclodextrin selection in enantiomeric resolution by high-performance liquid chromatography. *Magnetic Resonance in Chemistry*. (2002) 40. 433-442.
- Liang Y.Z., Xie P. et Chan K.** Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2004) 812. 53-70.
- Lima M.R.M. et al.** NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany*. (2010) 61. 4033-4042.
- Lin M. et al.** Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of the selective complexation of the cis and trans isomers of phenylalanylproline by β -cyclodextrin. *Analytica Chimica Acta*. (1995) 307. 449-457.
- Linde G.A. et al.** Taste modification of amino acids and protein hydrolysate by α -cyclodextrin. *Food research international*. (2009) 42. 814-818.
- Liu S.Y., Woo S.O. et Koh H.L.** HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2001) 24. 983-992.
- Lopez-Cervantes M. et al.** Chemical enhancers for the absorption of substances through the skin : Laurocapram and its derivatives. *Drug development and industrial pharmacy*. (2006) 32. 267-286.
- Lucas L.H. et Larive C.K.** Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*. (2004) 20A. 24-41.
- Macel M., Van Dam N.M. et Keurentjes J.J.B.** Metabolomics: the chemistry between ecology and genetics. *Molecular Ecology Resources*. (2010) 10. 583-593.
- Mannina L. et al.** NMR and chemometrics in tracing European olive oils: the case study of Ligurian samples. *Talanta*. (2010) 80. 2141-2148.
- Martino R. et al.** Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2010) 398. 77-92.
- Maruyama Y. et Sarker S.D.** *Magnolia : The Genus Magnolia*. Taylor & Francis (2002) chapitre 2.
- Maurin J.K. et al.** The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control-The Viagra example. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2007) 43. 1514-1518.
- Morris K.F. et Johnson C.S., Jr.** Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. (1992) 114. 3139-3141.
- Mura P., Maestrelli F. et Cirri M.** Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and amino acids. *International Journal of Pharmaceutics*. (2003) 260. 293-302.

Narkiewicz K. Sibutramine and its cardiovascular profile. *International Journal of Obesity.* (2002) 26. S38-S41.

Nelson B.C. et al. Mass Spectrometric Determination of the Predominant Adrenergic Protoalkaloids in Bitter Orange (*Citrus aurantium*). *Journal of agricultural and food chemistry.* (2007) 55. 9769–9775.

Ngimbi N.P. et Tona Lutete N.Z. L'association de la clindamycine à la chloroquine ou à la quinine dans le traitement du paludisme A P Falciparum chez l'enfant à Kinshasa (Zaire). *Médecine d'Afrique noire.* (1998) 45. 270-272.

Nilsson M. et Morris G.A. Correction of systematic errors in CORE processing of DOSY data. *Magnetic Resonance in Chemistry.* (2006) 44. 655-660.

Nilsson M. et Morris G.A. Improved DECRA processing of DOSY data: correcting for non-uniform field gradients. *Magnetic Resonance in Chemistry.* (2007) 45. 656-660.

Nilsson M. et Morris G.A. Speedy component resolution: an improved tool for processing diffusion-ordered spectroscopy data. *Analytical Chemistry* (Washington, DC, United States). (2008) 80. 3777-3782.

Nilsson M. The DOSY Toolbox: A new tool for processing PFG NMR diffusion data. *Journal of Magnetic Resonance.* (2009) 200. 296-302.

Nyadong L. et al. Combining two-dimensional diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy, imaging desorption electrospray ionization mass spectrometry, and direct analysis in real-time mass spectrometry for the integral investigation of counterfeit pharmaceuticals. *Analytical Chemistry.* (2009) 81. 4803–4812.

Palma S. et al. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* (2009) 24-31.

Perly B. et Pilard F. Cyclodextrins and their applications. *Clefs CEA.* (1997) 35. 32-43.

Pescitelli G. et al. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: Spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* (2010) 52. 479-483.

Pharmacopoeia Chinese Cortex *Magnoliae officinalis*. Publisher Chinese Medicine and pharmaceutical. Chinese Pharmacopoeia Committee Editing. (2005) p. 176.

Piel G. et al. Study of the Influence of Both Cyclodextrins and L-Lysine on the Aqueous Solubility of Nimesulide; Isolation and Characterization of Nimesulide-L-Lysine-Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* (1997) 86. 475-480.

Rao P. et Knaus E.E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* (2008) 11. 81s-110s.

Redenti E. et al. Experimental and Theoretical Analysis of the Interaction of (\pm)-cis-Ketoconazole with β -Cyclodextrin in the Presence of (+)-L-Tartaric Acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* (1999) 88. 599-607.

Redenti E., Szente L. et Szejtli J. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* (2000) 89. 1-8.

Regiert M. Light-stable vitamin E by inclusion in γ -cyclodextrin. *NutraCos.* (2006) 5. VD2-VD6.

Ren Y. et al. Distinguishing transgenic from non-transgenic Arabidopsis plants by ¹H NMR-based metabolic fingerprinting. *Journal of Genetics and Genomics.* (2009) 36. 621-628.

Ribeiro L.S. et al. Cyclodextrin multicomponent complexation and controlled release delivery strategies to optimize the oral bioavailability of vinpocetine. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* (2007) 96. 2018-2028.

Ribeiro L.S. et al. Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2005) 24. 1-13.

Ricci C. et al. Characterization of genuine and fake artesunate anti-malarial tablets using Fourier transform infrared imaging and spatially offset Raman spectroscopy through blister packs. *Analytical and bioanalytical chemistry*. (2007) 389. 1525-1532.

Rivet J.P, Barbachoux C. et Debbasch F. Le mouvement brownien : une trajectoire hors du commun. *Le Bulletin de l'A.D.I.O.N.* (1997).

Rodionova O.Y. et Pomerantsev A.L. NIR-based approach to counterfeit-drug detection. *Trends in analytical chemistry*. (2010) 29. 795-803.

Rodomonte A.L. et al. Counterfeit drugs detection by measurement of tablets and secondary packaging colour. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2010) 53. 215-220.

Rozou S., Voulgari A. et Antoniadou-Vyza E. The effect of pH dependent molecular conformation and dimerization phenomena of piroxicam on the drug:cyclodextrin complex stoichiometry and its chromatographic behaviour A new specific HPLC method for piroxicam:cyclodextrin formulations. *European journal of pharmaceutical sciences*. (2004) 21. 661-669.

Sacre P.Y. et al. Comparison and combination of spectroscopic techniques for the detection of counterfeit medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2010) 53. 445-453.

Salter T.L. et al. A comparison of SIMS and DESI and their complementarities. *Surface and Interface Analysis*. (2011) 43. 294-297.

Salústio P.J. et al. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a (3-cyclodextrin cavity. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. (2009) 71. 377-386.

Sauceau M., Rodier E. et Fages J. Preparation of inclusion complex of piroxicam with cyclodextrin by using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*. (2008) 47. 326-332.

Schripsema J. Application of NMR in Plant Metabolomics : Techniques, Problems and Prospects. *Phytochemical Analysis*. (2010) 21. 14-21.

Sekhara T.R. et al. Formulation and evaluation of acid stabilized lansoprazole oral tablet by forming inclusion complex with the combination of cyclodextrin and tromethamine. *Journal of Pharmacy Research*. (2010) 3. 3018-3022.

Selva A. et al. Multicomponent non-covalent associations of β -cyclodextrin (β -CD)-drug inclusion complexes with diethanolamine (DEA). Detection and characterization of gaseous protonated 1:1:1 β -CD-Drug-DEA adducts by ionspray ionization and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. (1996) 31. 1364-1370.

Selva A. et al. Study of β -cyclodextrin-ketoconazole-tartaric acid multicomponent non-covalent association by positive and negative ion-spray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. (1998) 33. 729-734.

Sherma J. Analysis of counterfeit drugs by thin layer chromatography. *Acta Chromatographica*. (2007) 19. 5-20.

Shuib N.H. et al. Discrimination of young and mature leaves of *Melicope ptelefolia* using ^1H NMR and multivariate data analysis. *Food Chemistry*. (2011) 126. 640-645.

Siddiqui W.A. Synthesis of Piroxicam-related Heterocyclic Molecules and Evaluation of Their Biological Activities. *University Lahore* (2003-2007).

Simon Y. Épidémiologie et facteurs de risque psychosociaux. *Nutrition clinique et métabolisme*. (2007) 21. 137–142.

Simova S. et Berger S. Diffusion measurements vs. Chemical shift titration for determination of association constants on the example of camphor-cyclodextrin complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. (2005) 53. 163-170.

Smejkalova D. et Piccolo A. Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSY-NMR). *Environmental Science & Technology*. (2008) 42. 699-706.

Socha A.M. et al. Diffusion Coefficient-Formula Weight Correlation Analysis via Diffusion-Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (DOSY NMR) To Examine Acylglycerol Mixtures and Biodiesel Production. *Energy & Fuels*. (2010) 24. 4518-4521.

Steiner R.R. et Larson R.L. Validation of the direct analysis in real time source for use in forensic drug screening. *Journal of Forensic Sciences*. (2009) 54. 617-622.

Stejskal E.O. et Tanner J.E. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *Journal of Chemical Physics*. (1965) 42. 288-292.

Sun D.Z. et al. A microcalorimetric study of host-guest complexes of α -cyclodextrin with alkyl trimethyl ammonium bromides in aqueous solutions. *Journal of solution chemistry*. (2005) 34. 701-712.

Tormena C.F. et al. Matrix-assisted diffusion-ordered spectroscopy: mixture resolution by NMR using SDS micelles. *Magnetic Resonance in Chemistry*. (2010) 48. 550-553.

Trefi S. et al. The usefulness of 2D DOSY and 3D DOSY-COSY ^1H NMR for mixture analysis: application to genuine and fake formulations of sildenafil (Viagra). *Magnetic Resonance in Chemistry*. (2009) 47. S163-S173.

Tseng M.C. et al. GC/MS Analysis on Anorectics Adulterated in Traditional Chinese Medicines. *Journal of Food and Drug Analysis*. (2000) 8. 315-330.

Twohig M. et al. Rapid detection and identification of counterfeit of adulterated products of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors with an atmospheric solids analysis probe. *Drug Testing and Analysis*. (2010) 2. 45-50.

Valero M., Rodriguez L.J. et Velazquez M.M. Inclusion of non-steroidal anti-inflammatory agents into aqueous cyclodextrins : A UV-absorption spectroscopic study. *Il Farmaco*. (1996) 51. 525-533.

Van Axel Castelli V. et al. Characterisation of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2008) 97. 3897-3906.

Van Der Kooy F. et al. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Medica*. (2009) 75. 763-775.

Van Der Pas P.W. the discovery of the brownian motion. *R. Brown*. (1866) 1. 465-486.

Van Hees T. et al. Determination of the free/included piroxicam ratio in cyclodextrin complexes: comparison between UV spectrophotometry and differential scanning calorimetry. *European journal of pharmaceutical sciences*. (2002) 15. 347-353.

Venhuis B.J. et al. The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: A Viagra with a pop. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2011) 54. 735-741.

Verpoorte R. et al. Metabolomics: back to basics. *Phytochemistry Reviews*. (2008) 7. 525-537.

Verpoorte R., Choi Y.H. et Kim H.K. Metabolomics: what's new? *Flavour and Fragrance Journal*. (2010) 25. 128-131.

Viel S. et al. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: A Versatile Tool for the Molecular Weight Determination of Uncharged Polysaccharides. *Biomacromolecules*. (2003) 4. 1843-1847.

Ward J.L., Baker J.M. et Beale M.H. Recent applications of NMR spectroscopy in plant. *The FEBS Journal*. (2007) 274. 1126-1131.

Warrington S. Effects of piroxicam-beta-cyclodextrin on the gastrointestinal tract. *European Journal of Rheumatology & Inflammation*. (1993) 12. 29-37.

WHO 03/2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Wimmer R. et al. NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. *Carbohydrate research*. (2002) 337. 841-849.

Wolfender J.L., Marti G. et Ferreira Queiroz E. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. *Current Organic Chemistry*. (2010) 14. 1808-1832.

Wu D., Chen A. et Johnson C.S., Jr. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*. (1995) 115. 260-264.

Xing S. et al. Isothermal Titration Calorimetry and Theoretical Studies on Host-guest Interaction of Ibuprofen with α -, β - and γ -Cyclodextrin. *Journal of solution chemistry*. (2009) 38. 531-543.

Xu M. et al. Investigation on extremely dilute solution of PEO by PFG-NMR. *Colloid and polymer science*. (2010) 288. 85-89.

Yang K. et al. Insights into the Interactions between Dendrimers and Multiple Surfactants: Formation of Miscellaneous Mixed Micelles Revealed by a Combination of ^1H NMR, Diffusion, and NOE Analysis. *Journal of Physical Chemistry B*. (2010) 114. 7265-7273.

Zhang X. et al. Piroxicam/2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Prepared by a New Fluid-Bed Coating Technique. *Journal of pharmaceutical sciences*. (2009) 98. 665-675.

Zhou Y. et al. The Interaction of Piroxicam with Neutral (HP- β -CD) and Anionically Charged (SBE- β -CD) β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. (2006) 56. 215-220.

Zou P. et al. Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2008) 47. 279-284.

Liste des figures

Figure 1. Mouvement brownien d'une particule microscopique en suspension dans l'eau. (D'après un dessin de Jean Perrin).....	15
Figure 2. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE).....	16
Figure 3. Représentation de l'aimantation lors d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE) avec une diffusion nulle.....	17
Figure 4. Représentation de l'aimantation lors d'une expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés (PFG-SE) avec une diffusion.	17
Figure 5. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé à gradients de champs pulsés (PFG-STE).	19
Figure 6. La convection dans un tube RMN	20
Figure 7. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé à gradients de champs pulsés avec un délai LED (LED-STE, longitudinal eddy current -Pulse Field Gradient STimulated Echo).....	20
Figure 8. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé avec des gradients de champs pulsés bipolaires (STE-Bipolaire Gradient Pulses).	21
Figure 9. Schéma de la séquence d'impulsion de l'expérience d'écho de spin stimulé avec des gradients de champs pulsés bipolaires avec un délai LED (LED-STE-Bipolaire Gradient Pulses).	21
Figure 10. Simulation de l'atténuation du signal en fonction de l'intensité du gradient allant de 5 à 95 % avec différentes optimisations.	22
Figure 11. Courbe de l'atténuation de l'intensité relative de trois molécules en fonction de l'intensité du gradient.....	23
Figure 12. Atténuation des signaux avec l'augmentation du gradient.....	24
Figure 13. Tracé théorique de la courbe de l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration totale en tensio-actif.....	30
Figure 14. Spectre RMN DOSY ¹ H d'un échantillon de plasma humain.	32
Figure 15. Spectre RMN DOSY ¹ H d'un comprimé de Viagra® Pfizer et d'une contrefaçon.	33
Figure 16. Spectre RMN DOSY ¹ H obtenu pour le mélange de trois hydroxybenzènes avec un milieu micellaire et sans milieu micellaire.	34
Figure 17. Spectres RMN DOSY ¹ H d'un mélange après une réaction de transestérification d'huile végétale et d'huile utilisée en cuisine.	35
Figure 18. Procédé du mini-laboratoire FCIS.	39
Figure 19. Analyse de l'emballage secondaire et d'un cachet de Cialis®.	40
Figure 20. Courbes de réflectance en fonction des longueurs d'ondes en nm obtenues pour une formulation suspecte de viagra pour une formulation de Viagra® authentique.	41
Figure 21. Spectres Raman 18 formulations de Viagra®.....	45
Figure 22. Spectres de diffraction des rayons X d'une formulation de Viagra® authentique et de contrefaçons de Viagra®.....	46
Figure 23. Spectre RMN DOSY ¹ H du Sibutral® dans CD ₃ CN/D ₂ O. (sib : sibutramine, st : stéarate).....	49

Figure 24. Spectres RMN DOSY ^1H du Sibutral®, de la formulation 3 et de la formulation 9 enregistrés dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$	51
Figure 25. Conditionnement des formulations Lida. Formulation 12 à gauche et formulation 2 à droite.....	73
Figure 26. Spectres RMN DOSY ^1H des formulations 12 et 2 enregistrés dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$	74
Figure 27. Spectres RMN DOSY ^1H des formulations 4 et 5 enregistrés dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$	76
Figure 28. Photo des emballages de la formulation 6.	78
Figure 29. Spectre RMN ^1H de la formulation 6 enregistré dans CD_3OD	78
Figure 30. Spectre RMN ^1H de la formulation 6 après élimination des composés volatiles par passage au speed-vac et redissolution du résidu dans CDCl_3	79
Figure 31. Spectre RMN DOSY ^1H de la formulation 7 enregistré dans MeOD	81
Figure 32. Spectres RMN DOSY ^1H du Cialis® et de la formulation 10 enregistrés dans $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$	83
Figure 33. Structure d'une cyclodextrine.....	98
Figure 34. Diagramme de phase.....	104
Figure 35. Spectres RMN ^1H d'un principe actif, la vinctocétine (I), de la β -cyclodextrine (II) et du complexe en présence d'acide tartrique (III) enregistrés dans D_2O	105
Figure 36. Types de diagrammes de solubilité selon la classification d'Higuchi et Connors.	107
Figure 37. Influence de l'addition de la β -cyclodextrine sur le spectre UV d'une solution aqueuse d'un principe actif, le piroxicam à 95 μM et à pH 5 (Acerbi, et al., 1990).....	108
Figure 38. Influence de l'addition de la sulfobutyléthér- β -cyclodextrine sur le spectre de fluorescence d'une solution aqueuse d'un principe actif, le piroxicam à 1.10^{-5}M et à pH 5,5. Les concentrations en sulfobutyléthér- β -cyclodextrine sont : (1) 0 M, (2) 5.10^{-4}M , (3) 1.10^{-3}M , (4) 2.10^{-3}M , (5) 3.10^{-3}M , (6) 4.10^{-3}M , (7) 5.10^{-3}M , (8) 6.10^{-3}M (Zhou, et al., 2006).....	110
Figure 39. Spectres obtenus par diffraction des rayons X d'un principe actif, l'ibuprofène (sel de trométhamine (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d).....	111
Figure 40. Images MEB d'un principe actif, l'ibuprofène (le sel de trométhamine) (a), de la β -cyclodextrine (b), du mélange physique (c) et du complexe (d).....	113
Figure 41. Spectres FT-IR d'un principe actif, la cladribine (a), du mélange physique (b), du complexe (c) et de la 2HP- β -cyclodextrine.....	114
Figure 42. Structure de l'ibuprofène.....	121
Figure 44. Superpositions des spectres RMN DOSY ^1H de l'ibuprofène seul (en vert), de la β -cyclodextrine (en bleu) et du complexe IC (en noir) enregistrés dans le $\text{DMSO}-d_6$ (A) et dans D_2O (B).	123
Figure 45. Superpositions des spectres RMN DOSY ^1H de l'ibuprofène seul (en vert), de la β -cyclodextrine (en bleu), de l'agent ternaire (en orange (l'arginine (B) et lysine (D)) et du complexe ICA (en noir (A et B) ou du complexe ICL (en noir (C et D)) enregistrés dans le $\text{DMSO}-d_6$ (A et C) et dans D_2O (B et D).	126
Figure 46. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H de trois solutions contenant de la lysine à 5mM et de la β -cyclodextrine à des concentrations variables : 0 mM (orange), 5 mM (bleu clair) et 10 mM (bleu foncé).....	129
Figure 47. Tracé des coefficients de diffusion en fonction des masses molaires des cyclodextrines.	131
Figure 48. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H du camphre, de l' α -cyclodextrine et du complexe camphre-(α -cyclodextrine) réalisé avec un large excès d' α -cyclodextrine.	132

Figure 49. Tracé des coefficients de diffusion en fonction des masses molaires des cyclodextrines et du complexe camphre- α -cyclodextrine de stœchiométrie 1 : 2.	133
Figure 50. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H du camphre, de l' α -cyclodextrine et du complexe camphre-(α -cyclodextrine) réalisé sans excès d' α -cyclodextrine.	133
Figure 51. Superposition des spectres RMN DOSY ^1H obtenus à partir de solutions de complexes ICL de concentration fixe en ibuprofène (5mM) et en lysine (5mM) et une concentration en cyclodextrine variant de 0 à 5 mM. Spectres entiers (A) et étalement de 0,8 à 3,2 ppm et de 7 à 7,3 ppm (B).	136
Figure 52. Spectre ROESY du complexe ICL à 5mM enregistré dans D_2O à pH 7,2.....	138
Figure 53. Schématisation de l'encapsulation de l'ibuprofène dans la β -cyclodextrine.....	139
Figure 54. Superpositions des spectres RMN DOSY ^1H de l'ibuprofène (en vert), de l'arginine (en orange, spectre B), de la lysine (en orange, spectre C), de la β -cyclodextrine (en bleu) et des complexes IC (en noir, spectre A), ICA (en noir, spectre B) et ICL (en noir, spectre C) enregistrés dans D_2O ...141	141
Figure 55. Superpositions des spectres RMN $1\text{D}^1\text{H}$ de l'ibuprofène (en vert), de la lysine (en orange), de la β -cyclodextrine (en bleu) et du complexe ICL (en noir, spectre C) enregistrés dans D_2O	142
Figure 56. Graphe des taux de solubilité des complexes obtenus par CO_2 supercritique et des mélanges physiques obtenus par malaxage mesurés par RMN ^1H à pH naturel.....	146
Figure 57. Superpositions des spectres RMN $1\text{D}^1\text{H}$ de l'ibuprofène avec un pH réajusté à 7,2 (en vert), de la lysine avec un pH réajusté à 7,2 (en orange), de la β -cyclodextrine avec un pH réajusté à 7,2 (en bleu) et du complexe ICL (en noir) enregistrés dans D_2O	147
Figure 58. Histogramme des taux de solubilité de l'ibuprofène et des complexes à leur pH naturel et à un pH de 7,2.....	150
Figure 66. Schéma d'un capillaire externe placé dans un tube RMN	157
Figure 67. Schéma de la géométrie couette.....	161
Figure 68. Nombre de publications par année consacrées à des études métabolomiques tout domaine confondu. Source SciFinder en utilisant le terme 'metabolomics' (date de consultation 25.05.2011).	166
Figure 69. Structure chimique de la naringinine et les spectres RMN enregistrés dans $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$	169
Figure 70. Spectre RMN ^1H d'une extraction $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ (8:2) de la plante <i>Arabidopsis thaliana</i> : le spectre $1\text{D}^1\text{H}$ conventionnel (A), la projection du spectre Jres 2D (B) et le spectre Jres 2D (C).....	171

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des formulations à base de sibutramine analysées.....	48
Tableau 2. Liste des excipients détectés et dosage en sibutramine pour chaque formulation (n = 3).	52
Tableau 3. Liste des formulations analysées	69
Tableau 4. Tableau des principes actifs et des excipients détectés par formulations.	71
Tableau 5. Caractéristique RMN de la caféine, théobromine, synéphrine et yohimbine dans CD ₃ CN/D ₂ O.....	72
Tableau 6. Caractéristiques RMN du nitroso-prodénafil et du tadalafil dans CD ₃ CN/D ₂ O.	77
Tableau 7. Caractéristiques RMN et masse du laurocapram.	80
Tableau 8. Caractéristiques RMN de la chloroquine dans MeOD.	82
Tableau 9. Caractéristiques RMN du sildénafil dans CD ₃ CN/D ₂ O.	84
Tableau 10. Principales caractéristiques des cyclodextrines naturelles (Duchene, et al., 2009)	97
Tableau 11. Valeurs de viscosité des échantillons	128
Tableau 12. Les coefficients de diffusion mesurés et les masses molaires des trois cyclodextrines naturelles ...	130
Tableau 13. Les taux d'encapsulations calculés et estimés pour chaque solution.....	137
Tableau 14. Déplacements chimiques des complexes IC, ICA et ICL.....	144
Tableau 15. Mesures des taux de solubilité et des taux d'encapsulation des complexes par RMN ¹ H et spectrométrie UV à pH naturel.....	144
Tableau 16. pH des solutions des complexes et des différents standards.....	146
Tableau 17. Déplacements chimiques des complexes IC, ICA et ICL.....	148
Tableau 21. Conditions de préparation des complexes par CO ₂ supercritique.....	153
Tableau 22. Conditions de préparation des mélanges par CO ₂ supercritique.....	153
Tableau 23. Liste des cyclodextrines et agents ternaires utilisés.	154
Tableau 24. Mélanges camphre- α -cyclodextrine réalisés	155
Tableau 25. Solutions de complexe ICL et de mélange IL à différents ratios.....	156
Tableau 26. Solutions préparées pour chaque complexe et mélange d'ibuprofène pour réaliser les courbes de calibrations UV.....	160
Tableau 27. Solutions préparées pour chaque complexe et mélange d'ibuprofène pour réaliser les courbes de calibrations UV.....	161
Tableau 28. Comparaison des méthodes analytiques couramment utilisées en métabolomique ou empreinte métabolomique. (Verpoorte, et al., 2008).....	170
Tableau 29. Les résultats des différentes études métabolomiques sur la réponse des plantes à différents stress (Ahuja, et al., 2010).....	175

Annexes

Publications:

- Improving Metabolite Knowledge in Stable Atherosclerosis Patients by Association and Correlation of GC-MS and ¹H NMR Fingerprints

J. TEUL, F.J. RUPEREZ, A. GARCIA, **J. VAYSSE**, S. BALAYSSAC, V. GILARD, M. MALET-MARTINO, J-L. MARTIN-VENTURA, L. M. BLANCO-COLIO, J. TUÑÓN, J. EJIDO, C. BARBAS. *Journal of Proteome Research*, 8, 5580–5589 (2009)

- Analysis of adulterated herbal drugs marketed for weight loss by DOSY ¹H NMR

J. VAYSSE, S. BALAYSSAC, V. GILARD, D. DESOUBDZANNE, M. MALET-MARTINO, R. MARTINO. *Food Additives and Contaminants*, 27, 903-16 (2010)

- Quality analysis of *Magnoliae officinalis* by ¹H NMR based metabolomics and HPLC methods

Y. JIANG, **J. VAYSSE**, V. GILARD, S. BALAYSSAC, S. DEJEAN, M. MALET-MARTINO, B. DAVID, C. FIORINI, Y. BARBIN. *Phytochemical Analysis*, on line, DOI: 10.1002/pca.1369

- Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement

J. VAYSSE, V. GILARD, S. BALAYSSAC, C. ZEDDE, R. MARTINO, M. MALET-MARTINO. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, on line, doi:10.1016/j.jpba.2011.10.001

Communications:

➤ Affiche

- DOSY ¹H NMR, a useful tool for detection of adulteration in herbal slimming products

J. VAYSSE, S. BALAYSSAC, V. GILARD, M. MALET-MARTINO, R. MARTINO. Affiche au 13th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, Milan, Italie, 9-12 septembre 2009

- 2D DOSY 1H NMR for detection of active ingredients in herbal dietary supplements

J. VAYSSE, S. BALAYSSAC, V. GILARD, M. MALET-MARTINO, R. MARTINO. Affiche au SMASH 2009, Chamonix, 20-23 septembre 2009

- Increasing knowledge of stable atherosclerosis through metabolomics

F.J. RUPEREZ, J. TEUL, A. GARCIA, **J. VAYSSE**, S. BALAYSSAC, V. GILARD, M. MALET-MARTINO, J.L. VENTURA, L.M. BLANCO-COLIO, J. TUNON, J. EGIDO, C. BARBAS. Affiche au 4th International Congress on Prediabetes and Metabolic Syndrome, Madrid (Espagne), 6-9 avril 2011

➤ Communication

- Analyse de médicaments ou compléments alimentaires naturels par RMN 1H DOSY

J. VAYSSE, S. BALAYSSAC, V. GILARD, M. MALET-MARTINO, R. MARTINO. Communication orale à la Journée Grand Sud-Ouest de la SFC, Toulouse, 13 novembre 2009

- DOSY 1H NMR, a Useful Tool for Detection of Adulteration in Dietary Supplements

J. VAYSSE, S. BALAYSSAC, V. GILARD, R. MARTINO, M.A. DELSUC, M. MALET-MARTINO. Communication orale à la 10th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science, Clermont-Ferrand, France, 13-15 Septembre 2010

- Caractérisation de lots de Magnolia officinalis par une approche métabolomique par RMN 1H

Y. JIANG, **J. VAYSSE**, V. GILARD, S. BALAYSSAC, S. DEJEAN, M. MALET-MARTINO, B. DAVID, C. FIORINI, Y. BARBIN. Communication Orale aux 5èmes journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, PARIS, 23-25 mai 2011

- Analyse de formulations pharmaceutiques par RMN DOSY 1H

J. VAYSSE, S. BALAYSSAC, V. GILARD, M. MALET-MARTINO, R. MARTINO. Communication orale à la Journée de l'école doctorale science de la matière, Toulouse, 26-27 mai 2011

Résumé

Apport de la Résonance Magnétique Nucléaire pour le contrôle et la qualité de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires

Résumé :

L'objectif de ces travaux a été de montrer l'application de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à des problématiques analytiques dans le domaine de l'analyse pharmaceutique. Trois axes ont été abordés :

Le premier axe a porté sur l'analyse de contrefaçons de médicaments conventionnels, de phytomédicaments et de compléments alimentaires adultérés. La RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ^1H a été utilisée comme un outil analytique permettant d'avoir une information globale sur la formulation pharmaceutique. En plus des informations structurales, elle permet d'obtenir une séparation virtuelle des composés, ce qui facilite l'identification des adultérants dans les formulations.

Le deuxième axe a porté sur la caractérisation (stœchiométrie et taux d'encapsulation) par RMN ^1H DOSY et ROESY d'entités formées par encapsulation de principes actifs dans des cyclodextrines.

Le dernier axe a été orienté vers la phytothérapie. Les extraits végétaux sont des milieux complexes à analyser. C'est la raison pour laquelle, dans cette partie, une approche métabolomique par RMN ^1H a été mise en œuvre pour le contrôle qualité d'extraits de *Magnolia officinalis*.

Mots clefs : RMN DOSY, médicaments, contrefaçons, adultérants, cyclodextrines, métabolomique

Nuclear Magnetic Resonance for quality control of conventional drugs, herbal medicines and dietary supplements.

Abstract :

The purpose of this research was the application of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in the pharmaceutical field. The studies were focused on three main research axes:

The first part dealt with the analysis of counterfeit drugs, adulterated phytopharmaceuticals and adulterated dietary supplements. DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) ^1H NMR was the main analytical technique employed as it gives a comprehensive overview of the formulation. Besides structural information, it provides virtual separation of compounds and thus makes easier the identification of adulterants in various formulations.

The second part was devoted to the characterization of inclusion complexes of active pharmaceutical ingredients into cyclodextrines by ^1H DOSY and ROESY NMR.

The last part was about phytopharmaceuticals. The analysis of complex mixtures such as plant extracts is difficult. A metabolomics approach combining ^1H NMR and several statistical tools was thus developed for quality control of *Magnolia officinalis* extracts.

Key words: DOSY NMR, drugs, counterfeits, adulterants, cyclodextrins, metabolomics

Laboratoire d'accueil : Groupe de RMN Biomédicale,
Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB),
UMR CNRS 5068,
Université Paul Sabatier – 118, route de Narbonne
31062 TOULOUSE cedex 4
