



**HAL**  
open science

# RMN haut champ et bas champ pour l'analyse de produits de santé

Gaëtan Assemat

► **To cite this version:**

Gaëtan Assemat. RMN haut champ et bas champ pour l'analyse de produits de santé. Chimie thérapeutique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30268 . tel-02338817

**HAL Id: tel-02338817**

**<https://theses.hal.science/tel-02338817>**

Submitted on 30 Oct 2019

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

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



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Gaëtan ASSEMAT**

Le 10 décembre 2018

**RMN haut champ et bas champ pour l'analyse de produits  
de santé.**

---

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et PhysicoChimie de Molécules d'Intérêt  
Biologique**

Thèse dirigée par

**Véronique GILARD-POTEAU et Myriam MALET-MARTINO**

Jury

**M. Stéphane VIEL**, Rapporteur

**M. Pierre-Antoine BONNET**, Rapporteur

**M. Patrick GIRAUDEAU**, Examineur

**Mme Françoise NEPVEU**, Examineur

**Mme Véronique GILARD-POTEAU**, Directeur de thèse



# Remerciements

Mes premiers mots se doivent d'aller à Messieurs Baltas et Génisson, Directeurs successifs du Laboratoire de Synthèse et PhysicoChimie de Molécules d'Intérêt Biologique (LSPCMIB) où j'ai réalisé ce doctorat; merci à vous de m'avoir permis d'intégrer votre laboratoire et d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

C'est ensuite naturellement que je voudrais remercier tous les membres du jury qui ont fait le déplacement pour juger mon travail. Chacun avec vos spécialités respectives, vous avez su conduire une conversation riche et exaltante, en faisant un moment d'échange scientifique riche et plein de bienveillance. Deux rapporteurs d'horizons bien distincts ont notamment permis de faire ressortir ce qui est à mon sens le point fort de cette thèse, à savoir une approche scientifique complexe au service de problématiques de santé publique. Monsieur Viel aura notamment grandement enrichi la discussion par ses connaissances manifestes sur la RMN diffusionnelle, mais également sur la RMN quantitative. Monsieur Bonnet aura quant à lui fait ressortir les complexités mais surtout les subtilités d'un monde où beaucoup de choses restent malheureusement encore à faire. Monsieur Giraudeau... Patrick, j'ai pris autant de plaisir à échanger avec toi en ce jour un peu spécial, qu'à travailler avec toi et toute ton équipe durant ces quelques semaines; c'est à chaque fois réellement enrichissant et j'espère que nos échanges perdureront ! Quant à Madame Nepveu, présidente hors pair, merci encore d'avoir accepté mon invitation et d'avoir enrichi la conversation d'une expérience forçant l'admiration.

Dans ce Jury, il y avait également Mesdames Gilard et Malet-Martino, mais ici et vous m'en excuserez je l'espère, ce n'est pas en tant que juges que j'ai envie de vous remercier mais plutôt en tant qu'encadrantes. Madame Gilard, 3 années passées sous votre direction et à vrai dire je n'ai rien à redire, problèmes pratiques, théoriques, rédactionnels ou même humains, vous avez toujours été là, et avez toujours réagi extrêmement rapidement me permettant de travailler dans des conditions optimales sans jamais me décourager, et pour cela, merci beaucoup ! Madame Martino, je pourrais écrire une autre thèse sur tout ce que vous m'avez appris... mais je me contenterai de rappeler ici à quel point votre professionnalisme est exemplaire et je voudrais que vous sachiez qu'il a été et qu'il restera un exemple pour moi. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe et d'avoir fait de cette thèse un vrai plaisir.

Dans cette équipe, on compte également Monsieur Balayssac Stéphane; précieux au quotidien tu m'as beaucoup appris et permis de devenir très vite autonome; tu n'étais certes ni dans le jury, ni dans la direction, mais tu as été pour moi tout aussi important ! La science nous a rapprochés mais ce sont surtout nos franches rigolades sans jamais aucun tabou que je retiendrai ! Encore merci d'avoir souvent agi « dans l'ombre ».

Professeur émérite et on le serait pour moins, Robert Martino à également pris part à ce projet; nous n'avons pas pu nous côtoyer beaucoup et j'en suis le premier déçu, mais à chacune de vos visites qu'elles soient professionnelles ou non, j'ai adoré nos conversations. Votre présence à chacune de mes présentations locales m'a également grandement touché, et pour tout cela merci beaucoup.

Rabab Hachem, tu as été la première personne à qui j'ai eu à faire, formatrice, amie, protectrice, pendant ces quelques mois tu as eu pour moi une importance plus grande que tu ne l'estimes. Merci pour tout, sans ta bonne humeur communicative, cette thèse aurait pu être bien différente.

Une thèse en chimie analytique ne serait rien sans une instrumentation fonctionnelle et un personnel compétent, et pour avoir rendu mon quotidien plus tranquille, je voudrais sincèrement

remercier tous les services communs : Isabelle Fabing en chromatographie avec qui j'ai passé plusieurs journées... souvent de galère mais toujours avec le moral !

Nathalie Martins et Catherine Claparols en spectrométrie de masse, ceux qui ont lu ou qui liront cette thèse comprendront à quel point elles ont été indispensables à ce projet !

Et enfin et surtout le service commun de RMN, je vous ai dérangé environ...tous les jours (vacances comprises) et vous avez toujours répondu présents ! Masochisme ou professionnalisme ? Mon choix est fait, merci à vous Marc Vedrenne, Pierre Lavedan, Caroline Topan, Stéphane Massou et Claude Andreu. Je voudrais appuyer mes remerciements envers toi Stéphane, réel passionné aux compétences indénombrables, tu as été pour moi une source de motivation intarissable.

Merci également à tous mes amis doctorants rencontrés pendant ces 3 années, Lori Gonnet et Thomas Levy, vous êtes les suivants alors bonne chance à vous, même si je ne m'inquiète pas vraiment ! Un énorme merci également à deux personnes qui sont devenus de vrais amis après avoir été de vrais soutiens, je pense ici à vous Romain et Aritz, pas de formalisme entre nous, mais je suis persuadé que vos carrières seront aussi belles que l'amitié que l'on a liée. Une pensée aussi pour Jin Hui Wang, aujourd'hui rentré en Chine, un ami plein de sagesse et toujours de bon conseil. Quelques mots enfin pour Baptiste Amouroux, ami de longue date, qui aurait imaginé qu'on en serait là ? Bon courage pour la finalisation de ta belle thèse et bon courage pour la carrière académique à laquelle tu aspires.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, mes parents et mon frère dans un premier temps, soutien infaillible du premier au dernier jour, cela fait 26 ans que je me considère chanceux de vous avoir à mes côtés et cela n'est pas près de changer. Un merci tout particulier également à toi Poema pendant ces 3 ans la vie n'a pas forcément été évidente pour nous, mais tu as su la rendre bien plus facile et surtout bien plus agréable pour moi; on a malgré tout passé des moments magnifiques et j'en suis persuadé, les plus beaux restent à venir.

Finalement je voudrais dédier ce mémoire à mes grands-parents, source sans fin de respect, de bonne humeur et d'humilité, vous qui ne vous êtes jamais soucie d'autres choses que de mon bonheur, aujourd'hui, même si la santé vous fait défaut, et que comme vous aimiez le dire vous ne compreniez rien à ce que je faisais, j'espère que vous êtes aussi fiers que moi je peux l'être.

# Sommaire

Abréviations

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Partie 1</b> .....	5
<b>1 Les compléments alimentaires, leurs possibles adultérations et leurs méthodes d'analyse</b> .....	7
1.1 Les compléments alimentaires .....	7
1.1.1 Définitions et premières tentatives d'harmonisations européennes .....	7
1.1.2 Compléments alimentaires et régulation.....	8
1.1.2.1 Un contrôle de la composition encore très disparate au sein de l'UE .....	10
1.1.2.2 Une réglementation française plus stricte .....	11
1.1.3 Marché Européen.....	12
1.1.3.1 Données commerciales .....	12
1.1.3.2 Consommation : Impacts et tendances.....	13
1.1.3.3 Le marché en France .....	15
1.1.3.4 La nécessité de contrôle des canaux de distributions.....	16
1.2 Adultération.....	17
1.2.1 Importance du problème .....	17
1.2.2 Définition, champ de l'étude et sources de données.....	17
1.2.3 Exemples de cas problématiques.....	18
1.2.4 Catégories de compléments alimentaires et ancrage sociétal.....	19
1.2.4.1 Compléments alimentaires pour la perte de poids.....	20
1.2.4.2 Compléments alimentaires pour la performance sportive .....	21
1.2.4.3 Compléments alimentaires érectiles.....	23
1.2.4.4 Nécessité d'un contrôle de leur composition.....	24
1.3 Techniques d'analyse .....	25
1.3.1 Approche chromatographique .....	26
1.3.1.1 Chromatographie sur couche mince .....	26
1.3.1.2 Chromatographie liquide haute performance .....	27
1.3.1.3 Chromatographie en phase gazeuse .....	30
1.3.1.4 Autres techniques séparatives .....	31
1.3.2 Spectrométrie de masse.....	31
1.3.3 Techniques spectroscopiques .....	34
1.3.3.1 Spectroscopie vibrationnelle.....	34
1.3.3.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire .....	35

1.3.4	Autres méthodes bio-analytiques .....	37
1.4	Références .....	38
2	Cas d'un complément alimentaire à visée érectile .....	45
3	Analyse de compléments alimentaires pour sportifs .....	77
3.1	Contexte de l'étude .....	77
3.2	« Compléments alimentaires » .....	77
3.2.1	Compléments alimentaires sans actifs annoncés .....	78
3.2.1.1	Cas des formulations 13 (DIA) et 21 (OXY) .....	79
3.2.1.2	Cas de la formulation 5 .....	84
3.2.1.3	Cas de la formulation 8 .....	86
3.2.1.4	Cas de la formulation 6 .....	95
3.2.2	Compléments alimentaires avec actifs annoncés .....	98
3.2.2.1	Cas de la formulation 37 .....	99
3.2.2.2	Cas de la formulation 41 .....	101
3.2.2.3	Cas des formulations 36 et 56 .....	104
3.2.3	Bilan des cas présentés .....	108
3.2.4	Bilan de l'ensemble des 58 préparations analysées .....	109
3.3	Préparations injectables .....	110
3.3.1	Présentation des produits étudiés .....	110
3.3.2	Analyses préliminaires .....	112
3.3.2.1	Choix du solvant .....	112
3.3.2.2	Expériences RMN qualitatives .....	113
3.3.2.3	Analyse par spectrométrie de masse .....	115
3.3.3	Analyses finales .....	117
3.3.3.1	Attribution .....	117
3.3.3.2	Différenciation spectrale par RMN du carbone-13 .....	121
3.3.3.3	Quantification .....	122
3.3.3.3.1	Mise au point de la préparation d'échantillon .....	122
3.3.3.3.2	Adaptation des paramètres d'acquisition RMN .....	123
3.3.3.3.3	Résultats des analyses quantitatives .....	125
3.3.4	Bilan et Conclusion .....	128
3.4	Conclusion sur l'analyse de produits pour sportifs .....	129
3.5	Matériels et méthodes .....	130
3.5.1	Produits chimiques .....	130
3.5.1.1	Produits standards .....	130
3.5.1.2	Les compléments alimentaires .....	130

3.5.2	Expériences RMN.....	131
3.5.2.1	Préparation des formulations 1 à 58.....	131
3.5.2.2	Préparation des solutions injectables .....	132
3.5.2.3	Enregistrement des spectres.....	133
3.5.3	Spectrométrie de masse .....	136
3.5.4	Chromatographie .....	136
3.5.4.1.1	Mise au point analytique.....	136
3.5.4.1.2	Conditions de purification .....	137
3.6	Références.....	138
3.7	Tableau annexe .....	141
<b>Partie 2</b>	.....	<b>145</b>
1	Contrefaçon de médicaments et RMN à bas-champ .....	147
1.1	Contrefaçon de médicaments .....	147
1.1.1	Problématiques et définitions .....	147
1.1.2	Les différentes formes de contrefaçon et les médicaments ciblés.....	149
1.1.3	Un phénomène mondial.....	152
1.1.3.1	Vue d'ensemble du marché mondial.....	152
1.1.3.2	Les causes à la source de ce marché .....	155
1.1.3.3	Les répercussions économiques et sanitaires .....	157
1.1.4	Limiter ce phénomène .....	159
1.1.4.1	Accroître la prise de conscience .....	159
1.1.4.2	Protéger les produits .....	160
1.1.4.3	Le développement des méthodes analytiques.....	161
1.2	La RMN à bas champ .....	163
1.2.1	L'intérêt de la RMN à bas champ .....	163
1.2.2	Le développement technologique.....	164
1.2.2.1	Caractéristiques techniques .....	164
1.2.2.2	Comparaison du marché .....	166
1.2.3	Performances et limites .....	168
1.2.3.1	Sensibilité et résolution.....	168
1.2.3.2	Les couplages forts .....	169
1.2.3.2.1	Éléments de théorie .....	169
1.2.3.2.2	Les couplages virtuels.....	173
1.2.4	Les applications de la RMN bas champ .....	175
1.2.4.1	Suivi monitoré .....	175
1.2.4.2	Travailler sans solvant deutéré.....	176



1.2.4.3	Différents systèmes monitorés et applications.....	177
1.2.4.4	Authentification et contrôle qualité.....	181
1.3	Références .....	186
2	RMN à bas champ pour la détection de contrefaçons de médicaments.....	193
3	RMN DOSY à bas champ pour l'analyse de médicaments .....	215
	<b>Conclusion générale</b> .....	<b>237</b>
	<b>Annexes : autres publications</b> .....	<b>239</b>

# Abréviations

## Abréviations générales :

AMM : Autorisation de mise sur le marché  
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
ANSM : Agence nationale de sécurité des médicaments  
APCI : Atmospheric pressure chemical ionization  
API : Active pharmaceutical ingredient  
ASAP : Atmospheric solids analysis probe  
ATR : Attenuated total reflectance  
BEH : Bridged ethylene hybrid  
CAD : Charged aerosol detector (Corona)  
CAD : Collisionally activated dissociation  
CCM : TLC : Chromatographie sur couche mince : Thin layer chromatography  
CE : Conseil Européen  
CI : Chemical ionisation  
CID : Collision-induced dissociation  
Cr(acac)<sub>3</sub> : Acétyle acétonate de chrome 3  
CSH : Charged surface hybrid  
CV : Coefficient de variation  
DAD : Diode array detector  
DCBI : Desorption corona beam ionization  
DECRA : Direct exponential curve resolution algorithm  
DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
EFSA : AESA : European food safety authority : Autorité européenne de sécurité des aliments  
EGCG : Épigallocatechine gallate  
EI : Electron ionisation  
ELSD : Evaporative light scattering detector  
EMA : EMEA : European medicines agency : Agence européenne des médicaments  
ESI : Electrospray ionization  
FAB : Fast atom bombardment  
FDA : Food and drug administration  
FI : Flow infusion  
FT-ICR : Transformée de fourrier-résonance cyclonique ionique  
GC : Gas chromatography  
HPLC : High-performance liquid chromatography  
HPTLC : CCMHP : High-performance thin-layer chromatography : Chromatographie sur couche mince haute performance  
IR : Infra-red : Infra rouge  
MALDI : Matrix assisted laser desorption ionisation  
MRM : Multiple reaction monitoring  
MS : SM : Mass spectrometry : Spectrométrie de masse  
MS/MS : Tandem mass spectrometry  
NAFDAC : National agency for food and drug administration and control  
NIR : Near infra-red  
NIST : National institute of standards and technology  
OMS : WHO : Organisation mondiale de la santé : World health organisation

PDA : Photodiode array  
PDE-5i : Phosphodiesterase type 5 inhibitor  
PSI : Pharmaceutical security institute  
RASFF : Rapid alert system for food and feed.  
RFID : Radio frequency identification  
RT : Retention time  
SARM : Selective androgen receptor modulators  
SF : Substandard and falsified  
SFC : Supercritical fluid chromatography  
SSFFC : Substandard, spurious, falsely labelled, falsified and counterfeit  
SRM : Single reaction monitoring  
Synadiet : Syndicat national des compléments alimentaires  
TIMS : Thermal ionization mass spectrometry  
TOF : Time of flight  
UE : Union européenne  
UPLC : UHPLC : Ultra-(high)-performance liquid chromatography  
UV : Ultraviolet-visible  
WADA : ADA : World anti-doping agency : Agence mondiale antidopage

### Abréviations spécifiques à la RMN :

1D, 2D, nD : Monodimensionnelle, bidimensionnelle, n dimensionnelle  
ADC : Apparent diffusion coefficients  
Angle  $\alpha$  : Angle de basculement de la magnétisation  
AQ : Temps d'acquisition  
 $B_0$  : Champ magnétique statique  
 $B_1$  : Champ magnétique induit  
BPP : Bipolar pulse  
COSY : Correlation spectroscopy  
CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence  
D1 : Délai de relaxation  
DEPT : Distortionless enhancement by polarization transfer  
DOSY : Diffusion ordered spectroscopy  
DS : Dummy scans  
FID : Free induction decay  
HF : High field  
HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation  
HMQC : Heteronuclear multiple-quantum correlation  
HSQC : Heteronuclear single-quantum correlation  
I : Nombre quantique de spin  
IG : Inverse gated  
INEPT : Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer  
InvRec : Inversion recovery  
J-Res : J-résolue  
LB : line broadening  
LED : Longitudinal eddy delay  
LF : Low field  
LOCODOSY : Local covariance order diffusion-ordered spectroscopy  
LOD : Limit of detection

LOQ : Limit of quantification  
MaxEnt : Maximum entropy  
NOE : Nuclear Overhauser effect  
NOESY : Nuclear Overhauser effect spectroscopy  
NS : Nombre de scans  
P90 : Pulse 90°  
ppm : partie par million  
Q : Facteur de retour à l'équilibre  
RF : Radio fréquence  
RMN : NMR : Résonance magnétique nucléaire : Nuclear magnetic resonance  
SG : Semi gaussian  
SNR : Signal to noise ratio  
STE : Stimulated echo  
SW : Spectral width  
T<sub>1</sub> : Temps de relaxation longitudinal  
T<sub>2</sub> : Temps de relaxation transverse  
TBO : Triple broadband observe  
TCl : Triple resonance probes (<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H)  
TD : Time domain  
T<sub>e</sub> : Time involved within the LED block  
TSP : 3-(trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteropropionic acid  
TXO : Triple resonance probe  
UF : Ultra fast  
WET : Water excitation technique  
Δ : Délai de diffusion  
Δδ : Différence de déplacement chimique  
Δν : Différence de fréquence  
η<sub>RH</sub> : Viscosité dynamique  
γ : Rapport gyromagnétique  
Φ : Phase cycling step  
Ψ : Fonction d'onde



# Introduction générale

« Existe-t-il pour l'homme un bien plus précieux que la santé ? »

Déjà, au V<sup>ème</sup> siècle avant notre ère Socrate s'interroge. Depuis, la médecine et les sciences pharmaceutiques n'ont cessé de progresser. Tantôt adulées, tantôt haïes, elles ont pris peu à peu une place prépondérante dans notre société, jusqu'à devenir de nos jours, bien qu'indispensables et efficaces, des disciplines souvent banalisées et par certains aspects parfois contestées. Concernant les produits de santé, les divergences de perceptions du grand public associées à l'évolution incessante des besoins et exigences des patients a fait émerger un nombre impressionnant de produits sur le marché pour répondre à des indications multiples. Parfois naturels, parfois chimiques, souvent inoffensifs, potentiellement toxiques en cas de mésusage, les produits de santé sont pourtant souvent loin de toute suspicion. Bien que soumis à des contrôles réguliers, aujourd'hui, la facilité d'accès principalement par le biais d'internet à des produits de santé en tout genre, qu'ils soient médicaments, compléments alimentaires ou autres dispositifs médicaux, force les autorités à unifier les législations et à renforcer les contrôles qualité concernant ces substances.

Cependant, au vu de la quantité indénombrable de produits envahissant le marché, il est nécessaire d'avoir recours à diverses techniques d'analyse pour contrôler la qualité des produits proposés. Les techniques analytiques actuelles et accessibles dans les laboratoires de contrôle institutionnels nécessitent une évolution régulière pour assurer en tout point la sécurité des consommateurs. Encore à l'heure actuelle, la plupart de ces techniques nécessitent des mises au point expérimentales ou des préparations d'échantillons parfois extrêmement chronophages.

Bien que notre approche soit assez éloignée d'une application conventionnelle de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à visée structurale, nous montrerons ici que cette spectroscopie peut être tout à fait pertinente pour l'analyse de produits de santé.

Si l'on considère de façon plus générale l'intérêt de la RMN, elle permet l'utilisation de méthodologies semblables -tant pour la préparation des échantillons que pour l'enregistrement des données- pour de très nombreuses applications dans des domaines variés tels que la biochimie, l'agro-alimentaire ou encore la pharmaceutique. La RMN du proton en particulier, présente un intérêt par sa non-spécificité, elle permet d'obtenir l'empreinte spectrale complète d'un échantillon, sans se limiter à une molécule cible. De plus, elle permet l'obtention d'informations structurales, conformationnelles, quantitatives ou dynamiques, elle peut permettre également l'évaluation de degré de pureté, de ratio isotopiques et d'excès énantiomériques, données de première importance pour évaluer la qualité des

produits de santé. L'évolution de la technique est associée aux développements technologiques visant à atteindre une meilleure sensibilité et une meilleure résolution spectrale au travers de la production d'aimants supraconducteurs à toujours plus haut champ, procurant aujourd'hui des champs magnétiques stables jusqu'à 23,5 T (*i.e.* 1 GHz), mais aussi au travers du développement de sondes cryogéniques permettant un gain de sensibilité considérable.

Utiliser des champs magnétiques aussi élevés permet l'étude de milieux extrêmement complexes, de fait, dans le premier chapitre de cette thèse, des problématiques liées aux compléments alimentaires et au phénomène d'adultération seront étudiés. Dans une première partie, la présence illicite de médicaments à visée érectile et/ou de leurs analogues dans un complément alimentaire sera détaillée. La seconde partie montrera elle, que diverses méthodologies RMN peuvent être utilisées pour adapter les analyses aux formulations extrêmement diversifiées qui constituent les compléments alimentaires utilisés pour améliorer les performances sportives.

Les développements technologiques associés à cette course aux hauts champs magnétiques induisent cependant une instrumentation volumineuse nécessitant d'être manipulée par un spécialiste dans un environnement dédié. En outre, le coût d'une telle instrumentation et la nécessité d'utiliser des fluides cryogéniques entravent son utilisation dans les postes de contrôles et les pays émergents, favorisant l'utilisation de techniques plus accessibles telles que l'infra-rouge (IR) ou les techniques chromatographiques.

Dernièrement une alternative à ces instrumentations contraignantes et onéreuses est apparue au travers d'une nouvelle génération de spectromètres RMN à bas champ, permettant l'obtention de champs magnétiques extrêmement stables en utilisant des aimants permanents ne nécessitant pas d'entretien cryogénique. Ces spectromètres également appelés « RMN de paillasse » possèdent des caractéristiques plus adaptées à des postes de contrôles et aux pays en voie de développement, permettant entre autres de travailler avec un environnement magnétique incompatible avec un spectromètre haut champ, directement sur une paillasse. Ils permettent de sonder différents noyaux et dans certains cas autorisent l'utilisateur à travailler en milieu non-deutéié grâce à des systèmes de lock externe. Le développement technologique associé à ces spectromètres a permis leur utilisation fructueuse dans de nombreux domaines qui ne cessent de s'étendre.

Cependant, travailler avec des champs magnétiques de l'ordre du tesla induit une diminution drastique des performances analytiques tant au niveau de la sensibilité que de la résolution. La diminution intrinsèque de l'étalement en fréquence directement liée à la diminution du champ résulte en des spectres souvent très recouverts dont l'interprétation est complexifiée par des couplages forts *a contrario* des spectres obtenus avec un haut champ magnétique.

Dans la majorité des formulations pharmaceutique, les actifs sont présents à des concentrations ne nécessitant pas obligatoirement les performances atteintes par les spectromètres RMN à haut champ. Dans ce contexte, l'objectif principal du second chapitre présenté dans cette thèse était d'évaluer la capacité des spectromètres RMN de paillasse pour mettre en évidence, par des expériences monodimensionnelles, des cas de médicaments falsifiés. Dans l'éventualité où ces expériences ne procureraient pas d'informations suffisantes la seconde partie de ce second chapitre, traite de la première mise en point et application d'expériences RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) visant à obtenir une séparation virtuelle des composés en mélange grâce à leurs coefficients d'auto-diffusion. L'utilisation de bobines de gradients étant un prérequis incontournable, nous avons pour ce projet travaillé dans le cadre d'une collaboration sur le premier spectromètre RMN bas champ équipé de bobines de gradients.

Une partie des travaux réalisés dans cette thèse est présentée sous la forme de publications scientifiques écrites durant ces 3 années de doctorat. Les publications parues et acceptées, ont été soumises à un procédé d'évaluation par des chercheurs du domaine. Certaines d'entre elles n'ont pas été présentées dans le cœur de ce manuscrit et seront données en annexe, elles sont toutefois liées à l'analyse par RMN de compléments alimentaires, de médicaments ou à l'exploration des potentialités de la RMN bas champ.





---

# Partie 1

---



# 1 Les compléments alimentaires, leurs possibles adultérations et leurs méthodes d'analyse

## 1.1 Les compléments alimentaires

### 1.1.1 Définitions et premières tentatives d'harmonisations européennes

Bien que les compléments alimentaires soient devenus des produits de consommation courante, leur grande diversité rend leur définition problématique. Nous allons voir que la construction d'un cadre législatif autour des compléments alimentaires est une démarche très récente et encore en construction. Les étapes importantes de la mise en place d'un cadre législatif et réglementaire pour les compléments alimentaires en France et en Europe sont schématisées dans la Figure 1 nous y ferons référence tout au long de ce chapitre introductif.

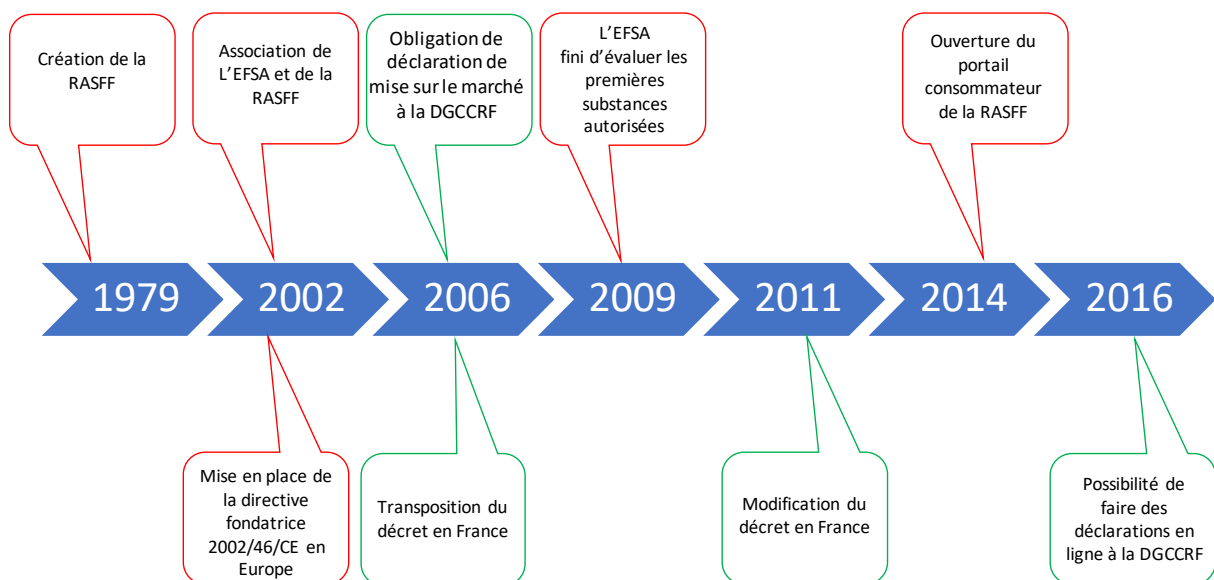


Figure 1: Récapitulatif des principales étapes législatives ou réglementaires en Europe (rouge) et en France (vert).

Le 10 juin 2002 pour la première fois en Europe, les états membres du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne se réunissent pour définir une directive fondatrice (Figure 1) donnant enfin un réel statut aux compléments alimentaires. Ce traité, appelé directive 2002/46/CE<sup>1</sup>, est basé sur 20 observations et fait ressortir 4 idées principales. Ces dernières relatent, en somme, le fait que (i) de plus en plus de produits sont placés sur le marché au titre d'aliment dans le but de compléter un déséquilibre nutritionnel induit par (ii) une alimentation « non idéale ». Parmi ces quatre observations, il est aussi mentionné le fait que (iii), jusqu'alors, les règles régissant ces produits ne sont que des lois nationales, pouvant à long terme entraver leur libre circulation. Constatant que (iv) des produits

diversifiés peuvent entrer dans la définition d'un complément alimentaire, cette première directive porte uniquement sur les vitamines et les minéraux présents dans lesdits compléments alimentaires. Elle régit ces substances par une « liste positive », faisant également apparaître la notion de dose maximale journalière.

Ainsi apparaît la première définition d'un complément alimentaire : *«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, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité »*. Comme précisé ci-dessus, le terme de « nutriment » n'inclut donc ici que les vitamines et les minéraux ; le terme « substances à but nutritionnel ou physiologique », bien qu'évoqué, n'est pas défini dans la directive fondatrice et laisse toujours place à une individualité nationale quant à la volonté de classer un composé dans la catégorie des compléments alimentaires, comme rapporté par Silano *et al.* en 2011.<sup>2</sup>

### 1.1.2 Compléments alimentaires et régulation

Contrairement à ce qui est imposé pour les médicaments et que nous verrons dans la deuxième partie du manuscrit, les compléments alimentaires ne sont soumis à aucune autorisation de mise sur le marché du fait de leur classification en tant qu'aliment. Pourtant, comme précisé dans la directive 2004/24/EC (régulant les médecines traditionnelles), certaines plantes ou extraits pourraient, en fonction des lois nationales adoptées, être inclus autant dans la catégorie des compléments alimentaires à base de plantes, que dans celle des médicaments traditionnels.<sup>2</sup>

Ils demeurent, par contre, soumis à la réglementation en vigueur pour les aliments et produits alimentaires, comme les règles d'hygiène et sécurité (Régulation (EC) 852/2004), les règles de niveaux maximum de contamination (Régulation (EC) 1881/2006) et les règles sur les nouveaux aliments (Régulation (EC) 258/97). A titre d'illustration la Figure 2 met en évidence les frontières parfois faibles entre les 3 catégories précédemment discutées, les aliments, les compléments alimentaires et les médicaments. Nous reviendrons sur la perméabilité de ces frontières lorsque nous aborderons la notion d'adultération dans la partie 1.2

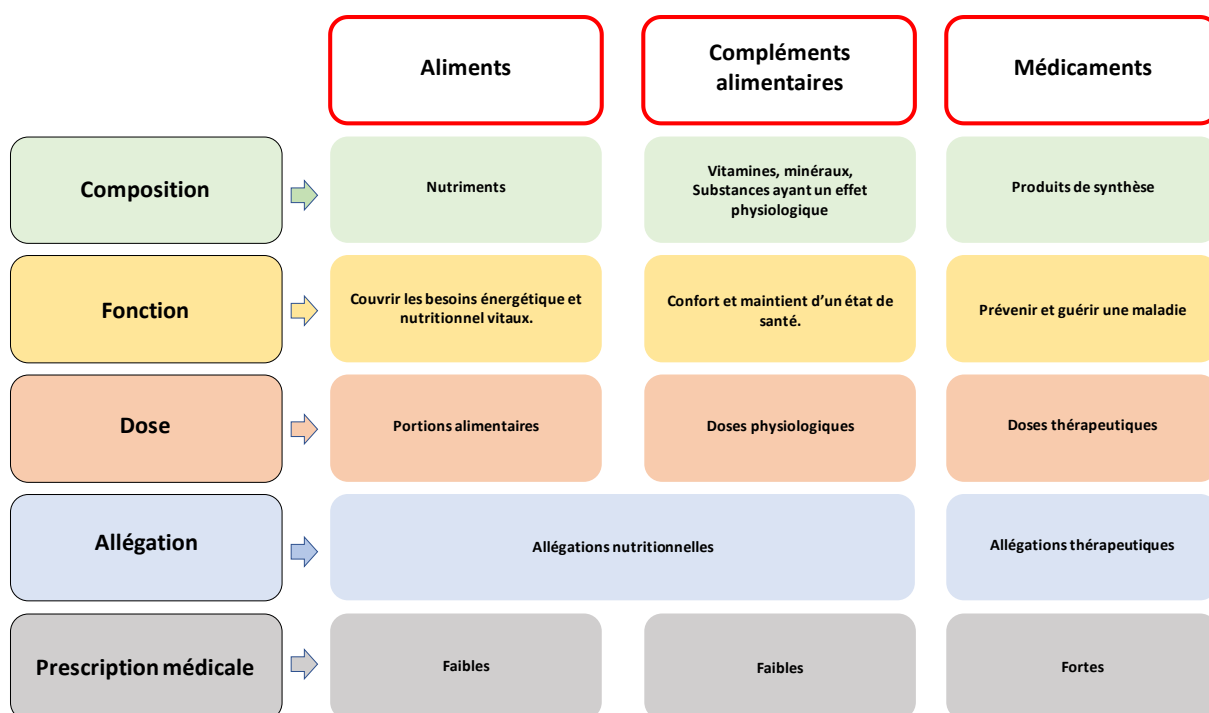


Figure 2 : Caractéristiques principales de 3 classes de produits : les aliments, les compléments alimentaires et les médicaments. Adapté de la référence 11.

A la suite de la directive fondatrice, des réformes ont été mises en place quant aux allégations qui peuvent être portées entre autres sur :

- Les emballages (article 6,2 « L'étiquetage des compléments alimentaires, leur présentation et la publicité qui en est faite n'attribuent pas à ces produits des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison d'une maladie humaine, ni n'évoquent ces propriétés. »)
- L'étiquetage (article 6,3 « Sans préjudice de la directive 2000/13/CE, l'étiquetage porte obligatoirement les indications suivantes :

a) le nom des catégories de nutriments ou substances caractérisant le produit ou une indication relative à la nature de ces nutriments ou substances ;

b) la portion journalière de produit dont la consommation est recommandée ;

c) un avertissement contre le dépassement de la dose journalière indiquée ;

d) une déclaration visant à éviter que les compléments alimentaires ne soient utilisés comme substituts d'un régime alimentaire varié ;

e) un avertissement indiquant que les produits doivent être tenus hors de la portée des jeunes enfants. »).

Elles ont été explicitées respectivement dans les Règlement CE n°1924/2006<sup>3</sup> et Règlement (UE) n°1169/2011<sup>4</sup> c'est-à-dire 4 et 9 ans après l'élaboration de la directive fondatrice correspondant au début de la prise de conscience européenne.

### 1.1.2.1 Un contrôle de la composition encore très disparate au sein de l'UE

Un point primordial pour un scientifique réside dans les dispositions concernant le contrôle qualité de ces substances, le cadre régissant le contrôle reste encore relativement confus et très dépendant du niveau d'exigence de l'état dans lequel le complément alimentaire est fabriqué et/ou commercialisé, comme explicité dans l'article 10 de la directive 2002/46/CE : « *Pour faciliter un contrôle efficace des compléments alimentaires, les États membres **peuvent** exiger que le fabricant ou le responsable de la mise sur le marché sur leur territoire informe l'autorité compétente de cette commercialisation en lui transmettant un modèle de l'étiquetage utilisé pour ce produit* ». On comprend, dès lors, que, bien que cette directive eût pour but d'unifier les lois européennes autour des compléments alimentaires, l'individualité de chaque pays garde finalement, tant au niveau gouvernemental qu'au niveau des fabricants eux-mêmes, une place importante au niveau de la qualité des produits échangés.

Il existe donc un flou juridique d'une part au niveau de la définition de ce qu'est un complément alimentaire, et d'autre part du point de vue de la manière dont ce marché doit être régulé.

Pour tenter de pallier d'éventuelles dérives inter état membre, il existe en Europe depuis l'année 1979 un système d'alerte appelé Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)<sup>5</sup> qui s'est associé à l'European Food Safety Authority (EFSA)<sup>6</sup> dès sa création en 2002 (Figure 1). Pendant 12 ans, ce système est resté relativement peu accessible, permettant aux états membres, à la commission des membres et managers du système et à l'EFSA d'échanger via un réseau de notifications quant aux produits alimentaires impliquant de potentiels risques sanitaires. Ce système, proche de son pendant Américain la Food and Drug Administration (FDA), avait quand même le défaut majeur d'être difficilement accessible au grand public. Cependant, depuis juin 2014, un portail pour les consommateurs a été ouvert,<sup>7</sup> permettant aux utilisateurs de se procurer des informations sur les compléments alimentaires induisant des problèmes de santé publique. L'EFSA de son côté a pour but principal de contrôler la sécurité et la biodisponibilité de façon individuelle des substances autorisées par la liste positive créée par le parlement européen, et, d'approuver ou non l'inclusion sur cette liste de nouvelles substances sur demande des états membres. Ce n'est, cependant, qu'en 2009 que l'EFSA a achevé les premières évaluations complètes des substances utilisées comme sources de vitamines et de minéraux dans les compléments alimentaires actuellement commercialisés dans l'UE. De plus L'EFSA s'efforce de faire valoir les règles de l'article 5 de la directive 2002/46/CE visant à spécifier sur chaque composé les doses maximales et minimales nécessaires à l'organisme ainsi que celles ajoutées, dans le but principal d'éviter le surdosage potentiellement dangereux pour l'homme.

On voit donc qu'au niveau européen, malgré des définitions encore incomplètes, des institutions émergent dans le but de surveiller le marché des compléments alimentaires. Etant donné la marge de manœuvre laissée aux états membre, on est en droit de se demander quelle est la situation en France ?

### 1.1.2.2 Une réglementation française plus stricte

En France, c'est seulement 4 ans plus tard, le 20 mars 2006, que la directive fondatrice est transposée (Figure 1).<sup>8</sup> Il est modifié 5 ans plus tard par le décret 2011-329 du 25 mars 2011, reprenant dans la très grande majorité les règles établies dans la directive fondatrice. Deux modifications majeures y sont apportées. La première redéfinit le terme « substances à but nutritionnel ou physiologique », qui restait pour l'instant à l'appréciation de chacun, comme des « *substances chimiquement définies possédant des propriétés nutritionnelles ou physiologique* » (ex : caféine, chitosan...) (Chapitre 1<sup>er</sup> article 2). La seconde tente de régir la commercialisation de ces compléments alimentaires. En effet, depuis 2006, il est devenu obligatoire en France de déposer une déclaration de première mise sur le marché à la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF)<sup>9</sup> répondant à l'ensemble des exigences décrites dans les articles 15 et 16 du décret 2006-352. Depuis le 26 avril 2016, la DGCCRF facilite le dépôt de dossier grâce à un site internet.<sup>10</sup> Ce site répertorie aussi les compléments alimentaires d'ores et déjà contrôlés et approuvés par ce même organisme.

Après le dépôt de dossier, la DGCCRF a un délai légal de 2 mois pour donner son accord quant à la commercialisation du produit. Au-delà de ce délai, la situation reste encore obscure mais semble, comme indiqué dans les articles 6 et 7, être en totale faveur du fabricant étant donné qu'un accord tacite sera passé.

Bien que, concernant les compléments alimentaires, au niveau législatif, la France soit un des pays les plus réglementés, on peut quand même lire dans la transposition du décret en France : « *Une procédure de reconnaissance mutuelle en accord avec les principes émis par la Directive 2002/46/CE permet de demander l'autorisation de commercialiser des compléments alimentaires dont au moins un ingrédient n'est pas autorisé en France, mais est légalement utilisé dans un autre Etat membre. L'administration ne peut s'y opposer ou limiter son autorisation que si elle apporte la preuve d'un risque pour la santé humaine (Règlement (CE) n°764/2008)* ». Le décret laisse donc la porte ouverte à la circulation dans notre pays de produits potentiellement à risques...jusqu'à preuve effective de la véracité du risque.

Malgré les diverses tentatives de l'Union Européenne pour légiférer le marché des compléments alimentaires, il n'émerge pas de définition claire et communément admise. De plus, on se rend rapidement compte que de nombreux points peuvent laisser place aux interrogations quant à la



conformité totale des produits trouvés sur le marché avec les lois européennes. L'enjeu du développement du cadre législatif est fortement intriqué avec l'étendue sociétale du phénomène. Il est dès lors aussi important de définir ce à quoi on se réfère que d'en évaluer l'incidence dans la société afin, en retour, de mieux poser les contours de la définition. Cet enjeu ne peut se comprendre qu'en analysant plus précisément le marché, son importance, ses modalités (sous-catégories, canaux de distribution...), et son évolution. Afin de bien garder les informations principales à l'esprit, la Figure 1 récapitule les grandes décisions prises en Europe (en rouge sur la Figure 1) et en France (en vert sur la Figure 1)

Il est quand même bon de noter à ce stade que toutes ces lois ne concernent que les produits Européens et, à l'heure du libre-échange mondialisé via le commerce électronique, n'incluent en aucun cas les produits du marché de l'importation par exemple en provenance du marché Chinois ou Américain. Nous allons maintenant nous intéresser au positionnement des compléments alimentaires vendus en Europe dans le marché mondial.

### 1.1.3 Marché Européen

#### 1.1.3.1 Données commerciales

Bien qu'il soit difficile d'estimer précisément la valeur du marché mondial des compléments alimentaires, en particulier du fait des mêmes difficultés de définition que celles abordées dans le paragraphe précédent, le Syndicat National des Compléments Alimentaires (Synadiet)<sup>11</sup> publie régulièrement des estimations. Les plus récentes font varier de 175 à 200 milliards d'euros le chiffre d'affaire du marché des compléments alimentaires dans le monde.

En Europe, les estimations indiquent un chiffre d'affaires variant de 10 à 14 milliards d'euros, faisant de l'Europe le 3<sup>ème</sup> plus grand distributeur de compléments alimentaires derrière l'Asie (1<sup>er</sup>) et l'Amérique du Nord (2<sup>ème</sup>). En Europe, quatre pays représenteraient à eux seuls 60% des ventes du marché : l'Italie (19%), la France (15%), l'Allemagne (14%) et le Royaume Uni (12%) (Figure 3). Ce marché correspond à une dépense annuelle moyenne de 18 euros par foyer européen.<sup>12</sup>

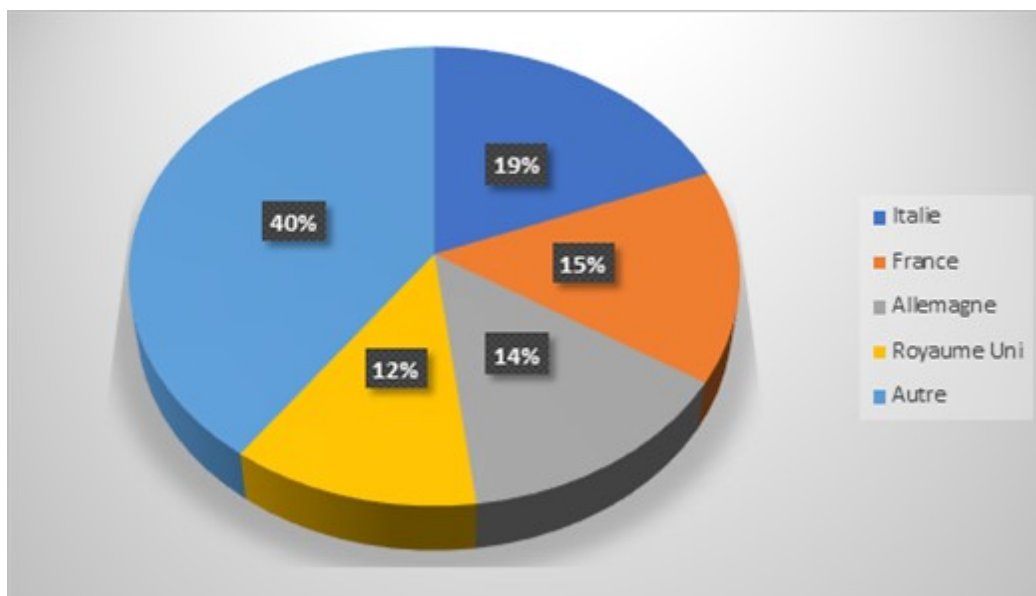


Figure 3 : Répartition des ventes de compléments alimentaires en Europe, en 2015. Adapté de la référence 12.

### 1.1.3.2 Consommation : Impacts et tendances

Bien qu'il soit possible de fournir des données chiffrées quant aux ventes de compléments alimentaires, il est par contre très complexe de donner des chiffres précis en ce qui concerne leur consommation, comme explicité dans l'étude de Skeie *et al.* en 2009.<sup>13</sup> Dans cette étude Skeie montre que dans certains états de l'Union Européenne (principalement les états scandinaves), plus de 50% de la population aurait déjà eu recours à un complément alimentaire, quand certains états ne dépassent pas les 5%. Ces différences notables entre les valeurs données sont principalement dues à l'ambiguïté régnant autour de la définition d'un complément alimentaire. En effet certaines études incluent par exemple des substances homéopathiques, naturopathiques ou encore médicales dans la catégorie des compléments alimentaires. Dans son étude Skeie lui-même admet avoir comptabilisé des médicaments contenant des nutriments ou des vitamines, comme par exemple des associations paracétamol-Vitamine C, bien qu'ils décrivent dans leur article utiliser la directive 2002/46/CE précédemment discutée. Cette difficulté à savoir ce que l'on peut ou non inclure dans la définition d'un complément alimentaire en Europe conduit à des études menées sur des cohortes de population très restreintes, avec des définitions de compléments alimentaires changeantes à chaque fois, impliquant une grande disparité au niveau des résultats de chaque étude,<sup>14</sup> et de fait rendant leur comparaison peu pertinente.

Une étude d'Alvarez<sup>15</sup> réalisée sur 2359 participants au travers de 6 pays européens (Finlande, Allemagne, Italie, Roumanie, Espagne et le Royaume-Uni) sur la consommation de compléments

alimentaires uniquement à base de plantes reporte que 18,8% de la population européenne aurait déjà consommé un complément alimentaire. Cette étude est globalement en accord avec les chiffres nationaux donnés pour les ventes de compléments alimentaires. Ainsi, l'Italie possède le taux de consommateurs de compléments alimentaires le plus élevé en Europe avoisinant les 23% de la population, suivie par le Royaume-Uni (19%). L'Allemagne, avec une consommation avoisinant les 17%, est en milieu de tableau, loin devant la Finlande, qui boucle la marche avec une consommation moyenne d'uniquement 9%. Dans son étude Alvarez insiste sur le fait qu'il est difficile de faire une étude pertinente entre différents pays et exprime même la nécessité de redéfinir ce que l'on inclut ou pas dans un complément alimentaire, il regrette notamment le fait que ne nombreuses études, laissent aux consommateurs l'appréciation de définir eux-mêmes un complément alimentaire.

Bien qu'en Europe il soit encore difficile d'évaluer l'évolution de la consommation de compléments alimentaires, la majorité des études semblent s'accorder sur le fait que les plus gros consommateurs de compléments alimentaires sont des femmes d'âges mûrs avec un niveau socio-économique relativement important, mais également les personnes avec une activité physique régulière. En parallèles, d'autres études montrent également la prévalence de ce genre de consommation par des personnes atteintes de pathologies sévères, tels que les cancers.<sup>16-17</sup>

Quel que soit le cadre des différentes études, et bien qu'il soit difficile de les évaluer avec précision, les ventes de compléments alimentaires n'en demeurent pas moins en perpétuelle progression. Plusieurs raisons peuvent venir expliquer cette tendance. Tant au niveau des fabricants que des consommateurs, trois raisons principales sont invoquées.

La première et la principale reste la perte de confiance envers les médecines conventionnelles, associée à un intérêt croissant pour les « médecines alternatives ». La seconde est plus une conviction ou perception qu'une réelle raison. En effet, les produits à base de plantes sont communément considérés comme plus sûrs, plus sains, et sans risque pour la santé. Enfin, la tendance croissante pour l'auto médication, associée au fait que ces produits ne nécessitent pas de prescription médicale semblent rassurant pour les consommateurs, persuadés qu'ils sont capables sans avis médical de discerner ce qui est bon pour leur corps et ce qui ne l'est pas.<sup>14, 16, 18</sup> Bien que les retours soient encore faibles à ce niveau, l'opinion des consommateurs quant à l'efficacité et la neutralité de ces produits est de plus en plus affectée par des publicités en quantités croissantes, notamment sur les réseaux sociaux, sous la forme de spam, de publicités ou bien au travers de ce que les marques aiment appeler des « influenceurs », qui au travers de leurs vidéos tendent à démocratiser voire à banaliser l'utilisation de ces produits pour tout genre d'utilisation. En effet, il est fréquent qu'une personnalité soit sponsorisée par une marque de compléments alimentaires, afin d'en vanter les mérites. Rappelons

pourtant que la directive fondatrice impose que : « *L'étiquetage des compléments alimentaires, leur présentation et la publicité qui en est faite n'attribuent pas à ces produits des propriétés de prévention, de traitement ou de guérison d'une maladie humaine, ni n'évoquent ces propriétés.* » Pourtant des études menées en France par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) montrent qu'environ 15% des achats sont suscités par ces « publicités ».<sup>19</sup>

Le marché Européen des compléments alimentaires, bien que relativement vaste, peut quand même être subdivisé en grandes familles. Celles qui dominent pour l'instant ce marché restent celles englobant le bien être, la prévention de maladies, l'amélioration de l'apparence physique, et l'amélioration des performances sexuelles et des performances sportives.<sup>16, 20</sup>

### 1.1.3.3 Le marché en France

Le marché est globalement plus facile à étudier à l'intérieur même d'un pays, puisque, dès lors, la variabilité des lois locales ne rentre plus en jeu. En France, le marché des compléments alimentaires représentait en 2017 1,704 milliards d'euros, soit une hausse de +5,8% par rapport à l'année 2016. A noter que cette hausse est incessante depuis 2011 et correspond à une augmentation globale de 41% en 6 ans.

D'après l'ANSES en France<sup>19</sup> et l'étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA2 ; terminée en 2007), environ 20% de la population française de plus de 3 ans consommerait des compléments alimentaires. Depuis, toujours selon l'ANSES, près de 29% des adultes de 18 à 79 ans consommeraient des compléments alimentaires. Les Français ont aussi tendance à prendre les compléments alimentaires sous forme de cures, souvent préventives, principalement en hiver, rendant une fois encore difficilement définissable la notion de consommation et de fait difficilement évaluable les quantités consommées. Ceci met encore en avant le fait que le marché du complément alimentaire est quasi impossible à recenser de façon exhaustive.

Les ventes en France se répartissent de manière sensiblement différente de ce qu'elles sont en Europe. Elles s'articulent principalement autour de 3 grandes familles : minceur, vitalité et stress ou troubles du sommeil.

Comme montré dans la Figure 4, le circuit de distribution classique s'effectue principalement via les pharmacies. Cependant, on note une nette implantation de la vente via internet de ces substances.<sup>21</sup> A noter que les catégories dominantes diffèrent en fonction du circuit de vente.

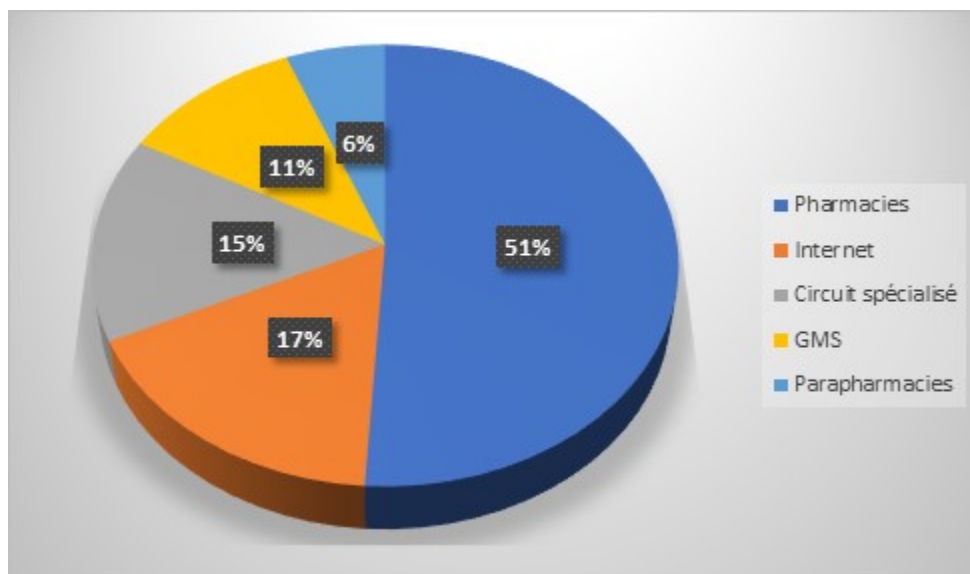


Figure 4 : Circuits de distributions des compléments alimentaires en France en 2017. GMS : Grandes et Moyennes Surfaces. Extrait de la référence 21.

#### 1.1.3.4 La nécessité de contrôle des canaux de distributions

Les chiffres que j'ai présentés ne correspondent très probablement, qu'à la partie visible de l'iceberg. En effet, la grande majorité des données disponibles, en France ou en Europe, n'incluent pas les ventes dites d'importation, du fait de la quasi impossibilité de mettre des données chiffrées sur les transactions réalisées via internet. En effet, ces importations proviennent de zones géographiques où les lois sont encore totalement différentes de nos lois européennes. En France, la DGCCRF possède une unité spécialisée dans le contrôle de produits vendus sur Internet. D'après leur dernier rapport, en 2015, sur 78 sites internet contrôlés, 80% « *utilisaient des allégations de santé non autorisées ou des allégations faisant état de propriétés thérapeutiques, pratique strictement interdite pour les denrées alimentaires car exclusivement réservée aux médicaments* » (Figure 2). Cette veille effectuée par la DGCCRF ne constitue qu'une veille « administrative » et n'induit pas forcément de contrôle chimique des substances éventuellement présentes dans les compléments alimentaires et d'ores et déjà répréhensibles. L'étendue du marché des compléments alimentaires fait qu'il est un enjeu majeur de santé publique d'en assurer le contrôle de manière efficace. Les divers cas où un complément alimentaire peut poser problème sont regroupés sous l'appellation « d'adultération du complément alimentaire ». Il est essentiel d'avoir une vue d'ensemble de ces phénomènes d'adultération afin d'en mesurer l'ampleur.

## 1.2 Adultération

### 1.2.1 Importance du problème

Malgré une volonté commune des Etats membres de réguler au maximum le marché des compléments alimentaires, des études « post décret » semblent montrer que ce marché est encore très loin d'être en accord avec la loi. En effet, Lachenmeier *et al.*<sup>22</sup> ont montré en 2013 que seulement 30% des compléments alimentaires vendus sur internet seraient en accord avec les lois européennes, pour deux raisons principales : la présence d'allégations non autorisées et la présence de substances non approuvées. Lachenmeier reporte même le fait que les compléments alimentaires seraient le groupe de produits alimentaires le plus problématique vendu sur internet.

### 1.2.2 Définition, champ de l'étude et sources de données

Pour bien comprendre ce qu'est une substance non approuvée, au sens de la directive fondatrice, il est de prime importance de définir le terme adultération. Sa définition au sens large, couvre une vaste quantité de pratiques visant à dénaturer un produit. Plus spécifiquement, on peut définir le terme d'adultération par la non-conformité d'un produit vis-à-vis de son étiquetage. Trois raisons principales expliquent la volonté d'adultérer un complément alimentaire :

- La première est une adultération de « commodité » qui consiste à remplacer un ingrédient actif par un ingrédient inactif mais ne nécessitant aucune préparation (cas A).
- La seconde consiste à ajouter au complément alimentaire une substance réglementée, afin d'augmenter les propriétés prêtées à la substance naturelle annoncée (cas B).
- La dernière est une raison économique, qui consiste en remplacer un ingrédient cher par un qui l'est moins (cas C).<sup>23</sup>

Ces trois types d'adultérations sont d'importance variable. Un grand nombre d'adultérations par des produits de faibles qualités nutritionnelles (cas A), ou bien par l'ajout de substances naturelles resynthétisées (cas B) et ajoutées dans des doses trop importantes sont reportées.<sup>24</sup> (RASFF Allemagne/Suède 2016). Dans le cadre de manuscrit, nous nous intéresserons principalement aux compléments alimentaires adultérés par des substances pharmaceutiques, leurs dérivées, ou des substances considérées comme dopantes par les instances en vigueur (cas B). Le terme « dérivé », également largement répandu sous le nom « d'analogue », renvoie simplement à une molécule possédant le même squelette que la molécule initiale, mais avec une modification structurale faible. L'introduction de modifications structurales mineures peut permettre à l'actif de conserver les

propriétés pharmacologiques de la molécule modèle, tout en échappant à un potentiel contrôle de routine qui rechercherait uniquement des molécules ciblées. On a souvent tendance, pour décrire ce genre de pratique à dire que le complément alimentaire devient alors un « médicament par fonction », en effet en reprenant la Figure 2, on voit que la frontière au niveau de la composition est franchie, donnant à ce complément alimentaire une fonction outrepassant celle initialement invoquée.

Au vu de la perception 100% naturelle et sans effets secondaires des compléments alimentaires, leurs potentiels effets secondaires ont longtemps été négligés. Bien que les cas reportés soient rares, il arrive que des composés naturels interfèrent avec des traitements médicaux en cours ou bien induisent des effets secondaires sans même être adultérés.<sup>25</sup> A plus forte raison, lorsqu'ils sont adultérés, la substance réglementée additionnelle peut induire de nouveaux effets indésirables imprévus. La démocratisation d'internet et l'accès facilité au marché noir qu'il procure autorise ces produits à traverser les frontières aisément.<sup>26-27</sup> Dès lors, ce n'est pas uniquement au marché Européen mais bel et bien à un marché global et accessible à tous qu'il faut s'intéresser. Le système Américain (la FDA) a mis en place un organisme de veille massifié depuis une trentaine d'années qui recoupe significativement plus de données que le système Européen, et qui sera donc une source intéressante d'informations pour notre étude.

### 1.2.3 Exemples de cas problématiques

Bien qu'au travers même de la définition de l'adultération on comprenne les potentiels risques englobant le marché des compléments alimentaires, peu de retours sont faits, que ce soit au niveau du grand public, mais également au niveau des grandes instances en vigueur. Pourtant, différentes études montrent que les compléments alimentaires adultérés peuvent engendrer de sérieux problèmes de santé. A Hong-Kong, entre 2004 et 2006, il a été montré que suite à l'hospitalisation de 42 patients après la prise d'un complément alimentaire amaigrissant, 28 d'entre eux avaient en réalité ingéré un ou plusieurs principes actifs médicamenteux, dont certains sont aujourd'hui interdits. Dans la même étude, Yuen *et al.* décrivent la détection de sibutramine, de fenfluramine et d'un analogue de la fenfluramine dans 3 compléments alimentaires amaigrissants, ayant induit l'hospitalisation de 4 patients.<sup>28</sup> Les substances évoquées ici seront explicitées un peu plus tard dans cette introduction.

En 2012, ce sont Cohen et son équipe qui reportent que 85% des femmes ayant pris un complément alimentaire amincissant appelé « Pai You Go » ont rencontré un effet secondaire ; ce complément alimentaire a été retiré du marché, car il contenait de la sibutramine. Autre fait alarmant : bien que la FDA et son système d'alerte soient aux Etats Unis bien plus connus auprès du grand public que ne l'est

la RASFF en Europe, Cohen rapporte que 61% des consommateurs ont acheté ce complément après son rappel par la FDA.<sup>29</sup>

Deux ans plus tard, Cohen étudie 27 compléments alimentaires au moins 6 mois après leur rappel par la FDA et en détecte 18 adultérés, dont 12 avec le même adultérant qu'avant leur rappel et 6 contenant un analogue différent ou une association de substances.<sup>30</sup>

### 1.2.4 Catégories de compléments alimentaires et ancrage sociétal

Comme étudié dans la revue de Rocha *et al*,<sup>31</sup> il existe divers types de compléments alimentaires adultérés. Parmi les compléments alimentaires qui ont été adultérés par ajout d'une substance indue (cas B), les trois catégories les plus fréquemment retrouvées sont : les compléments alimentaires amincissants, les compléments alimentaires érectiles et les compléments alimentaires pour sportifs. Ces 3 familles sont liées par des idéaux propres à notre société de consommation, à savoir l'apparence et les performances physiques. Bien que ces valeurs soient entrées dans les mœurs, elles sont toutes deux à l'origine de malaises ou complexes parfois difficilement avouables même à des professionnels de santé, et poussent le consommateur à l'auto-médication, favorisant de fait l'achat hors des circuits de distributions classiques en particulier sur internet. C'est pourquoi nous nous intéresserons principalement à ces classes-ci pour la suite. Ce choix est d'autant plus justifié qu'à elles 3, elles représentent plus de 95% des alertes lancés par la FDA sur les compléments alimentaires en suivant la répartition donnée ci-après (Figure 5).

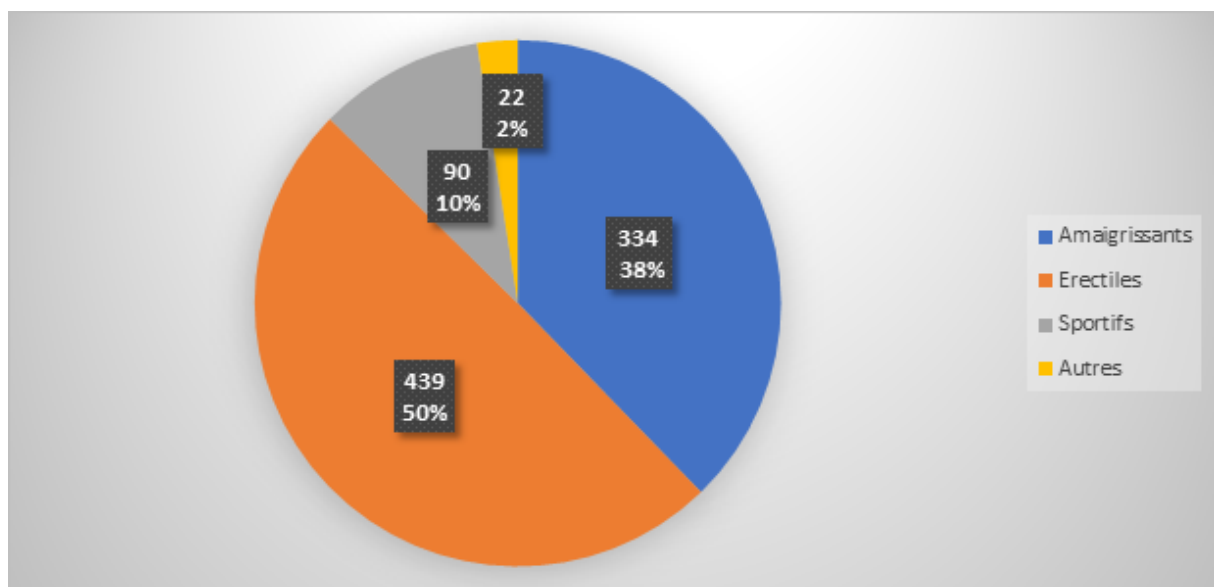


Figure 5 : Alertes FDA lancées sur les différentes catégories de compléments alimentaires entre 2007 et 2018. Pour un total de 885 cas reportés. Adapté de la référence 34.



#### 1.2.4.1 Compléments alimentaires pour la perte de poids

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) « *le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs pour un certain nombre de maladies chroniques* ». Or, ces problèmes affectent des millions de personnes de tous niveaux sociaux et principalement dans les pays développés. De plus, la société véhicule l'image idéalisée que la maigreur est signe de bonne santé. De ce fait, nombreux sont ceux qui ont tendance à chercher des solutions miracles pour la perte de poids, permettant ainsi de ne pas changer son rythme de vie tout en gardant une apparence saine. Ces constats mettent en évidence les raisons pour lesquelles le marché des compléments alimentaires est à la fois si florissant et autant « à risque » face à l'adultération. Lorsque l'adultération de préparations amaigrissantes est avérée, ce sont souvent les mêmes substances actives que l'on retrouve : des anorexiques (sibutramine, rimonabant, fenproporex etc...), des stimulants (éphédrine, noréphédrine et synéphrine), des anxiolytiques (divers benzodiazépines), des antidépresseurs (fluoxétine, sertralines...), et des laxatifs (principalement de la phénolphtaléine).<sup>32</sup> La plupart des substances détectées sont soit des substances très régulées soit des substances d'ores et déjà bannies à cause des effets secondaires engendrés sur l'homme. La substance la plus communément utilisée pour adultérer ces produits amincissants reste encore la sibutramine, un anorexique dérivé de l'amphétamine dont les mécanismes d'action ont été explicités à nouveau par Deconinck<sup>33</sup> et dont la finalité est d'agir comme un coupe-faim. Ce composé avait été approuvé par la FDA en 1997, mais en 2010 il a été retiré du marché tant en Europe qu'aux Etats Unis pour les risques cardiaques qu'il engendrait principalement sur les patients avec des faiblesses cardiaques avérées. Sur les 885 alertes publiques reçues par la FDA entre 2007 et 2018, 38 % concernaient les compléments alimentaires amincissants, et 89% d'entre eux impliquaient l'ajout de Sibutramine.<sup>34</sup> Dans le même laps de temps en Europe, 68 cas d'adultération à la sibutramine ont été reportés grâce au RASFF, relatant principalement un problème associé à l'importation de produits en provenance d'Asie mais également des Etats-Unis.<sup>35</sup> Parmi les substances les plus détectées, on trouve également des dérivés d'alcaloïdes, majoritairement l'éphédrine et la synéphrine qui sont des stimulant entraînant un effet coupe-faim, mais aussi la présence de phénolphtaléine (20 cas reportés pour la RASFF, et 83 pour la FDA), un laxatif retiré de la vente en 1997 du fait de ses propriétés cancérigènes. Cependant, encore de nos jours, ces substances sont retrouvées de façon récurrente dans les formulations de compléments alimentaires amincissants. Plus récemment, plus exactement depuis 2015, la FDA note une augmentation significative des cas d'antidépresseurs détectés (ici 14) dans des formulations amaigrissantes, alors que la RASFF ne reporte à l'heure actuelle aucune notification à ce sujet. En effet pour beaucoup d'antidépresseurs l'effet coupe faim est l'effet secondaire le plus reporté.

#### 1.2.4.2 Compléments alimentaires pour la performance sportive

Le monde des compléments alimentaires pour sportifs est un peu différent de celui des amincissants. Pourtant, il est fréquent que ces athlètes, pour des raisons esthétiques, en viennent également à prendre des compléments pour perdre du poids et brûler des graisses.<sup>36</sup> Ce milieu pourrait quasiment se subdiviser en 2 sous catégories : le monde professionnel et le monde amateur. Bien qu'à cause des problèmes de définition des compléments alimentaires et des contours du marché, évoqués précédemment, les données chiffrées n'existent pas vraiment, il semblerait cependant que le monde professionnel soit un des milieux les plus consommateurs de compléments alimentaires.<sup>36</sup> Il est reconnu dans ce monde de sportifs que l'alimentation est un facteur quasi aussi important que le sport en lui-même pour les performances. Cependant, une alimentation extrêmement restrictive en certains aliments et riche en d'autres entraîne des déséquilibres nutritionnels. Cette situation un peu paradoxale, car les athlètes se refusent à manger des ingrédients qui sont pourtant indispensables pour leurs performances, fait qu'ils finissent par prendre des compléments alimentaires pour combler leurs propres privations.<sup>37</sup> Le monde amateur n'est pas pour autant épargné par ce phénomène mais sa consommation est à l'heure actuelle bien moindre que celle du milieu professionnel, et bien moins codifiée. En effet, dans le monde amateur on reporte régulièrement des prises abusives, et un usage récréatif. Une autre problématique cette fois spécifique à ce genre de substance, est qu'il est extrêmement fréquent de retrouver sur le marché des produits ne dissimulant absolument pas l'ajout de substances formellement interdites par les instances en vigueur, reflétant encore une fois le vide juridique encadrant le monde des compléments alimentaires.

L'agence mondiale de lutte contre dopage (WADA ou AMA en français) ne sanctionne par contre à l'heure actuelle que les athlètes professionnels. Mais, ce qui peut aisément se comprendre, elle ne fait pas de distinction entre le dopage volontaire et le dopage involontaire via les substances présentes dans les compléments alimentaires alors qu'elles ne devraient pas y être, mais qui sont quand même illégales du point de vue des règles sportives.<sup>38</sup> De plus, il suffit de regarder l'actualité du sport - et notamment la destitution et la condamnation du coureur cycliste espagnol arrêté en 2017 avec 50 picogrammes de clenbutérol dans le corps - pour se rendre compte que des doses infinitésimales suffisent à un contrôle positif.

C'est pour ces raisons que, les règles très strictes régissant le dopage dans le milieu du sport de haut niveau, sont incompatibles avec le monde des compléments alimentaires. En effet, le faible niveau d'exigence quant à la qualité de ces produits a déjà mis en lumière la présence de stéroïdes anabolisants ou encore d'hormones par contamination croisée plutôt que par adultération

volontaire.<sup>39</sup> Les stéroïdes anabolisants, aussi appelés pro-hormones mais également les hormones, sont les substances les plus décrites en tant qu'adultérants de produits pour sportif, ils représentent d'après les notifications de la FDA jusqu'à 90% des cas. Régulièrement ces produits ne sont pas détectés uniquement à dose infinitésimale, mais à des doses potentiellement dangereuses pour l'homme.<sup>36</sup> Bien que les stéroïdes représentent la première classe de substance reportée, depuis une dizaine d'année les études mettent en évidence la diversité et la complexité des matrices de ce milieu.<sup>40-41</sup> En effet, bien que n'apparaissant pas forcément sur les rapports de la FDA ou de la RASFF de nombreuses études mettent en évidence la présence de nouveaux agents anabolisants comme les modulateurs sélectifs des récepteurs aux androgènes (SARM),<sup>42</sup> ou encore divers stimulants. Dans les études associées, les auteurs reportent en plus régulièrement la difficulté à caractériser de telles substances de façon univoque au vu de leurs proximités structurales.<sup>40-41</sup> L'intégralité de ces substances sont définies et considérées comme des « performance enhancing drugs » par le WADA, et sont de plus régulièrement non autorisées à la consommation chez l'homme. Ces substances ont souvent été décrites dans des cas d'adultération de compléments alimentaires. Bien que les agents anaboliques et les stimulants soient les substances les plus détectées, le WADA inclut une vaste diversité de produits, pouvant tous induire des contrôles anti-dopage positifs, classifiés en 10 catégories comme suit :

- S1 : agents anabolisants,
- S2 : hormones peptidiques et hormones de croissances,
- S3 : bêta-2-agonistes,
- S4 : hormones et modulateurs métaboliques,
- S5 : diurétiques et agents masquants,
- S6 : stimulants,
- S7 : narcotiques,
- S8 : cannabinoïdes,
- S9 : glucocorticoïdes,
- S10 : bêtabloquants.<sup>43</sup>

Les 5 premières catégories sont interdites « en tout temps », les 4 suivantes uniquement en compétition et les bêtabloquants ne le sont que dans certains sports.

En plus des substances « couramment » détectées, un grand nombre de substances appelées « stéroïdes modifiés »<sup>26</sup> et pour lesquels peu de données pharmacologiques et toxicologiques sont disponibles. C'est particulièrement vrai dans les compléments alimentaires étiquetés comme « améliorant les performances » qui comme nous le disions précédemment annoncent parfois des substances d'ores et déjà interdites. Bien que le WADA interdise également divers dérivés des 10 classes précédemment évoquées, la majorité des articles font encore référence aux stéroïdes anabolisants parmi lesquels on retrouve divers esters de testostérone, de l'androstènedione, de la 5-

androstèn-3 $\beta$ -ol-17-one (dehydroepiandrosterone; DHEA), de la methandrosténolone, de l'androst-4-ène-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol de la boldénone et beaucoup d'autres.<sup>26, 44-45</sup> En plus des risques législatifs associés aux contrôles anti-dopage, les sportifs en consommant ce genre de substances s'exposent à des risques importants d'effets secondaires, parmi les plus connus, on regrette la capacité de ces stéroïdes anabolisants à s'aromatiser en œstrogène (l'hormone sexuelle primaire chez la femme), entraînant des modifications physiques principalement au niveau des organes sexuels, impliquant des féminisations chez l'homme et des masculinisations chez la femme. Régulièrement pour éviter ces problèmes, on note la présence d'inhibiteurs d'aromatase (~ 10% des notifications d'après la FDA), encore une fois de façon illicite dans les compléments alimentaires.

Les grandes instances de régulation des produits de santé (telles que la FDA ou l'EFSA) ne font pas encore beaucoup référence à l'adultération de ce genre de compléments alimentaires, dans le rapport des produits contaminés de la FDA, seulement 90 notifications sur les 885 sont attenantes à l'adultération par des stéroïdes anabolisants ou des inhibiteurs d'aromatase.

#### 1.2.4.3 Compléments alimentaires érectiles

Le dysfonctionnement érectile affecterait plus de 150 millions de personnes dans le monde<sup>46</sup> et devrait concerner 300 millions d'hommes en 2025 si la croissance démographique continue ainsi.<sup>47</sup>

Le sildénafil (molécule active du Viagra<sup>®</sup>) découvert en 1998, dont le mode d'action, repose principalement sur l'inhibition de l'enzyme (phosphodiesterase-5 (PDE-5)) responsable de la dégradation des guanosines monophosphate cycliques, dont la concentration accrue par la libération de monoxyde d'azote NO est responsable de l'érection, réexplicité par Codevilla en 2013,<sup>48</sup> est très vite devenu un « best-seller ». Depuis, plusieurs molécules inhibitrices de PDE-5 sont devenues des médicaments pour le traitement du dysfonctionnement érectile : Tadalafil (Cialis<sup>®</sup>), Vardénafil (Levitra<sup>®</sup>), Avanafil (Stendra<sup>®</sup> (US)/ Spedra<sup>®</sup> (EU)), Udenafil (Zydena<sup>®</sup>), Mirodenafil (Mvix<sup>®</sup>), Iodenafil (Helleva<sup>®</sup>). Cependant, en Europe et aux Etats unis, seuls les Sildénafil, Tadalafil, Vardénafil et Avanafil sont autorisés à la vente.<sup>49-50</sup> Les effets secondaires et potentielles interactions médicamenteuses de ces substances sont très bien documentés. Pourtant, pour de nombreuses raisons, ces médicaments sont souvent utilisés à but récréatif ou bien à visée de performances et consommés hors d'un cadre thérapeutique. Ils sont souvent associés à des pratiques récréatives et donc à la prise d'alcool ou d'autres substances actives.<sup>51-52</sup> Or ces substances, en tant que médicaments, sont soumises à une réglementation stricte et sont donc relativement difficiles à se procurer sans prescription médicale. Il existe néanmoins de nombreux moyens détournés pour en obtenir et à titre d'exemple, il est estimé

qu'environ 6 millions de produits illégaux contenant des inhibiteurs de phosphodiesterase 5 (PDE5-I) sont achetés hors des circuits de santé usuels.<sup>53</sup>

De fait, beaucoup de consommateurs se redirigent vers les compléments alimentaires, encore une fois préférentiellement vers ceux annoncés « naturels ». <sup>54-55</sup> Cependant, et toujours dans la lignée de ce qui a été explicité précédemment, pour accroître l'efficacité de ces compléments on retrouve énormément des substances précédemment citées ou des analogues de ces substances. Dernièrement, une revue<sup>56</sup> a recensé plus de 80 analogues d'inhibiteur de phosphodiesterase-5 détectés dans des compléments alimentaires, dont principalement des analogues du sildénafil (Figure 6). Ce nombre d'analogue contraste grandement avec les 4 substances qui sont pour l'instant autorisées en tant que médicament en Europe.

Depuis 2007, la FDA a émis 439 notifications publiques concernant les produits érectiles, ce qui représente près de 50% du total des notifications publiques. Dans la même période de temps, 107 notifications de RASFF concernant ce genre de substances ont été reportées.

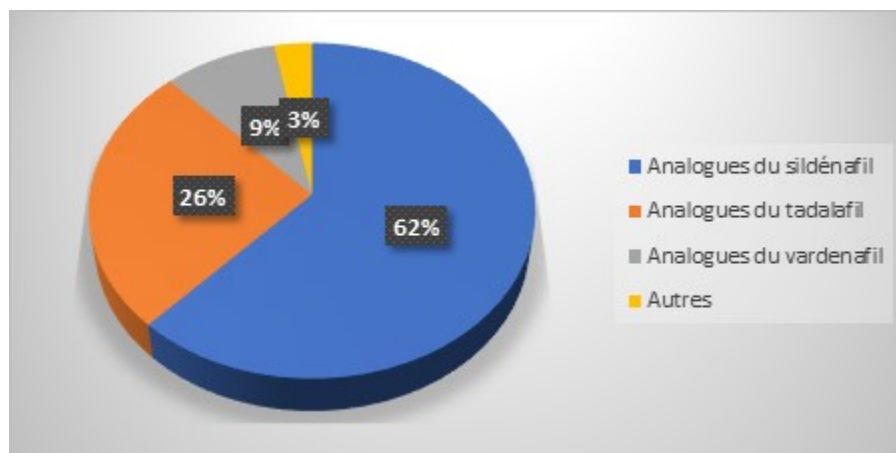


Figure 6 : Répartition des analogues de PDE-5I détectés. Extrait et adapté de la référence 56.

Certaines études laissent même penser que la tendance est plutôt à adultérer avec un analogue plutôt qu'avec la substance active même.<sup>57</sup> Dans une étude portant sur des compléments alimentaires vendues sur internet, menée sur 150 compléments alimentaires, les auteurs reportent un taux d'adultération de 61% des échantillons évalués, parmi lesquels 34% correspondent à des analogues structuraux et 21% à des substances de référence.<sup>27</sup>

#### 1.2.4.4 Nécessité d'un contrôle de leur composition

Comme reporté par Patel *et al.*<sup>58</sup> en 2014, l'adultération par des analogues structuraux a pour but évident de tromper les contrôles de routine, et de fait, les organismes de contrôle qualité. Au vu du

développement analytique incessant nécessaire pour s'adapter à l'évolution continue du marché, les laboratoires de recherche et développements industriels classiques ne suffisent plus, la recherche académique, joue donc à l'heure actuelle une place prépondérante dans cette lutte.

Malgré la tentative des scientifiques de s'adapter pour lutter face à un marché en perpétuelle évolution, le consommateur est sans cesse exposé à des risques sanitaires majeurs. Plusieurs cas problématiques ont été reportés. Notamment, en décembre 2016, le premier cas de décès dû à un complément alimentaire a été reporté aux Etats-Unis. Il a révélé post mortem que la cause de la mort était due officiellement à la toxicité aigüe du desmethyl carbodénafil, un analogue reporté du Sildénafil.<sup>59</sup>

Dans ce contexte, on comprend que l'instrumentation joue un rôle capital. Afin de mieux comprendre les techniques analytiques qui peuvent être mises en place, nous allons présenter les diverses approches qui ont été proposées dans le contexte du contrôle des compléments alimentaires.

### 1.3 Techniques d'analyse

Comme précisé précédemment, la lutte contre cette adultération de plus en plus innovante passe par le développement de méthodes analytiques qui se doivent d'être elles aussi de plus en plus novatrices. Les tendances à l'heure actuelle sont au développement de techniques ayant un rapport qualité prix favorable, notamment avec le développement de techniques portatives ou tout au moins facile d'utilisation. Cependant, nous verrons grâce à la seconde partie de ce manuscrit que ces techniques sont plus adaptés à des matrices moins complexes que celles que représentent les compléments alimentaires, bien que certaines études aient déjà montré des résultats encourageants.<sup>60</sup>

Nous essayerons ici de voir un panel large mais non exhaustif de techniques analytiques couramment appliquées pour lutter contre l'adultération des classes de produits de santé préalablement discutées, et de comprendre les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles. Ces techniques se répartissent suivant deux approches : les approches dites séparatives ou plus spécifiquement chromatographiques et les approches spectroscopiques ou spectrométriques.

En étudiant la revue de Rocha *et al.*<sup>31</sup> on se rend compte que sur les 43 publications reportant des cas d'adultération avérés, 31 (72%) utilisent des techniques séparatives en tant qu'outil principal de détection, 7 cas reportent leurs utilisations en tant que techniques complémentaires. Les techniques spectroscopiques, bien que régulièrement utilisées en tant que techniques complémentaires, ne sont-

elles utilisées que 5 fois en tant qu'approche principale. Des techniques un peu plus innovantes tels que les bio-analyses sont elles reportées 2 fois.

### 1.3.1 Approche chromatographique

Les techniques chromatographiques, basées sur divers principes physiques de séparation comme l'adsorption, le partage de phase, l'échange d'ion ou l'exclusion stérique, reposent sur l'exploitation d'une différence de vitesse de déplacement dans un milieu donné sous une contrainte donnée. Elles sont, comme précédemment évoqué, les plus répandues à l'heure actuelle du fait leur capacité de séparation physique des composants d'une matrice complexe, mais nécessitent dans tous les cas un couplage avec un mode de détection pour pouvoir suivre la séparation.

#### 1.3.1.1 Chromatographie sur couche mince

Pendant longtemps, la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) a été utilisée comme technique d'analyse préliminaire pour la détection d'actifs dans des mélanges complexes. Plus récemment, elle a été utilisée pour l'analyse de compléments alimentaires à base de plante suspectés d'être adultérés par des substances pharmaceutiques.<sup>61-62</sup> Bien que cette technique soit très peu onéreuse et relativement triviale d'utilisation, elle est quand même extrêmement limitée quant à sa sensibilité si l'on considère les approches classiques de détection.<sup>63</sup> Il est en plus obligatoire de posséder les standards que l'on cherche dans l'échantillon pour effectuer une analyse comparative de rapports frontaux. Cette technique est de fait très peu adaptée à l'analyse de compléments alimentaires adultérés par de potentiels analogues, puisque la possibilité de se procurer des standards de substances non répertoriées est quasi nulle. Cependant, des documents de références tels que la Pharmacopée Américaine continuent de décrire l'utilisation et de préconiser l'analyse par CMM de certains composés à base de plante,<sup>64</sup> car elle permet un échantillonnage rapide permettant de conclure quant à la présence ou l'absence d'une substance attendue.

La CCM est classiquement associée comme beaucoup de techniques chromatographiques à une détection par spectroscopie UV. Toutefois récemment, un développement technologique permettant le couplage à la spectrométrie de masse à la CCM a été utilisé pour notamment détecter de façon univoque la présence de sibutramine dans des compléments alimentaire.<sup>65</sup> En 2015 Lv *et al.* utilisent également la CCM associée à une détection Raman pour identifier des dérivés d'éphédrine dans un mélange d'alcaloïdes.<sup>66</sup> Le Raman, qui est une technique de spectroscopie vibrationnelle que je décrirai ultérieurement, apporte une plus grande sensibilité à la CCM par comparaison au couplage à l'UV.

Cependant, la faible fiabilité des résultats obtenus dans cette étude amène les auteurs à valider leurs résultats à l'aide de techniques bien plus avancées, c'est ici l'UPLC-QTOF(MS) qui a été utilisée pour une identification formelle des espèces. Plus récemment, les mêmes auteurs reportent une stratégie de « prédiction confirmation » faisant intervenir la CCM associé à la détection Raman, pour détecter des PDE-5i dans des compléments alimentaires sans nécessité d'avoir les produits standards de référence.<sup>67</sup>

L'amélioration des phases stationnaires utilisées a rapidement conduit à une évolution de la technique vers la Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance (HPTLC = CCMHP). Cette méthode reposant sur le même principe que la CCM, mais permettant une séparation plus fine, a déjà été utilisée plusieurs fois pour le criblage de compléments alimentaires adultérés.<sup>63,68-69</sup> Récemment Mathon *et al.* ont publié une étude dans laquelle ils quantifient de la sibutramine dans une série de compléments alimentaires par couplage CCMHP-UV (densitométrique), dont la présence a été confirmée par une détection CCM-MS comme évoqué précédemment.<sup>65</sup> La méthode, appliquée à plus de 50 compléments alimentaires, révèle un taux d'adultération voisin des 50%. Là encore, les résultats ont été validés par comparaison à des techniques HPLC-UV et HPLC-MS.

Bien que la CCM soit une technique à bas prix que recherchent de plus en plus les laboratoires institutionnels et les autorités, elle reste cependant une approche que l'on peut qualifier de ciblée. En effet, on procède à l'analyse sur une phase stationnaire particulière, à une longueur d'onde particulière et choisie en fonction du type de composés que l'on souhaite détecter, induisant potentiellement un manque de résultats. En effet, les composés non ciblés peuvent ne pas être vus, par exemple s'ils n'ont pas de chromophore. Ces caractéristiques n'en font donc pas une technique adaptée à l'analyse de compléments alimentaires adultérés par des substances inattendues ou des analogues d'adultérants suspectés.

### 1.3.1.2 Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est probablement à l'heure actuelle encore la technique de référence pour le contrôle analytique.<sup>32</sup> Elle offre elle aussi une possibilité de séparation physique accrue par des technologies de phases stationnaires avec des innovations régulières (HILIC, core shell...), compactées sous pression, rendant la séparation plus fine, et permettant l'exclusion de composés pouvant interférer avec les produits recherchés. Elle permet donc l'analyse de mélanges très complexes en une seule analyse. Cependant, quelques prérequis sont nécessaires.



Tout comme la CCM explicitée précédemment, l'HPLC est dépendante du mode de détection utilisé. En effet, en fonction du détecteur (UV / MS / Détecteur à diffusion de la lumière : ELSD / Détecteur d'aérosols chargés : CAD...), les réponses ne seront pas forcément quantitatives inter-espèce et de fait non uniformes. C'est pourquoi l'HPLC doit plutôt être considérée comme une technique ciblée, nécessitant une certaine connaissance préalable des substances recherchées ou potentiellement détectables dans un mélange.

Plus récemment, l'évolution en chromatographie Ultra Haute Performance (UPLC ou UHPLC) permet de travailler avec des colonnes de plus faibles granulométries améliorant ainsi l'efficacité de la séparation.

Dans l'ensemble des techniques chromatographiques évoquées jusqu'alors, une détection UV, peu onéreuse, est la plus reportée pour l'analyse de compléments alimentaires adultérés. Cette détection est plus adaptée à une analyse ciblée où le travail se fait à partir d'une connaissance *a priori* de la longueur d'onde d'absorption et du temps de rétention du composé standard. Au-delà d'une détection à longueur d'onde fixe, les détecteurs DAD (Diode Array Detector) largement répandus permettent d'élargir la gamme de détection à différentes longueurs d'ondes, et donc d'avoir une vision plus globale de l'échantillon, à condition que les molécules possèdent un chromophore.<sup>32, 54, 61, 70-78</sup>

Pour la séparation chromatographique, si des gradients génériques peuvent suffire pour des applications de routine, l'HPLC-UV peut nécessiter une mise au point préalable pour des milieux plus complexes qui dépend beaucoup de chaque cas étudié, rendant l'établissement d'une base de données très complexe voire impossible. De plus, les réponses en UV ne peuvent apporter une réponse quantitative qu'à la condition *sine qua non* de connaître le coefficient d'extinction molaire de la molécule. En effet, la notion de facteur de réponse induit par ce coefficient d'extinction molaire rend obligatoire l'établissement d'une courbe de calibration avec l'étalon correspondant. De plus, il est fréquent que les modifications structurales des analogues soient tellement faibles que les réponses en UV, c'est-à-dire le  $\epsilon$  et le  $\lambda_{\max}$  sont proches de ceux des produits déjà décrits, rendant leur distinction complexe.<sup>79</sup> De ce fait l'HPLC-UV ou -DAD, bien qu'étant un outil préliminaire de choix, n'est pas une technique parfaite pour l'analyse de compléments alimentaires.

Le développement des méthodes de détection en spectrométrie de masse permettant la détection de l'analyte ionisé par son rapport masse sur charge ( $m/z$ ), fait de l'HPLC-MS ou HPLC-MS/MS, une technique de détection très performante. En effet, elle combine la capacité de séparation de la chromatographie avec la sensibilité et la sélectivité de la spectrométrie de masse.<sup>80-82</sup> Tout comme la détection par UV, la spectrométrie de masse implique un facteur de réponse. Celui-ci est directement associé à la capacité de la molécule à s'ioniser. Il dépend donc de fait également de la source

d'ionisation utilisée. Le fait d'associer la spectrométrie de masse à une technique séparative restreint, par contre, le nombre de sources ionisantes utilisables. En effet, seules des sources fonctionnant à pression atmosphérique (ESI ; APCI) peuvent être utilisées en sortie de colonne.

Cette technique implique également, dans le cadre d'une simple détection (HPLC-MS), une connaissance préalable de l'échantillon et donc la possession d'un standard. En effet, un rapport m/z avec une résolution unitaire peut arithmétiquement correspondre à des ions pouvant être attribués à plusieurs molécules. De même un temps de rétention seul, n'est pas forcément spécifique à un composé. Par contre l'association de ces deux paramètres en comparaison d'un standard fait de cette technique une technique de choix pour l'identification des composants d'un mélange.

Dans le cas où les standards ne sont pas directement disponibles, l'association de différents analyseurs, permettant une fragmentation des ions moléculaires (MS/MS), apporte une information structurale plus précise, permettant par une analyse approfondie des voies de fragmentation de remonter à une structure. La comparaison de ces fragmentations à celles des produits de référence procure des informations importantes quant aux modifications structurales apportées au composé.

De plus, dans l'optique d'une quantification, l'utilisation d'un étalon de référence est nécessaire pour effectuer un suivi monitoré de transitions caractéristiques. En effet, la fragmentation d'un ion pseudo moléculaire (= précurseur) étant caractéristique d'une espèce, on peut suivre en comparaison d'une droite d'étalonnage réalisée sur le standard, la formation d'un (SRM = Selected Reaction Monitoring) ou plusieurs (MRM = Multiple Reaction Monitoring) ions produits de façon quantitative. Un tel standard doit idéalement être marqué isotopiquement pour de l'étalonnage interne (deutérimé ou bien marqué au carbone 13) et donc peut-être extrêmement cher. La quantification par spectrométrie de masse est une approche complexe, fortement influencée par l'effet matrice, nécessitant un développement analytique important pour chaque substance étudiée, ce qui rend son application très peu adaptée à l'étude de compléments alimentaires pour lesquels les matrices peuvent être très différentes suivant les échantillons.

Bien que la spectrométrie de masse en tant que mode de détection soit une technique dite ciblée, l'utilisation de la LC-MS pour l'élucidation structurale de divers adjuvants dans des compléments alimentaires en tant que technique « non-ciblée ou post ciblée » a récemment été évaluée. Dans cette revue les auteurs reportent le développement associé aux différents analyseurs, détecteurs, mode d'acquisition... autorisant entre autres une très haute résolution et différents modes d'acquisition permettant une analyse fine de l'échantillon sans connaissances préalables.<sup>80-81</sup>

L'association de la spectrométrie de masse à des techniques séparatives donne également la possibilité d'utiliser des modes de détection combinés, notamment un mode de double détection UV-MS, ce qui

renforce l'information qualitative procurée en une seule analyse et peut faciliter la quantification. A titre d'exemple, on reporte dernièrement l'utilisation de cette double détection, pour confirmer la présence de sibutramine, de phénothérapie et de sildénafil dans des compléments alimentaires.<sup>83</sup> A l'heure actuelle, l'association HPLC-MS et principalement HPLC-MS/MS est considérée comme la technique de référence par la plupart des groupes de recherches pour détecter et identifier les adultérations par des substances pharmacologiquement actives. C'est particulièrement vrai pour les compléments alimentaires érectiles et amaigrissants.<sup>84-85</sup> A titre d'exemple Shi *et al.* reportent l'utilisation de l'HPLC-ESI-MSMS, impliquant l'utilisation de 2 étalons internes pour la détection de 8 adultérants possibles dans 12 compléments alimentaires testés, mettant en évidence un taux d'adultération de 100 % avec notamment la présence inquiétante de fortes doses de sibutramine et de fenfluramine.

Bien que les modes de détection les plus utilisés pour les compléments alimentaires adultérés restent, comme nous venons de le voir, l'UV et la MS, le développement analytique récent tend vers des détecteurs dits universels, qui permettent une quantification des substances dans le mélange à l'aide d'un étalon interne en s'affranchissant de la problématique du facteur de réponse. C'est principalement le cas des détecteurs à diffusion de lumière (ELSD) et des détecteurs à Aérosol chargé (CAD) appelé plus couramment Corona.<sup>86-87</sup> A noter que ces détecteurs doivent le plus souvent être couplés à des détecteurs plus traditionnels (MS, MS/MS ou UV) car ils ne permettent pas, en tant que tels, l'identification complète d'une molécule.

### 1.3.1.3 Chromatographie en phase gazeuse

Pour l'étude de produits pour sportif, les techniques chromatographiques en phase gazeuse, associées à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) restent les alternatives les plus décrites. Cependant l'utilisation de l'HPLC-MS tend à se développer pour ces applications aussi, pour deux raisons principales qui sont la capacité à étudier des composés thermolabiles mais également la facilité de préparation des échantillons.<sup>88</sup>

La GC-MS, contrairement à ce que nous venons de discuter, repose, elle, sur le partage de phase : le mélange de composés à analyser est séparé suivant la différence d'affinité entre une phase stationnaire greffée - souvent apolaire - sur la colonne et une phase gaz mais le facteur principal qui gère la séparation est la volatilité des composés et donc leur température d'ébullition. La GC-MS utilise un mode d'ionisation par impact électronique unique et standardisé, impliquant un facteur de réponse reproductible pour un produit donné quelles que soient les conditions d'analyses. Cela facilite grandement plusieurs points, notamment la capacité d'établir une base de données fiable et

automatisable, comme la base de données NIST indissociable des analyses GC-MS. La possibilité facile de mise en place et/ou d'utilisation de base de données était un des points faibles des techniques discutées jusqu'ici. De plus, la GC-MS est une technique relativement peu onéreuse, d'une grande sensibilité, reproductible et pouvant apporter des informations quantitatives avec toutefois des contraintes similaires à celles déjà évoquées pour l'HPLC-MS. Pourtant, dans les applications qui nous intéressent, la GC-MS est bien moins utilisée. Dans le cas des inhibiteurs de phosphodiesterase-5 (érectiles), qui sont des produits thermosensibles et difficiles à dériver, la raison apparaît de façon évidente.<sup>58</sup> En effet, la GC-MS ne convient qu'à l'étude de produits volatils ou dérivatisables et stables thermiquement car l'injecteur est chauffé au-delà des températures d'ébullition du moins volatil des composés et la colonne est placée dans un four. Cependant, la GC-MS a déjà été utilisée comme un outil d'identification et d'élucidation structurale dans le cas d'analogues structuraux de composés à visée érectile comme par exemple le pipéridinafil, le noracétildénafil, l'aldénafil, le thioaldénafil et le desulfovardenafil.<sup>58, 81, 89-93</sup> Dans le cadre des compléments alimentaires pour sportif, comme nous l'évoquons un peu plus tôt, la tendance est encore à utiliser la GC-MS. Cependant, cette technique est principalement utilisée pour la détection de stéroïdes anabolisants. Et comme explicité dans la partie précédente, les substances anabolisantes ne représentent qu'un dixième des substances répertoriées comme dopantes par le WADA.

#### 1.3.1.4 Autres techniques séparatives

Nous venons de voir au travers de la CCM, l'HPLC et la GC - qui reposent sur des principes physiques d'adsorption ou de partage de phase - que les techniques chromatographiques sont des techniques relativement bien adaptées à l'étude de compléments alimentaires. Il existe également des techniques chromatographiques basées sur l'exclusion stérique ou l'échange d'ions, qui ne sont pour l'instant que très peu utilisées pour les problématiques qui nous intéressent, et qui donc ne seront pas abordées ici. En outre, bien qu'elle soit plus une technique séparative qu'une technique chromatographique, il est important de noter le développement récent de techniques d'électrophorèse capillaire, là encore couplée à différents modes de détection, pour l'analyse de compléments alimentaires adultérés,<sup>94-95</sup> bien qu'elle se développe préférentiellement pour l'analyse de médicaments.

#### 1.3.2 Spectrométrie de masse

Comme nous venons de le voir, la spectrométrie de masse est le mode de détection le plus utilisé pour l'identification et l'élucidation structurale, notamment par l'utilisation de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), d'analogues structuraux de substances actives dans les compléments

alimentaires. Cependant, la spectrométrie de masse peut aussi consister en une technique analytique par elle-même.

Bien que des modes d'ionisations relativement doux tel que l'électrospray (ESI) ou l'ionisation chimique sous pression atmosphérique (APCI) soient encore préférés pour étudier l'adulteration par des substances pharmaceutiques (qui sont souvent de petites molécules très polaires), la spectrométrie de masse permet en outre, quand elle n'est pas couplée, l'utilisation de sources ionisantes plus fortes et n'opérant pas obligatoirement à pression atmosphérique. De plus, avec le développement de nouveaux détecteurs et leurs associations à des analyseurs de plus en plus élaborés souvent couplés entre eux, la spectrométrie de masse possède désormais une sensibilité ainsi qu'une sélectivité suffisante pour se suffire à elle-même en tant que technique analytique.

Les détecteurs ou analyseurs les plus connus sont : les simples quadripôles, les triples quadripôles, le piège linéaire, le temps de vol (TOF) ou encore l'orbitrap ou les analyseurs à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR-MS). Ces derniers sont les plus résolutifs, ils permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre de 60 000 (Orbitrap) ou 100 000 (FT-ICR). La spectrométrie de masse peut notamment être utilisée sur des produits préalablement purifiés introduits en introduction directe (Flow Injection, FI) et associée à une décomposition d'ion induite ou activée par collision (CID ou CAD) pour l'obtention d'informations structurales. Cela a notamment été le cas sur de nouveaux analogues de vardénafil et sildénafil.<sup>90</sup> Dans la même lignée Ahn *et al.* proposent une introduction directe associée à une ionisation par bombardement rapide d'atomes (FAB), et associée là encore à une décomposition d'ion associé par collision (FAB-CID-MS/MS) pour l'élucidation structurale d'analogues du sildénafil préalablement purifiés.<sup>96</sup> De nos jours, le FAB n'est plus une technique de référence, par contre dernièrement Kee et son équipe ont montré la pertinence d'utiliser un analyseur haute résolution de type orbitrap pour élucider la structure d'un analogue du sildénafil extrait d'un complément alimentaire.<sup>97</sup>

L'introduction directe ou l'introduction en flux ont également été reportées comme des techniques analytiques de choix pour l'analyse de compléments alimentaires potentiellement adultérés. En 2007 Koulman *et al.*<sup>98</sup> proposent d'utiliser la spectrométrie de masse en introduction directe pour une approche métabolomique sur une matrice complexe, dans ce cas la recherche de souches de champignons dans des graines de pelouses, mettant en avant la possibilité d'utiliser cette technique pour différencier les ions moléculaires entre eux ainsi que de les identifier avec un débit d'analyse extrêmement élevé. Cependant, il est reporté que sans phase de séparation préalable, les effets de matrice sont significativement plus importants.<sup>80-81</sup> En 2012 et 2014, l'équipe de Song a utilisé la spectrométrie de masse en infusion directe pour l'analyse de compléments alimentaires contenant

des inhibiteurs de phosphodiesterase-5 ou bien des substances amaigrissantes. Par FI-MS/MS réalisée en MRM, ils mettent alors en évidence la difficulté de telles analyses. En effet, des composés de structures proches ont régulièrement à la fois les mêmes ions précurseurs et les mêmes ions produits entre eux,<sup>99-100</sup> nécessitant parfois le suivi d'au moins 3 ions produits pour assurer la fiabilité des résultats.

Dans le cadre de l'étude de l'adultération, d'autres techniques d'ionisation telles que l'ASAP<sup>101</sup> (atmospheric solid analysis probe) ou bien la DCBI<sup>102</sup> (desorption corona beam ionization) peuvent être utilisées en direct sans aucune préparation préalable. Dans l'ASAP, l'échantillon est vaporisé par exposition à un gaz d'azote chaud puis analysé par une source à pression atmosphérique, permettant l'analyse de composés moins polaires que ne le permettent des sources comme l'electrospray ou l'APCI/APPI (atmospheric pressure chemical ionisation/atmospheric pressure photo-ionisation).<sup>103</sup> Dans la DCBI, l'échantillon est désorbé par un « faisceau d'hélium » chauffé, et ionisé par l'énergie des particules engagées dans le courant gazeux.<sup>104</sup> Comme explicité dans les références citées, ces techniques, bien que réduisant la capacité à quantifier et à détecter des traces, permettent la mise en évidence d'un grand nombre de cas d'adultération.

Pour aller plus loin, et comme démontré par Gratz,<sup>105</sup> des techniques particulièrement performantes, telles que l'analyseur à résonance cyclotronique d'ion par transformée de Fourier, donnent une précision à la 6<sup>ème</sup> décimale, permettant de fournir une composition élémentaire univoque, et de fait de conclure uniquement avec l'analyse MS, sans nécessité de fragmenter directement au sein de la matrice.

Tableau 1 : Récapitulatif des principales composantes utilisées dans un spectromètre de masse.

Source ionisantes	Analyseurs	Détecteurs
L'impact électronique (EI)	Le piège ionique quadripolaire	Le multiplicateur de photons
L'ionisation chimique (CI)	Le temps de vol	Le multiplicateur d'électrons
L'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB)	Le FT-ICR	Le cylindre de Faraday
L'ionisation par électrospray (electrospray ionisation) (ESI)	L'orbitrap	
L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)	L'analyseur à secteur magnétique	
La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)		
L'ionisation thermique (TIMS)		

Bien que, comme nous venons de le voir, la spectrométrie de masse en tant que détecteur en couplage avec des techniques chromatographiques ou bien en tant que technique analytique par elle-même semble être une technique bien adaptée pour la détection de cas d'adultérations, elle nécessite cependant une mise au point importante pour pouvoir répondre aux problématiques liées au dosage. La mise en œuvre d'études quantitatives demeure une difficulté importante en spectrométrie de masse, le recours dans des étalons internes marqués spécifiques à chaque molécule étant nécessaire pour une quantification absolue. De plus, bien que ces techniques soient peu consommatrices de produits, elles n'en restent pas moins destructrices et à ce jour très peu adaptées à l'étude de produits « sur-site ». C'est pour toutes ces raisons que depuis quelques années l'intérêt se porte vers des techniques spectroscopiques, plus adaptées à des laboratoires institutionnels, qui se doivent de traiter un grand nombre d'échantillons, parfois sur site, avec le minimum de préparation, sans pour autant détruire un échantillon souvent précieux.<sup>33</sup>

### 1.3.3 Techniques spectroscopiques

#### 1.3.3.1 Spectroscopie vibrationnelle

Parmi les techniques spectroscopiques, les techniques de spectroscopie vibrationnelle comme l'infra-rouge (IR), le proche infra-rouge (NIR), ou le Raman, permettant de voir aisément les liaisons polarisées dans un cas et les liaisons polarisables dans un autre, permettent une approche globale de l'échantillon et donc une vision d'ensemble.

Ces techniques donnent certes des informations structurales sur les composés présents dans l'échantillon, mais ne sont absolument pas adaptées à l'étude de mélanges complexes. En effet, elles n'apportent que des informations sur des groupements spécifiques de la molécule, ne permettant aucunement de les lier entre eux et donc de remonter à une structure dans un mélange. Les études menées se doivent, dans la grande majorité des cas, d'être suivies par une analyse chimiométrique multivariée telle que des analyses en composante principale (principal component analysis (PCA)) des régressions des moindres carrés partiels (discriminant partial least squares (D-PLS)), ou des méthodes par poursuite de projection (projection pursuit (PP)) ainsi que par des méthodes de classement hiérarchique (e.g. classification and regression trees (CART), soft independent modelling by class analogy (SIMCA), et support vector machines (SVM)). Ces techniques nécessitent des logiciels parfois coûteux, et peuvent induire des faux positifs ou des faux négatifs. Au vu de la complexité des matrices de compléments alimentaires étudiés, ces techniques n'ont jusque-là jamais été réellement utilisées. Par contre, elles ont déjà été appliquées sur des matrices de médicaments, qui sont souvent moins complexes et plus concentrées,<sup>41, 106-107</sup> et peuvent parfois être même préférées aux techniques chromatographiques.<sup>108</sup>

L'association d'analyse Infra-Rouge avec un échantillonnage ATR (réflectance totale atténuée) a également été popularisée pour l'analyse de produits bruts, cette fois à la condition d'établir une base données solide ; dans ce cas, la spectroscopie infrarouge se révèle être une très bonne technique pour évaluer la qualité de produits bruts.<sup>109</sup> Dernièrement, en réévaluant 125 compléments alimentaires où la présence de sibutramine avait déjà été mise en évidence, Deconinck a montré la capacité de l'association IR-ATR à élucider des cas d'adultération dans des matrices complexes de compléments alimentaires, avec un faible pourcentage de faux positifs et une absence de faux négatifs. Il relate le fait que cette technique pourrait n'être considérée que comme une première approche, et que les faux positifs pourraient ensuite être ré-analysés par d'autres techniques.<sup>33</sup>

La spectroscopie Raman permet, elle, une approche topologique plus ciblée, permettant de concentrer l'étude sur 1 à 2  $\mu\text{m}$  de l'échantillon. Elle a notamment permis à Venhuis et son équipe de mettre en évidence pour la première fois des cas d'adultérations non pas de la poudre contenue à l'intérieur d'une gélule mais de la gélule elle-même.<sup>110</sup> Encore à l'heure actuelle, les spectroscopies vibrationnelles sont utilisées en temps qu'outils complémentaires de confirmation structurale pour des analogues structuraux extraits d'une matrice complexe.<sup>76, 111-112</sup>

### 1.3.3.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

Si les analyses par RMN sont incontournables dans tout laboratoire de chimie dans la recherche académique, il n'en est pas de même dans les structures dédiées au contrôle qualité. En complément des techniques de spectroscopies vibrationnelles moins coûteuses, les analyses par RMN peuvent pourtant apporter une aide considérable pour l'analyse de compléments alimentaires. Comme décrit précédemment pour les spectroscopies vibrationnelles, la RMN permet l'observation de transitions. Il ne s'agit néanmoins plus de transitions vibrationnelles, mais de transitions nucléaires entre des niveaux quantiques d'énergie dont la levée de dégénérescence a été permise par effet Zeeman. L'effet Zeeman local dépendant de l'environnement électronique du noyau, donc des liaisons chimiques avoisinantes, la RMN permet de sonder cet environnement électronique pour les différentes familles du noyau étudié, indépendamment de l'espèce chimique qui les porte. Le plus courant est d'utiliser de la RMN du proton (RMN  $^1\text{H}$ ), d'une part car c'est le noyau pour lequel la sensibilité est la meilleure du fait de l'abondance naturelle élevée (99.98%) de cet isotope de l'hydrogène et de ses propriétés magnétiques favorables ( $I=1/2$ ,  $\gamma=26,75.10^7 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), et d'autre part du fait de son omniprésence dans les molécules organiques.



Tout comme les spectroscopies vibrationnelles, la RMN est une technique non destructrice apportant des informations sans a priori sur l'échantillon. Elle peut se réaliser sur un solide ou bien en solution, mais dans le cadre de cette thèse nous nous intéresserons uniquement à la RMN en solution.

La RMN dans l'étude des problématiques d'adultération a été principalement étudiée pour ses capacités à apporter des informations structurales. Elle est même, quand la substance n'est pas cristalline, considérée comme la technique de référence pour l'apport d'informations structurales au travers de diverses expériences existantes permettant l'apport de données tant scalaires que spatiales.<sup>113-114</sup> La RMN présente également l'avantage, en comparaison des techniques étudiées jusque-là, d'être une technique quantitative par nature. En effet, elle ne nécessite ni développement de méthodes ni possession d'un standard spécifique étant donné que la réponse du signal RMN est directement liée à la concentration des analytes, les conditions d'acquisitions (durée de l'impulsion et délais de relaxations) doivent simplement être adaptées pour travailler dans des conditions de relaxation totale, en fonction des molécules étudiées. De fait, n'importe quelle molécule de concentration connue peut servir de référence interne à condition qu'elle soit pure et que ses signaux n'interfèrent pas avec ceux de l'espèce étudiée.<sup>115</sup>

Face à ces problématiques d'adultération, la RMN a quand même le défaut majeur d'être très peu sensible en comparaison des autres techniques analytiques, pouvant mener à la non détection de certaines formes d'adultération si elles sont à de faibles niveaux de concentration mais ce ne sont pas les cas les plus couramment rencontrés. Un autre des défauts majeurs freinant le développement de la RMN dans les laboratoires de contrôle qualité reste son coût élevé. La RMN est une technique environ 5 à 10 fois plus chère à l'achat que les techniques précédemment décrites. De plus, elle nécessite un entretien cryogénique important et l'utilisation de solvants deutérés, eux aussi plus chers que leurs pendants non deutérés. Le développement de spectromètres dits à bas champ pour pallier la majorité de ces problèmes de coût sera discuté dans un second chapitre.

La RMN se pose donc comme une technique de choix pour l'étude de mélanges complexes, permettant la détection et l'identification de substances totalement inattendues là où d'autres techniques plus ciblées n'auraient pas permis de conclure formellement sur l'absence de certains constituants. C'est notamment le cas lorsque en 2015 Gilard *et al.* détectent, en analysant 150 compléments alimentaires érectiles, qu'en plus des 61% adultérés par des inhibiteurs de phosphodiesterases-5 ou analogues, 2 compléments alimentaires sont adultérés par une substance active expérimentale (la flibansérine), et 5 par des hormones stéroïdiennes.

La RMN permet également de faire des analyses structurales plus poussées, au travers de diverses expériences bi/tri dimensionnelles,<sup>41, 116</sup> permettant l'obtention de données plus complètes dans le cas

d'un mélange complexe. C'est notamment le cas des expériences de DOSY, pour la lecture des coefficients d'auto diffusion translationnelles. Cette technique permet une séparation virtuelle dans un mélange pouvant apporter des informations pertinentes quant à l'attribution des différents signaux de chaque substance et peut être bien adaptée dans le cas de mélanges complexes.

### 1.3.4 Autres méthodes bio-analytiques

Pour terminer sur les techniques analytiques, en plus des techniques purement physico-chimiques évoquées jusqu'ici, le développement de méthodes associées à des techniques biologiques, principalement des techniques d'immunoanalyses deviennent elles aussi des outils de criblage très prometteurs. En 2009 et 2012 respectivement, Rijk<sup>117</sup> puis Plotan<sup>118</sup> proposent d'utiliser de telles méthodologies comme techniques de référence pour l'analyse de stéroïdes anabolisants (et leurs dérivés) dans des compléments alimentaires. Bien que ces techniques n'apportent pas de données quantitatives et peu d'informations structurales, elles permettent une identification extrêmement rapide et peu onéreuse d'une « famille » de substances actives. En effet ces techniques reposent sur l'association d'une molécule et d'une cible, permettant de confirmer la présence d'une large gamme de molécules présentant la même activité biologique. Cependant, le manque de spécificité de cette technique induit l'impossibilité de caractériser avec précision l'actif détecté. De fait, Peters propose en 2010<sup>119</sup> un protocole complémentaire par UPLC-TOF-MS pour confirmer les résultats. Il montre également que supprimer l'étape de bio essai conduit à un travail bien plus laborieux nécessitant l'étude de chaque composant pouvant potentiellement être des stéroïdes anabolisants. Plus récemment, Aqai et al.<sup>45</sup> proposent une chromatographie liquide de bio affinité avec détection MS pour l'analyse et la détection de stéroïdes anabolisants dans des compléments alimentaires. Ces techniques pourraient, parmi d'autres, devenir des techniques de référence pour les contrôles anti-dopage si dans un futur proche son développement permet également la mise en évidence de substances inattendues.

## 1.4 Références

1. Journal officiel des communautés européennes directive 2002/46/CE.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:183:0051:0057:FR:PDF> (consulté le 15/08/2018).
2. Silano, V.; Coppens, P.; Larranaga-Guetaria, A.; Minghetti, P.; Roth-Ehrang, R., Regulations applicable to plant food supplements and related products in the European Union. *Food Funct* **2011**, 2 (12), 710-9.
3. Journal officiel de l'Union européenne Règlement (CE) No 1924/2006.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:FR:PDF> (consulté le 15/08/2018).
4. Journal officiel de l'Union européenne règlement (UE) No 1169/2011.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:FR:PDF> (consulté le 15/08/2018).
5. RASFF Food and Feed Safety Alerts.  
[https://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en) (consulté le 15/08/2018).
6. EFSA Compléments alimentaires.  
<https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/food-supplements> (consulté le 15/08/2018).
7. RASFF Consumers Portal.  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/consumers/> (consulté le 15/08/2018).
8. Légifrance Décret n°2006-352.  
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000638341&categorieLien=cid> (consulté le 15/08/2018).
9. DGCCRF Compléments alimentaires - Présentation générale.  
<https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/s%C3%A9curit%C3%A9/produits-alimentaires/compléments-alimentaires> (consulté le 15/08/2018).
10. DGCCRF Compléments alimentaires - Déclarer ses produits avec Télélecare.  
<https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/compléments-alimentaires-declarer-produits-avec-teleicare> (consulté le 15/08/2018).
11. Synadiet Les compléments alimentaires.  
<http://www.synadiet.org/les-compléments-alimentaires/quest-ce-que-cest> (consulté le 15/08/2018).
12. Synadiet 1er Observatoire des compléments alimentaires.  
[http://www.synadiet.org/sites/default/files/press/files/observatoire\\_des\\_compléments\\_alimentaires\\_synadiet.pdf](http://www.synadiet.org/sites/default/files/press/files/observatoire_des_compléments_alimentaires_synadiet.pdf) (consulté le 15/08/2018).
13. Skeie, G.; Braaten, T.; Hjartaker, A.; Lentjes, M.; Amiano, P.; Jakszyn, P.; Pala, V.; Palanca, A.; Niekerk, E. M.; Verhagen, H.; Avloniti, K.; Psaltopoulou, T.; Niravong, M.; Touvier, M.; Nimpisch, K.; Haubrock, J.; Walker, L.; Spencer, E. A.; Roswall, N.; Olsen, A.; Wallstrom, P.; Nilsson, S.; Casagrande, C.; Deharveng, G.; Hellstrom, V.; Boutron-Ruault, M. C.; Tjonneland, A.; Joensen, A. M.; Clavel-Chapelon, F.; Trichopoulou, A.; Martinez, C.; Rodriguez, L.; Frasca, G.; Sacerdote, C.; Peeters, P. H.; Linseisen, J.; Schienkiewitz, A.; Welch, A. A.; Manjer, J.; Ferrari, P.; Riboli, E.; Bingham, S.; Engeset, D.; Lund, E.; Slimani, N., Use of dietary supplements in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition calibration study. *Eur J Clin Nutr* **2009**, 63 Suppl 4, S226-38.
14. Vargas-Murga, L.; Garcia-Alvarez, A.; Roman-Vinas, B.; Ngo, J.; Ribas-Barba, L.; van den Berg, S. J.; Williamson, G.; Serra-Majem, L., Plant food supplement (PFS) market structure in EC Member States, methods and techniques for the assessment of individual PFS intake. *Food Funct* **2011**, 2 (12), 731-9.
15. Garcia-Alvarez, A.; Egan, B.; de Klein, S.; Dima, L.; Maggi, F. M.; Isoniemi, M.; Ribas-Barba, L.; Raats, M. M.; Meissner, E. M.; Badea, M.; Bruno, F.; Salmenhaara, M.; Mila-Villarreal, R.; Knaze, V.; Hodgkins, C.; Marculescu, A.; Uusitalo, L.; Restani, P.; Serra-Majem, L., Usage of plant food

- supplements across six European countries: findings from the PlantLIBRA consumer survey. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92265.
16. Egan, B.; Hodgkins, C.; Shepherd, R.; Timotijevic, L.; Raats, M., An overview of consumer attitudes and beliefs about plant food supplements. *Food Funct* **2011**, *2* (12), 747-52.
  17. Levy, I.; Attias, S.; Ben-Arye, E.; Schiff, E., Use and safety of dietary and herbal supplements among hospitalized patients: What have we learned and what can be learned?—A narrative review. *European Journal of Integrative Medicine* **2017**, *16*, 39-45.
  18. Ritchie, M. R., Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: what do we know about their pattern of usage? *Proc Nutr Soc* **2007**, *66* (4), 479-82.
  19. ANSES Consommation de compléments alimentaires. <https://www.anses.fr/fr/content/consommation-de-compl%C3%A9ments-alimentaires> (consulté le 15/08/2018).
  20. Petroczi, A.; Naughton, D. P.; Pearce, G.; Bailey, R.; Bloodworth, A.; McNamee, M., Nutritional supplement use by elite young UK athletes: fallacies of advice regarding efficacy. *J Int Soc Sports Nutr* **2008**, *5*, 22.
  21. Synadiet Chiffres clés 2017 du marché des compléments alimentaires en France. [http://www.synadiet.org/sites/default/files/page/files/chiffres\\_cles\\_2017\\_du\\_marche\\_des\\_complements\\_alimentaires\\_-\\_synadiet.pdf](http://www.synadiet.org/sites/default/files/page/files/chiffres_cles_2017_du_marche_des_complements_alimentaires_-_synadiet.pdf) (consulté le 15/08/2018).
  22. Lachenmeier, D. W.; Löbell-Behrends, S.; Böse, W.; Marx, G., Does European Union food policy privilege the internet market? Suggestions for a specialized regulatory framework. *Food Control* **2013**, *30* (2), 705-713.
  23. Brown, A. C., An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 1 of 5 series. *Food Chem Toxicol* **2017**, *107* (Pt A), 449-471.
  24. Viana, C.; Zemolin, G. M.; Dal Molin, T. R.; Gobo, L.; Ribeiro, S. M.; Leal, G. C.; Marcon, G. Z.; de Carvalho, L. M., Detection and determination of undeclared synthetic caffeine in weight loss formulations using HPLC-DAD and UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2017**.
  25. Di Lorenzo, C.; Ceschi, A.; Kupferschmidt, H.; Lude, S.; De Souza Nascimento, E.; Dos Santos, A.; Colombo, F.; Frigerio, G.; Norby, K.; Plumb, J.; Finglas, P.; Restani, P., Adverse effects of plant food supplements and botanical preparations: a systematic review with critical evaluation of causality. *Br J Clin Pharmacol* **2015**, *79* (4), 578-92.
  26. Geyer, H.; Parr, M. K.; Koehler, K.; Mareck, U.; Schanzer, W.; Thevis, M., Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J Mass Spectrom* **2008**, *43* (7), 892-902.
  27. Gilard, V.; Balayssac, S.; Tinaugus, A.; Martins, N.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Detection, identification and quantification by <sup>1</sup>H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *102*, 476-93.
  28. Yuen, Y. P.; Lai, C. K.; Poon, W. T.; Ng, S. W.; Chan, A. Y.; Mak, T. W., Adulteration of over-the-counter slimming products with pharmaceutical analogue—an emerging threat. *Hong Kong Med J* **2007**, *13* (3), 216-20.
  29. Cohen, P. A.; Benner, C.; McCormick, D., Use of a pharmaceutically adulterated dietary supplement, Pai You Guo, among Brazilian-born women in the United States. *J Gen Intern Med* **2012**, *27* (1), 51-6.
  30. Cohen, P. A.; Maller, G.; DeSouza, R.; Neal-Kababick, J., Presence of banned drugs in dietary supplements following FDA recalls. *JAMA* **2014**, *312* (16), 1691-3.
  31. Rocha, T.; Amaral, J. S.; Oliveira, M. B. P. P., Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2016**, *15* (1), 43-62.
  32. de Carvalho, L. M.; Martini, M.; Moreira, A. P.; de Lima, A. P.; Correia, D.; Falcao, T.; Garcia, S. C.; de Bairos, A. V.; do Nascimento, P. C.; Bohrer, D., Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic Sci Int* **2011**, *204* (1-3), 6-12.

33. Deconinck, E.; Cauwenbergh, T.; Bothy, J. L.; Custers, D.; Courselle, P.; De Beer, J. O., Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *100*, 279-283.
34. FDA2018a Tainted Products Marketed as Dietary Supplements.  
[https://www.accessdata.fda.gov/scripts/sda/sdNavigation.cfm?filter=&sortColumn=1a&sd=tainted\\_supplements\\_cder&displayAll=true](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/sda/sdNavigation.cfm?filter=&sortColumn=1a&sd=tainted_supplements_cder&displayAll=true) (consulté le 31/08/2018).
35. RASFF2018 Portal.  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1#> (consulté le 31/08/2018).
36. Maughan, R. J.; Greenhaff, P. L.; Hespel, P., Dietary supplements for athletes: emerging trends and recurring themes. *J Sports Sci* **2011**, *29 Suppl 1*, S57-66.
37. Kiertscher, E.; DiMarco, N. M., Use and rationale for taking nutritional supplements among collegiate athletes at risk for nutrient deficiencies. *Performance Enhancement & Health* **2013**, *2* (1), 24-29.
38. WADA Code.  
<https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-2015-world-anti-doping-code.pdf> (consulté le 31/08/2018).
39. Maughan, R. J., Contamination of dietary supplements and positive drug tests in sport. *J Sports Sci* **2005**, *23* (9), 883-9.
40. Venhuis, B.; Keizers, P.; van Riel, A.; de Kaste, D., A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events. *Drug Test Anal* **2014**, *6* (6), 578-81.
41. Zhao, J.; Wang, M.; Avula, B.; Khan, I. A., Detection and quantification of phenethylamines in sports dietary supplements by NMR approach. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *151*, 347-355.
42. Thevis, M.; Schanzer, W., Detection of SARMS in doping control analysis. *Mol Cell Endocrinol* **2018**, *464*, 34-45.
43. WADA What is prohibited.  
<https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited> (consulté le 15/08/2018).
44. Odoardi, S.; Castrignano, E.; Martello, S.; Chiarotti, M.; Strano-Rossi, S., Determination of anabolic agents in dietary supplements by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2015**, *32* (5), 635-47.
45. Aqai, P.; Cevik, E.; Gerssen, A.; Haasnoot, W.; Nielen, M. W., High-throughput bioaffinity mass spectrometry for screening and identification of designer anabolic steroids in dietary supplements. *Anal Chem* **2013**, *85* (6), 3255-62.
46. Schramek, N.; Wollein, U.; Eisenreich, W., Identification of new synthetic PDE-5 inhibitors analogues found as minor components in a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *96*, 45-53.
47. Ayta, I. A.; McKinlay, J. B.; Krane, R. J., The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int* **1999**, *84* (1), 50-6.
48. Codevilla, A review of analytical methods for the determination of four new phosphodiesterase type 5 inhibitors in biological samples and pharmaceutical preparations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *49* (1), 1-11.
49. FDA2018b Approved Drug Products.  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/> (consulté le 31/08/2018).
50. EMA European public assessment reports.  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar\\_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d125](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d125) (consulté le 31/08/2018).
51. Bechara, A.; Casabe, A.; De Bonis, W.; Helien, A.; Bertolino, M. V., Recreational use of phosphodiesterase type 5 inhibitors by healthy young men. *J Sex Med* **2010**, *7* (11), 3736-42.
52. Korkes, F.; Costa-Matos, A.; Gasperini, R.; Reginato, P. V.; Perez, M. D., Recreational use of PDE5 inhibitors by young healthy men: recognizing this issue among medical students. *J Sex Med* **2008**, *5* (10), 2414-8.

53. Schnetzler, G.; Banks, I.; Kirby, M.; Zou, K. H.; Symonds, T., Characteristics, behaviors, and attitudes of men bypassing the healthcare system when obtaining phosphodiesterase type 5 inhibitors. *J Sex Med* **2010**, *7* (3), 1237-46.
54. Fejos, I.; Neumajer, G.; Beni, S.; Jankovics, P., Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC-UV using sildenafil as a sole reference. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *98*, 327-33.
55. Campbell, N.; Clark, J. P.; Stecher, V. J.; Thomas, J. W.; Callanan, A. C.; Donnelly, B. F.; Goldstein, I.; Kaminetsky, J. C., Adulteration of purported herbal and natural sexual performance enhancement dietary supplements with synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors. *J Sex Med* **2013**, *10* (7), 1842-9.
56. Kee, C. L.; Ge, X.; Gilard, V.; Malet-Martino, M.; Low, M. Y., A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *147*, 250-277.
57. Venhuis, B. J.; de Kaste, D., Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: a history, analytical aspects and health risks. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *69*, 196-208.
58. Patel, D. N.; Li, L.; Kee, C. L.; Ge, X.; Low, M. Y.; Koh, H. L., Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: analytical techniques and challenges. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *87*, 176-90.
59. Bakota, E. L.; Kelly, A. T.; Walterscheid, J. P.; Phatak, D. R., A Case Report of Fatal Desmethyl Carbodenafil Toxicity. *J Anal Toxicol* **2017**, *41* (3), 250-255.
60. Pages, G.; Gerdova, A.; Williamson, D.; Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field (1)H NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances. *Anal Chem* **2014**, *86* (23), 11897-904.
61. Csupor, D.; Boros, K.; Danko, B.; Veres, K.; Szendrei, K.; Hohmann, J., Rapid identification of sibutramine in dietary supplements using a stepwise approach. *Pharmazie* **2013**, *68* (1), 15-8.
62. Cai, Y.; Cai, T.-G.; Shi, Y.; Cheng, X.-L.; Ma, L.-Y.; Ma, S.-C.; Lin, R.-C.; Feng, W., Simultaneous Determination of Eight Pde5-Is Potentially Adulterated in Herbal Dietary Supplements with Tlc and Hplc-Pda-Ms Methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2010**, *33* (13), 1287-1306.
63. Ariburnu, E.; Uludag, M. F.; Yalcinkaya, H.; Yesilada, E., Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *64-65*, 77-81.
64. Sarma, N.; Giancaspro, G.; Venema, J., Dietary supplements quality analysis tools from the United States Pharmacopeia. *Drug Test Anal* **2016**, *8* (3-4), 418-23.
65. Mathon, C.; Ankli, A.; Reich, E.; Bieri, S.; Christen, P., Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2014**, *31* (1), 15-20.
66. Lv, D.; Cao, Y.; Lou, Z.; Li, S.; Chen, X.; Chai, Y.; Lu, F., Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (5), 1313-25.
67. Lv, D.; Cao, Y.; Chen, L.; Zhu, Z.; Chen, X.; Li, D.; Wang, D.; Li, S.; Chai, Y.; Lu, F., Simulation Strategies for Characterizing Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Botanical Dietary Supplements. *Analytical Chemistry* **2018**.
68. Sanzini, E.; Badea, M.; Santos, A. D.; Restani, P.; Sievers, H., Quality control of plant food supplements. *Food Funct* **2011**, *2* (12), 740-6.
69. Abourashed, E.; Abdel-Kader, M.; Habib, A.-A., HPTLC determination of sildenafil in pharmaceutical products and aphrodisiac herbal preparations. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* **2005**, *18* (105), 372-376.

70. De Cock, K. J.; Delbeke, F. T.; Van Eenoo, P.; Desmet, N.; Roels, K.; De Backer, P., Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. *J Pharm Biomed Anal* **2001**, *25* (5-6), 843-52.
71. Deconinck, E.; Verlinde, K.; Courselle, P.; Beer, J. O., A validated Ultra High Pressure Liquid Chromatographic method for the characterisation of confiscated illegal slimming products containing anorexics. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *59*, 38-43.
72. Rebiere, H.; Guinot, P.; Civade, C.; Bonnet, P. A.; Nicolas, A., Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultra-high-pressure liquid chromatography with diode-array detection. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2012**, *29* (2), 161-71.
73. Sacre, P. Y.; Deconinck, E.; Chiap, P.; Crommen, J.; Mansion, F.; Rozet, E.; Courselle, P.; De Beer, J. O., Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines. *J Chromatogr A* **2011**, *1218* (37), 6439-47.
74. Savaliya, A. A.; Shah, R. P.; Prasad, B.; Singh, S., Screening of Indian aphrodisiac ayurvedic/herbal healthcare products for adulteration with sildenafil, tadalafil and/or vardenafil using LC/PDA and extracted ion LC-MS/TOF. *J Pharm Biomed Anal* **2010**, *52* (3), 406-9.
75. Venhuis, B. J.; Vredenbregt, M. V.; Kaun, N.; Maurin, J. K.; Fijalek, Z.; de Kaste, D., The identification of rimonabant polymorphs, sibutramine and analogues of both in counterfeit Acomplia bought on the internet. *J Pharm Biomed Anal* **2011**, *54* (1), 21-6.
76. Venhuis, B. J.; Zomer, G.; Hamzink, M.; Meiring, H. D.; Aubin, Y.; de Kaste, D., 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* **2011**, *54* (4), 735-41.
77. Wollein, U.; Eisenreich, W.; Schramek, N., Identification of novel sildenafil-analogues in an adulterated herbal food supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2011**, *56* (4), 705-12.
78. Zhang, G.; Yu, Y.; Wu, X.; Li, J., Separation and structural elucidation of a new tadalafil analogue diethylaminopretadalafil included as an adulterant in a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *94*, 210-4.
79. Hou, P.; Zou, P.; Low, M. Y.; Chan, E.; Koh, H. L., Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement. *Food Addit Contam* **2006**, *23* (9), 870-5.
80. Vaclavik, L.; Krynitsky, A. J.; Rader, J. I., Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **2014**, *810*, 45-60.
81. Vaclavik, L.; Krynitsky, A. J.; Rader, J. I., Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. *Anal Bioanal Chem* **2014**, *406* (27), 6767-90.
82. Patterson, R.; Mabe, P.; Mitchell, E. N.; Cory, W., Lifestyle illicit drug seizures: a routine ESI-LC-MS method for the identification of sildenafil and vardenafil. *Forensic Sci Int* **2012**, *222* (1-3), 83-8.
83. Hemdan, A.; Tawakol, S. M., HPLC-UV Chromatographic Methods for Detection and Quantification of Undeclared Withdrawn Synthetic Medications in Counterfeit Herbal Medicines with Confirmation by HPLC-PDA and Mass Spectrometry. *Chromatographia* **2018**, *81* (5), 777-783.
84. Chen, Y.; Zhao, L.; Lu, F.; Yu, Y.; Chai, Y.; Wu, Y., Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2009**, *26* (5), 595-603.
85. Shi, Y.; Sun, C.; Gao, B.; Sun, A., Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. *J Chromatogr A* **2011**, *1218* (42), 7655-62.
86. Shaodong, J.; Lee, W. J.; Ee, J. W.; Park, J. H.; Kwon, S. W.; Lee, J., Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs. *J Pharm Biomed Anal* **2010**, *51* (4), 973-8.

87. Poplawska, M.; Blazewicz, A.; Bukowinska, K.; Fijalek, Z., Application of high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection for universal quantitation of undeclared phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* **2013**, *84*, 232-43.
88. Becue, I.; Van Poucke, C.; Van Peteghem, C., An LC-MS screening method with library identification for the detection of steroids in dietary supplements. *J Mass Spectrom* **2011**, *46* (3), 327-35.
89. Reepmeyer, J. C.; Woodruff, J. T., 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* **2007**, *44* (4), 887-93.
90. Reepmeyer, J. C.; Woodruff, J. T., 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* **2006**, *1125* (1), 67-75.
91. Reepmeyer, J. C.; Woodruff, J. T.; d'Avignon, D. A., Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2007**, *43* (5), 1615-21.
92. Lam, Y. H.; Poon, W. T.; Lai, C. K.; Chan, A. Y.; Mak, T. W., Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product. *J Pharm Biomed Anal* **2008**, *46* (4), 804-7.
93. Reepmeyer, J. C.; d'Avignon, D. A., Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs. *J Pharm Biomed Anal* **2009**, *49* (1), 145-50.
94. Cianchino, V.; Acosta, G.; Ortega, C.; Martinez, L. D.; Gomez, M. R., Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chem* **2008**, *108* (3), 1075-81.
95. De Carvalho, L. M.; Cohen, P. A.; Silva, C. V.; Moreira, A. P.; Falcao, T. M.; Dal Molin, T. R.; Zemolin, G.; Martini, M., A new approach to determining pharmacologic adulteration of herbal weight loss products. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2012**, *29* (11), 1661-7.
96. Ahn, S.; Hong, J. Y.; Hong, M. K.; Jang, Y. P.; Oh, M. S.; Jung, J. H.; Hong, J., Structural determination of sildenafil and its analogues in dietary supplements by fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23* (19), 3158-66.
97. Kee, C. L.; Ge, X.; Low, M. Y.; Koh, H. L., Structural elucidation of a new sildenafil analogue using high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2013**, *27* (12), 1380-4.
98. Koulman, A.; Tapper, B. A.; Fraser, K.; Cao, M.; Lane, G. A.; Rasmussen, S., High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21* (3), 421-8.
99. Song, F.; El-Demerdash, A.; Lee, S. J., Screening for multiple phosphodiesterase type 5 inhibitor drugs in dietary supplement materials by flow injection mass spectrometry and their quantification by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *70*, 40-6.
100. Song, F.; Monroe, D.; El-Demerdash, A.; Palmer, C., Screening for multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *88*, 136-43.
101. Petucci, C.; Diffendal, J., Atmospheric solids analysis probe: a rapid ionization technique for small molecule drugs. *J Mass Spectrom* **2008**, *43* (11), 1565-8.
102. Wang, H.; Sun, W.; Zhang, J.; Yang, X.; Lin, T.; Ding, L., Desorption corona beam ionization source for mass spectrometry. *Analyst* **2010**, *135* (4), 688-95.
103. Twohig, M.; Skilton, S. J.; Fujimoto, G.; Ellor, N.; Plumb, R. S., Rapid detection and identification of counterfeit and [corrected] adulterated products of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors with an atmospheric solids analysis probe. *Drug Test Anal* **2010**, *2* (2), 45-50.
104. Wu, S.; Wang, H.; Zhu, H.-G.; Zhao, Y.; Tian, Q.-Q.; Sun, W.-J.; Chen, B., Rapid Determination of Illegally Added Phosphodiesterase 5-Inhibitors in Health Food by Desorption Corona Beam Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *40*, 1081-1085.



105. Gratz, S. R.; Gamble, B. M.; Flurer, R. A., 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* **2006**, *20* (15), 2317-27.
106. Trefi, S.; Routaboul, C.; Hamieh, S.; Gilard, V.; Malet-Martino, M.; Martino, R., Analysis of illegally manufactured formulations of tadalafil (Cialis) by 1H NMR, 2D DOSY 1H NMR and Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* **2008**, *47* (1), 103-13.
107. Vredenbregt, M. J.; Blok-Tip, L.; Hoogerbrugge, R.; Barends, D. M.; de Kaste, D., Screening suspected counterfeit Viagra and imitations of Viagra with near-infrared spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* **2006**, *40* (4), 840-9.
108. Deconinck, E.; Sacre, P. Y.; Coomans, D.; De Beer, J., Classification trees based on infrared spectroscopic data to discriminate between genuine and counterfeit medicines. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *57*, 68-75.
109. Champagne, A. B.; Emmel, K. V., Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. *Vibrational Spectroscopy* **2011**, *55* (2), 216-223.
110. Venhuis, B. J.; Tan, J.; Vredenbregt, M. J.; Ge, X.; Low, M. Y.; de Kaste, D., Capsule shells adulterated with tadalafil. *Forensic Sci Int* **2012**, *214* (1-3), e20-2.
111. Vaysse, J.; Gilard, V.; Balayssac, S.; Zedde, C.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *59*, 58-66.
112. Kee, C. L.; Ge, X.; Koh, H. L.; Low, M. Y., Isolation and characterization of propoxyphenyl linked sildenafil and thiosildenafil analogues in health supplements. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *70*, 265-72.
113. Zou, P.; Hou, P.; Oh, S. S.; Chong, Y. M.; Bloodworth, B. C.; Low, M. Y.; Koh, H. L., Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements. *J Pharm Biomed Anal* **2008**, *47* (2), 279-84.
114. Balayssac, S.; Gilard, V.; Zedde, C.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: first characterization of propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine and tetrahydropalmatine as adulterants. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *63*, 135-50.
115. Martino, R.; Malet-Martino, M.; Gilard, V.; Balayssac, S., Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398* (1), 77-92.
116. Balayssac, S.; Trefi, S.; Gilard, V.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Delsuc, M. A., 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* **2009**, *50* (4), 602-12.
117. Rijk, J. C.; Bovee, T. F.; Wang, S.; Van Poucke, C.; Van Peteghem, C.; Nielen, M. W., Detection of anabolic steroids in dietary supplements: the added value of an androgen yeast bioassay in parallel with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method. *Anal Chim Acta* **2009**, *637* (1-2), 305-14.
118. Plotan, M.; Elliott, C. T.; Oplatowska, M.; Connolly, L., Validation and application of reporter gene assays for the determination of estrogenic and androgenic endocrine disruptor activity in sport supplements. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *403* (10), 3057-67.
119. Peters, R. J.; Rijk, J. C.; Bovee, T. F.; Nijrolder, A. W.; Lommen, A.; Nielen, M. W., Identification of anabolic steroids and derivatives using bioassay-guided fractionation, UHPLC/TOFMS analysis and accurate mass database searching. *Anal Chim Acta* **2010**, *664* (1), 77-88.

## 2 Cas d'un complément alimentaire à visée érectile

Comme nous l'avons décrit dans la partie introductive, bien qu'ils ne soient officiellement censés être que des substances alimentaires ayant pour but de compléter un régime alimentaire ou d'améliorer le confort de vie, beaucoup de compléments alimentaires se transforment en « médicament par fonction » du fait de la récurrente présence de substances de synthèse délibérément ajoutées dans ces matrices pourtant annoncées naturelles, dans le but d'en accroître l'efficacité. Dans le cadre de l'étude de compléments alimentaires à visée érectile les études décrivant des cas d'adultération reportent souvent la présence de sildénafil, la molécule active du Viagra®. Cependant au cours de la dernière décennie cette tendance évolue vers l'adultération par des analogues structuraux de ces inhibiteurs de phosphodiesterase 5. Souvent détectés seuls, on reporte également leur association avec d'autres actifs dans un seul complément alimentaire.

Dans la publication présentée ci-après, nous avons analysé un complément alimentaire en phase de pré-commercialisation proposé pour lutter contre le dysfonctionnement érectile et annoncé comme 100% naturel. Dans cette étude, la première analyse menée en RMN  $^1\text{H}$  a permis de mettre en évidence la présence de deux adultérants majoritaires : le sildénafil et celle d'un de ses analogues décrit, le méthisosildénafil, mais également celle de plusieurs autres composés minoritaires dont les signatures spectrales laissaient envisager la présence d'analogues structuraux.

Afin de caractériser l'ensemble des molécules détectées par RMN, dans un premier temps des purifications par chromatographie en phase supercritique (SFC) et chromatographie liquide (LC) préparatives ont été mises en œuvre. Les proximités structurales, associées aux écarts de concentrations conséquents au sein du mélange ont considérablement accru la difficulté des expériences menées. Dans un second temps, la caractérisation des molécules ainsi purifiées a été réalisée par RMN mono- et bi-dimensionnelles ainsi que par spectrométrie de masse haute résolution et en tandem.

L'étude présentée dans cet article permet d'illustrer le fait que si la RMN est une excellente méthode pour détecter sans a priori et quantifier des adultérants dans un mélange, il est régulièrement nécessaire dans des cas de mélanges complexes d'appréhender les techniques analytiques comme des techniques complémentaires pour une élucidation structurale univoque.

Dans le cas de cette formulation, nous pensons que les deux composés majoritaires ont été intentionnellement ajoutés à la préparation, alors que tous les autres composés détectés résultent vraisemblablement d'un mauvais contrôle des étapes de synthèse de ces deux composés. Cet exemple

illustre la mauvaise qualité des préparations potentiellement proposées au consommateur. Ici l'ensemble des composés synthétiques frauduleux représente environ 20% (p/p) de la préparation.

# Purification and characterization of fifteen sildenafil derivatives in one dietary supplement

G. Assemat<sup>1</sup>, S. Balayssac<sup>1</sup>, N. Martins<sup>2</sup>, I. Fabing<sup>3</sup>, V. Gilard<sup>1</sup>, Y. Genisson<sup>4</sup>, M. Malet-Martino<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France

<sup>2</sup> Service Commun de Spectrométrie de Masse, ICT, Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 31062 Toulouse cedex, France

<sup>3</sup> Service Commun de Chromatographie, ICT, Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 31062 Toulouse cedex, France

<sup>4</sup> Equipe MoNALISA, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France

## Abstract:

A dietary supplement in pre-commercialization phase was analyzed. It contains sildenafil and methisosildenafil as major components. In addition, fourteen other compounds were detected and after isolation, their structures were elucidated and characterized using Nuclear Magnetic Resonance (NMR), high resolution and tandem Mass Spectrometry (MS and MS/MS) as well as UV spectroscopy. We assume that these products are formed during the synthesis process of the two main detected components, and that they still are detected in the final dietary supplements due to a lack of or incorrect purification step. The total amount of adulterants in this sample was estimated to 70 mg by capsule.

**Keywords:** SFC; HPLC; NMR; mass spectrometry; adulteration; food supplement; PDE-5 inhibitor

---

*Version provisoire de l'article qui sera prochainement soumis*

---

## 1. Introduction

Nowadays, consumers' keen interest in dietary supplements stems from their sometimes distorted perception that these products are safe and harmless because of their natural origins. In the absence of a uniform regulation and strict controls of these products, unscrupulous manufacturers may fraudulently add active substances to these mixtures in order to increase their pharmacological effect. Until the detection of the first analogue of sildenafil: homosildenafil in 2003,<sup>1</sup> this phenomenon of adulteration of dietary supplements by synthetic phosphodiesterase-type 5 inhibitors (PDE-5i) and analogues has been widely reported. Since, the number of analogues of sildenafil detected in dietary supplements has steadily increased and reached 50 in march 2017. However, according to a recent review of Kee *et al.* this value does not include analogues of the others PDE-5 inhibitors (Tadalafil, Vardenafil...). Considering them, we have so far recorded a total of 80 unapproved analogues already detected in dietary supplements.<sup>2</sup> The trend observed in the last decade is the adulteration of dietary supplements, not only with one chemical, but also with a mixture of active substances.<sup>3</sup> In this study, sildenafil and fifteen of its analogues were isolated from a single dietary supplement using Supercritical Fluid Chromatography (SFC) and Liquid Chromatography (LC) purification methods. All the compounds were then fully identified using NMR, MS, MS/MS and UV spectroscopy. To the best of our knowledge, twelve of these compounds have never been reported.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

One dietary supplement in pre-commercialisation phase was submitted for analysis. Its composition was claimed as follows: raspberry (*Rubus idaeus*) 25%, Solomon's seal (*Polygonatum sibiricum*) rhizome 25%, common yam (*Dioscorea opposita*) rhizome 20%, barbary wolfberry (*Lycium chinense*) fruit 15%, cassia (*Cinnamomum cassia*) bark 15%. Twenty-four capsules containing each approximately  $360 \pm 20$  mg ( $n = 19$ ) of brown powder were used for this study.

All the chromatographic solvents (RS-HPLC-Preparative grade for purification steps with preparative HPLC and RS-HPLC-GOLD-Ultra gradient grade for analytical purposes) were purchased from Carlo Erba. Deuterated solvents for NMR and internal chemical shift reference sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilyl-propionate (TSP)) were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Purification of active compounds

#### 2.2.1. Sample preparation prior to SFC experiments

A preliminary analysis showed that the sample contained a sort of “tar” which could prevent purification or complicate further purification steps. To get rid of it, a first pre-extraction procedure was implemented. The powder from 24 capsules was treated in two steps. It was first extracted with 3 mL of a CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) mixture, vortexed for 15 s, sonicated for 10 min and centrifuged (3000 rpm) for 5 min at room temperature. The supernatant (2800 µL) was collected and transferred into a glass tube. In a second step, the pellet was re-extracted with the same protocol using 1 mL of solvent. The supernatants were then pooled and the solution was evaporated to dryness. For SFC purification, 2.9 g of the residual powder were dissolved by sonication in 58 mL of methanol. Before injection, samples were filtered on 0.45 µm GHP membranes.

### *2.2.2. Preparative SFC*

All preparative SFC separations were carried out on a BetaSil Diol-100 (250 x 21.2 mm, 5 µm) column using a Berger Multigram II Preparative SFC system (Mettler Toledo, Viroflay, France) and the SFC ProNTo software. Preparative SFC was operated with an elution gradient at a back pressure of 100 bar, a temperature of 40°C, a flow rate of 42.5 mL/min and a UV detection at 235 nm. The gradient started by an isocratic elution of CO<sub>2</sub> and 10% methanol containing 0.5% (v/v) isopropylamine during 0.5 min, the organic modifier percentage was then increased to 28% at 8 min and remained at this value until 15 min. At last the column was re-equilibrated in the initial elution conditions from 16 to 20 min (Table 1). 116 injections were done. Seven fractions were collected as indicated in the chromatogram of Figure 1A, i.e. 3-6 min (C1), 6.05-6.45 min (W2), 6.5-7.8 min (C2), 7.85-8.75 min (W3), 8.8-10.1 min (C3), 10.15-11.45 min (W4) and 11.5-13.2 min (C4). All fractions were then evaporated to dryness.

### *2.2.3. Preparative LC*

Each SFC fraction was dissolved either in the starting LC eluent (W3, C3, W4, C4) or in a mixture of the starting LC eluent and methanol (W2 and C2) or acetonitrile (C1). Purifications were performed on a Waters Prep 150 LC System instrument (Waters Corporation, Milford, USA) equipped with a 2545 Binary Gradient pump, a 2707 autosampler, a 2998 Diode Array detector (DAD) and a WFC III fraction collector. Data were processed using the Chromscope software. Columns and elution conditions for preparative LC are reported in Table 1 and chromatograms are shown in Figure 1B. UV detection was set at 235 nm for all experiments. Two compounds (**13** and **14**) were collected in the same fraction, but their structures could nevertheless be determined. All fractions recovered were lyophilized after purification.

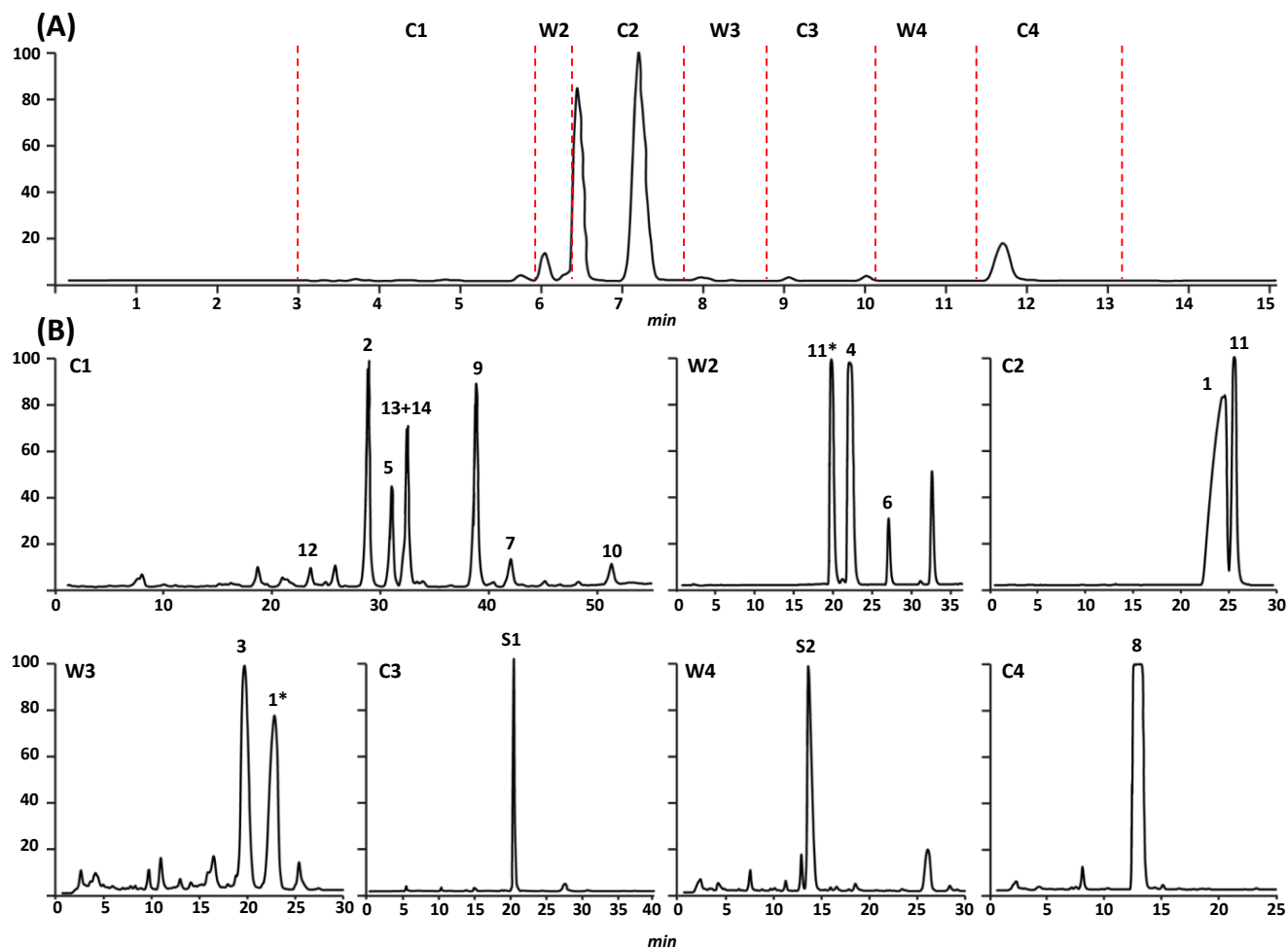


Figure 1: (A) SFC-UV chromatogram on BetaSil Diol-100 column (the collection windows are indicated by the vertical dashed lines). (B) LC-UV chromatograms on reverse phase columns. All experimental conditions are reported in Table 1. The concentration injected in mg powder/mL is different on each case: SFC = 50 mg/mL, C1 = 6.28 mg/mL, W2 = 8.52 mg/mL, C2 = 4.81 mg/mL, W3 = 18.6 mg/mL, C3 = 8.46 mg/mL, W4 = 6.78 mg/mL and C4 = 18.46 mg/mL. In fractions W2 and W3, the presence of compounds 1 and 11 in the sub-fractions annotated 11\* and 1\* may be due to the high concentrations of these compounds in fraction C2.

#### 2.2.4. Analytical UPLC

Each LC fraction was dissolved in methanol at a concentration of  $\approx 0.5$  mg/mL and its purity was controlled by UPLC using a Waters Acquity UPLC system (Waters Corporation, Milford, USA) equipped with a binary solvent delivery pump, an auto sampler, a photodiode array detector (PDA), a QDa mass detector and the Empower 3 software. The analytical conditions are reported in Table 1. The UV spectra discussed later (Figure 8) were obtained from these UPLC analyses.

Table 1 : Chromatographic conditions for purification of sildenafil and its 15 analogues from the dietary supplement analyzed.

		SFC conditions <sup>a</sup>		Preparative LC conditions <sup>a</sup>								Analytical UPLC <sup>a</sup>	
		CS1	CS2A	CS2B	CS2C-1	CS2C-2	CS2D-1	CS2D-2	CS2D-3	AN			
Used on fraction		Raw	C1	W2	C2	W3	C3	W4	C4	All			
Instrument		Berger Multigram II preparative SFC	Waters Prep 150 LC	Waters Prep 150 LC	Waters Prep 150 LC		Waters Prep 150 LC			Waters Acquity UPLC			
Column		BetaSil Diol-100 <sup>b</sup>	Kromasil C18 <sup>c</sup>	CSH C18 <sup>c</sup>	Kromasil C18 <sup>c</sup>		Kromasil C18 <sup>c</sup>			Acquity UPLC CSH C18 <sup>d</sup>			
Mobile phase	A	CO <sub>2</sub> (100 bar)	10 mM ammonium acetate	0.1% (v/v) TFA in water	10 mM ammonium acetate		10 mM ammonium acetate			0.1% (v/v) TFA <sup>e</sup> in water			
	B	0.5% (v/v) isopropylamine in methanol	10% (v/v) of 100 mM ammonium acetate in acetonitrile	10% (v/v) of A in acetonitrile	10% (v/v) of 100 mM ammonium acetate in acetonitrile		10% (v/v) of 100 mM ammonium acetate in acetonitrile			0.1% (v/v) TFA <sup>e</sup> in acetonitrile			
Gradient elution profile	Step	min	% of B	min	% of B	min	% of B	min	% of B	min	% of B	min	% of B
	1	0 - 0.5	10	0 - 50	30 - 100	0 - 40	10 - 70	0 - 40	30 - 70	0 - 40	25 - 70	0 - 4	5 - 95
	2	0.5 - 8	10 - 28	50 - 55	100	40 - 41	70 - 100	40 - 41	70 - 100	40 - 41	70 - 100	4 - 5.5	95
	3	8 - 15	28			41 - 50	100	41 - 50	100	41 - 50	100	5.5 - 5.51	5
	4	15 - 16	28 - 10									5.51 - 7.3	5
5	16 - 20	10											
Flow rate		42.5 mL/min	120 mL/min	120 mL/min	120 mL/min		120 mL/min			0.6 mL/min			
Temperature		40 °C	RT	RT	RT		RT			30 °C			
Injection volume		0.5 mL	9 mL	7 mL	40 mL	10 mL	10 mL	12 mL	8 mL	1 µL			
Compounds collected <sup>f</sup>		All	12,2,5,13,14,9,7,10	4,6	1,11	3	S1	S2	8				

<sup>a</sup> UV detection at 235 nm and for analytical UPLC, cone voltage of QDa mass detector used in positive mode set at 30 eV.

<sup>b</sup> 250 mm × 21.2 mm i.d., 5 µm particle size.

<sup>c</sup> 250 mm × 50 mm i.d., 10 µm particle size.

<sup>d</sup> 100 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size.

<sup>e</sup> TFA: trifluoroacetic acid.

<sup>f</sup> Names and retention times of collected compounds are reported in Table 2.



### 2.3. Characterization of active compounds

#### 2.3.1. NMR

Two to 7 mg of each lyophilized final fraction were solubilized in 1 mL of a CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20 v/v) mixture, the solution was vortexed for 15 s, and sonicated for 10 min. To achieve the solubilisation of compounds **S1** and **S2**, 5 µL of a 0.7 M NaOD solution were added. Thirty µL of a 5 mM solution of sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilyl-propionate (TSP) in D<sub>2</sub>O as an internal reference for chemical shift ( $\delta$ ) measurement were added before the NMR analysis.

For the quantitative determination of sildenafil derivatives in the dietary supplement (done in triplicate), around 10 mg of the initial powder were accurately weighed and 1 mL of deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD) was added. The suspension was submitted to vortex agitation for 15 s, sonication for 10 min, magnetic stirring for 20 min and it was then centrifuged (5 min, 3000 rpm). Thirty µL of a 5 mM solution of TSP were added to 800 µL of supernatant and the solution was transferred into a 5 mm NMR tube.

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 (I) spectrometer (Bruker Biospin AG, Fallanden, Switzerland) equipped with a 5 mm cryoprobe and a sample jet, operating here at 298 K. The structural elucidation of purified sildenafil derivatives was achieved thanks to one-dimensional (1D; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) and two-dimensional (2D; gCOSY, gHSQC, gHMBC and NOESY) experiments. The 1D <sup>1</sup>H NMR spectrum of the dietary supplement was acquired with inverse gated decoupling for <sup>13</sup>C using a GARP sequence. Acquisition parameters were set as follows: number of scans 32, pulse width 10.7 µs (flip angle 90°), acquisition time 1.56 s, spectral width 10500 Hz, 32K data points, and relaxation delay 4 s; the recording time was thus ≈4 min. For quantitative NMR experiments, the relaxation delay was lengthened to 15 s for a full relaxation of the <sup>1</sup>H resonances and the number of scans was raised to 128. NMR data were processed using the TOPSPIN 3.1 software.

The NMR assignment of sildenafil derivatives in the dietary supplement was done by adding the previously purified and identified compound into the initial mixture.

#### 2.3.2. Mass spectrometry

The powders were dissolved in CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) and analyzed after direct infusion using a Waters XEVO G2 QTOF (Waters, Manchester, UK) mass spectrometer. For both positive and negative electrospray ionization (ESI) modes, instrument parameters were set as follows: for MS analysis, cone voltage 30 V, scan range m/z 50-2000; for MS/MS analysis three different collision energies (15, 25 and 35 V) were applied with a cone voltage maintained at 30 V and a scan range m/z 50-1200. For the

analysis of MS/MS fragments, the relative mass error was <5 ppm for ions with  $m/z > 100$ , and <10 ppm for ions of lower mass.

### 3. Results

#### 3.1. Preliminary $^1\text{H}$ NMR analysis of the dietary supplement

As soon as the dietary supplement was received for control in our lab, its  $^1\text{H}$  NMR analysis was performed with routine conditions<sup>3</sup> in order to detect a possible adulteration. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum clearly showed that the herbal mixture was not natural as expected from its claimed composition. The presence of two main contaminants could be deduced from the highest signals that were assigned to sildenafil **11** and methisosildenafil **1** thanks to our in-house NMR and MS databases. Nonetheless, our attention was caught by the numerous minor signals whose multiplicity, chemical shift and coupling constant could be compatible with those of PDE-5i analogues. To get rid of carbon satellites that increase spectrum complexity, mainly when closely related structures are expected, a  $^{13}\text{C}$  GARP broadband decoupled  $^1\text{H}$  NMR spectrum was acquired, confirming the presence of minor adulterants (Figure 2).

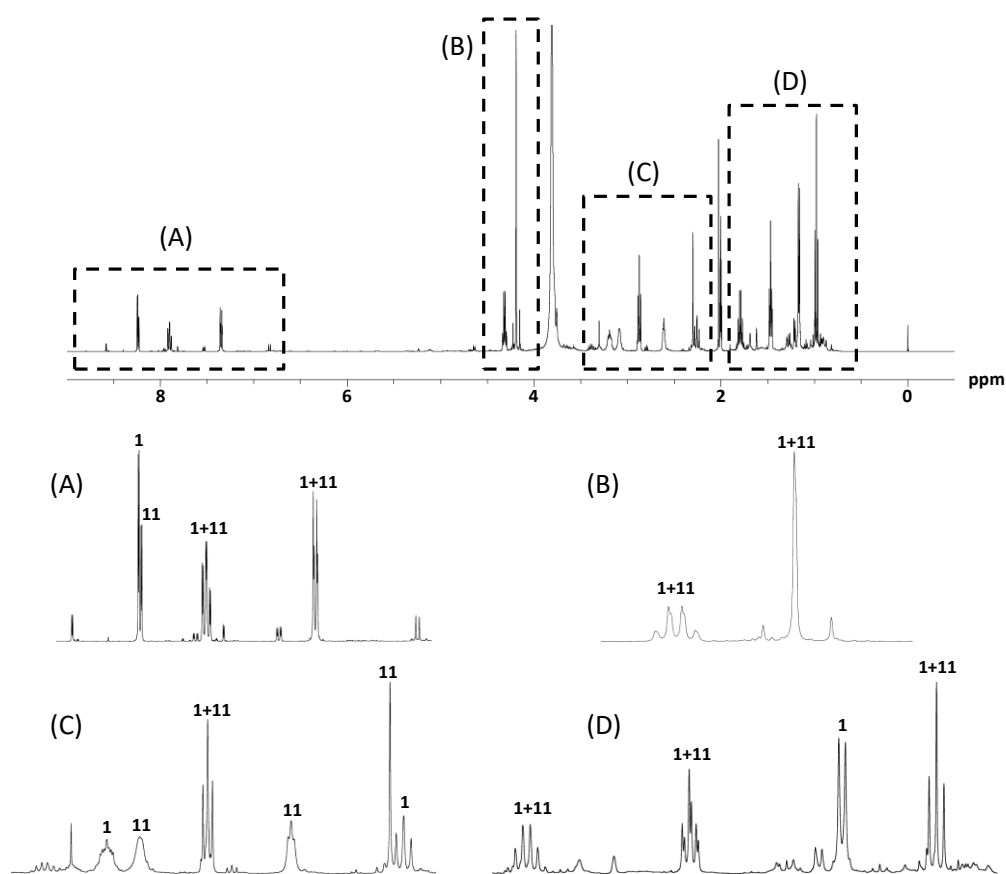


Figure 2:  $^1\text{H}$  NMR spectrum with  $^{13}\text{C}$  GARP broadband decoupling of the dietary supplement recorded in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v). A, B, C and D correspond to zoomed areas highlighted by boxes in the full spectrum. Main signals of sildenafil (**11**) and methisosildenafil (**1**) are shown.

In order to determine their structures, we thus decided to purify the dietary supplement and to isolate the compounds detected. The main issue encountered in the purification of this complex mixture was the huge concentration differences of the various analytes as illustrated in the NMR spectrum where large and small signals co-exist (Figure 2). To overcome this difficulty and after some unsuccessful attempts using both reverse and normal LC (results not shown), we chose to work in two steps using first a SFC pre-fractionation followed by LC purifications.

### *3.2. Purification of the dietary supplement*

The SFC purification was done using a BetaSil diol phase. This polar stationary phase and the chosen elution mode provided sharp enough peaks, satisfactory chromatographic resolution and separation as well as short enough total run time. The use of basic (0.5% isopropylamine) elution conditions allowed the reduction of peak tailing for molecules containing amine groups. The optimized SFC purification procedure consisted in 116 injections of 25 mg of raw extract dissolved in 500  $\mu$ L of methanol. Seven fractions were collected from 3 to 13.2 min as shown in Figure 1A.

Each SFC fraction was then re-purified by preparative LC. All the experimental conditions are gathered in Table 1 and chromatograms are illustrated in Figure 1B. The chromatographic conditions were chosen after a screening step using either neutral or acidic medium and two stationary phases Kromasil C18 and CSH C18. The elution gradient was optimized for each separation.

The two steps of purification with polar (SFC) and non-polar (LC) chromatographic phases led to the purification of 16 compounds. The purity of each preparative LC fraction (except that containing compounds **13** and **14** which could not be separated) was evaluated from the UPLC-UV chromatograms performed under a routine basis and was between 88.8 and 99.3% (mean 96.3%). It should also be noticed that 14 out of the 16 products eluted between 2.07 and 2.92 min (Table 2), which also justifies the use of two orthogonal chromatographic methods that provided complementary selectivity to achieve the purification.

Table 2 : IUPAC name of the purified compound associated with their respective retention time and pseudo molecular ion.

Compound number	Chemical name (abbreviation)	IUPAC name	Retention time <sup>a</sup> (min)	UPLC-MS [M+H] <sup>+</sup>
1	MethisoSildenafil (MSild)	5-(5-((3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-ethoxyphenyl)-1-methyl-3-propyl-1,4-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.15	489
2	N26-Ethyl MethisoSildenafil (MSildEt <sup>N26</sup> )	5-(2-ethoxy-5-((4-ethyl-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-1-methyl-3-propyl-1,4-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.21	517
3	N4-Ethyl MethisoSildenafil (MSildEt <sup>N4</sup> )	5-(5-((3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-ethoxyphenyl)-4-ethyl-1-methyl-3-propyl-1,4-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.09	517
4	N6-Ethyl MethisoSildenafil (MSildEt <sup>N6</sup> )	5-(5-((3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-ethoxyphenyl)-6-ethyl-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.25	517
5	N6,N26-Diethyl MethisoSildenafil (MSildEt <sup>N6</sup> Et <sup>N26</sup> )	5-(2-ethoxy-5-((4-ethyl-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-6-ethyl-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.31	545
6	O7-Ethyl MethisoSildenafil (MSildEt <sup>O7</sup> )	5-(5-((3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-ethoxyphenyl)-7-ethoxy-1-methyl-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine	2.58	517
7	O7,N26-Diethyl MethisoSildenafil (MSildEt <sup>O7</sup> Et <sup>N26</sup> )	7-ethoxy-5-(2-ethoxy-5-((4-ethyl-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-1-methyl-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine	2.64	545
8	O-Desethyl MethisoSildenafil (MSildOH)	5-(5-((3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-hydroxyphenyl)-1-methyl-3-propyl-1,4-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.22	461
9	O7-Ethyl-O-Desethyl MethisoSildenafil (MSildOHEt <sup>O7</sup> )	4-((3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-(7-ethoxy-1-methyl-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)phenol	2.86	489
10	O7,N26-Diethyl-O-Desethyl MethisoSildenafil (MSildOHEt <sup>O7</sup> Et <sup>N26</sup> )	2-(7-ethoxy-1-methyl-3-propyl-4,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-((4-ethyl-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenol	2.92	517
S1	N26-Ethyl-O-Desethyl Sildenafil (MSildOHEt <sup>N26</sup> )	5-(5-((4-ethyl-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)sulfonyl)-2-hydroxyphenyl)-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.27	489
11	Sildenafil (Sild)	5-(2-ethoxy-5-((4-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-1-methyl-3-propyl-1,4-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.07	475
12	N6-Ethyl Sildenafil (SildEt <sup>N6</sup> )	5-(2-ethoxy-5-((4-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-6-ethyl-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.16	503
13	DesulfoSildenafil (DeSild)	5-(2-ethoxyphenyl)-1-methyl-3-propyl-1,4-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	3.42	313
14	N6-EthylDesulfo Sildenafil (DeSildEt <sup>N6</sup> )	5-(2-ethoxyphenyl)-6-ethyl-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	3.42	341
S2	O-Desethyl Sildenafil (SildOH)	5-(2-hydroxy-5-((4-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one	2.15	447

<sup>a</sup> UPLC analytical conditions for the control of the chemical purity of each compound are reported in Table 1

### 3.3. Characterization of purified compounds

Due to the significant number of compounds detected, and in order to present the results as clearly as possible, we will first present all the elucidated structures and then explain the whole scientific approach leading to these results.

The chemical structures and names of all the purified compounds are reported in respectively Figure 3 and Table 2. All the molecules are built around the sildenafil scaffold (i.e. the 5-phenyl-pyrazolo[4,3-d]-pyrimidine moiety), 14 out of the 16, are functionalized with a sulfonyl group linked to a piperazine ring. All the structures discussed here mainly differ from either presence, absence or substitution of an ethyl group N- or O- linked to either piperazine or pyrimidine (-one).

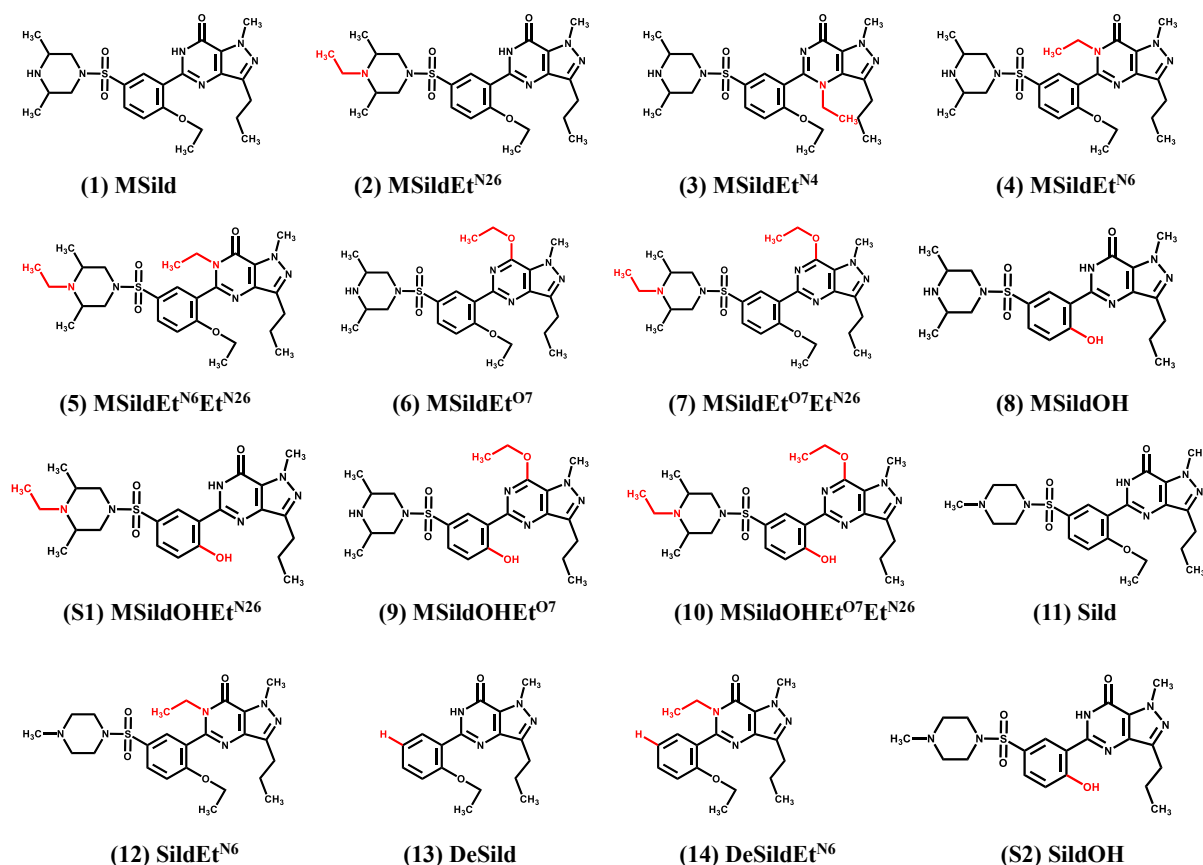


Figure 3: Chemical structures of sildenafil and its analogues purified and characterized in this study.

All the compounds were characterized using <sup>1</sup>H NMR and MS. The pseudomolecular ion masses and the main positive fragmentation data are reported in Table 3. MS/MS data for negative ionization are presented as supplementary materials in Table S1. From the MS data Table 3, it clearly appears that several position isomers were initially present in the mixture. Indeed, three compounds lead to a

similar pseudomolecular ion at  $m/z$  489 (**1**, **9** and **S1**), five at  $m/z$  517 (**2**, **3**, **4**, **6** and **10**) and two at  $m/z$  545 (**5** and **7**). The fragmentation patterns allow to determine the structural modification on the analogues,<sup>4-5</sup> tandem mass spectrometry is therefore necessary along with NMR in order to distinguish each isomer. In Figure 4 are reported the MS/MS spectra of three methisosildenafil derivatives (**2**, **4** and **8**) highlighting three characteristic and representative fragmentation patterns depending on the structural modification.

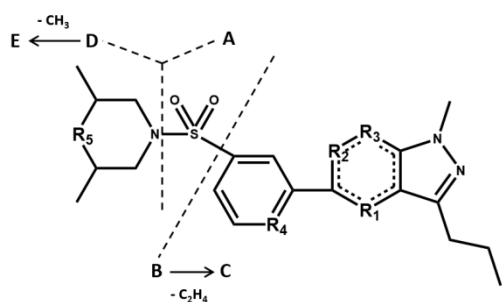
Indeed, when the modification occurs either on the benzene or on the pyrazolo pyrimidine part, the comparison of the masses of typical fragments (described as A, B and C on Table 3) for each compound with those of the reference compound **1** are very informative. We can note for instance typical fragments at 405, 339 and 311 for compounds **3**, **4** and **6** instead of 377, 311 and 283 for the methisosildenafil **1** (i.e. a +28 uma difference) when an ethyl group is linked somewhere (R1, R2, R3) in the main scaffold (Figure 4, compound **4**). The compound **8** also reported in Figure 4 presents 3 different fragments (i.e. 347, 288 and 255) (i.e. a -28 uma difference) by comparison to compound **1** related this time to the replacement of the ethoxybenzene moiety by a phenol group. Some cases are even trickier, for example, if we take a look only to the fragments A, B and C of compounds **9** it looks like the fragmentation pathway is the same as the reference compound **1**. However, it corresponds at the same time to both the presence of a phenol group (i.e. -28uma) and to an "ethylation" of the O7 (i.e. +28uma) so overall the observed fragments are the same.

Concerning the piperazine ring, ions at  $m/z$  113 and  $m/z$  99 (corresponding to fragments D and E in Table 3) are detectable for dimethylsubstitution corresponding to the methisosildenafil scaffold (compounds **1**, **3**, **4**, **6**, **8** and **9**) while an additional N-ethyl substitution (R5) produce fragment ions at  $m/z$  141 and 127 (compounds **2**, **5**, **7**, **10**, **S1**), as illustrated in the Figure 4 (compound **2**). For a single methyl substitution on the nitrogen of the piperazine ring, characteristic fragmentation of sildenafil itself lead to 4-methylpiperazin-1-yl-1-ylum radical cation ( $[C_5H_{12}N_2]^{+\bullet}$ ) with  $m/z$  100 and/or the protonated 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyrazine ( $[C_5H_{11}N_2]^+$ ) with  $m/z$  99 ions,<sup>6</sup> a minor fragment is also observed at  $m/z$  84 ( $C_4H_8N_2^+$ ).

At this point we must notice that close fragment ions, either true cations and/or radical ions can be observed for some fragmentation i.e.  $C_{19}H_{23}N_4O_2^+$   $m/z$  339 (compounds **4**, **5**, **6**, **7**) or  $C_{19}H_{24}N_4O_2^{+\bullet}$   $m/z$  340 (compound **3**). Similarly, an intense  $m/z$  312 ions (not shown here) whose intensity is above the expected isotopic distribution and corresponding to radical ion ( $C_{17}H_{20}N_4O_2^{+\bullet}$ ) is observed in addition to  $m/z$  311 cation ( $C_{17}H_{19}N_4O_2^+$ ).

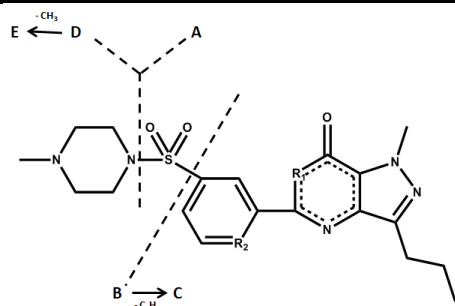
Once the positive fragmentation pathway understood, it appears some valuable clues to elucidate all the structures, as illustrated in dark grey in the Table 3. However, NMR data will be essential to accurately determine the position of the ethyl addition/substitution.

Table 3: Main MS fragments of all the collected compounds following the same fragmentation pathway.



R<sub>1</sub> = NH compounds (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, S1)  
 R<sub>1</sub> = NEt compound (3)  
 R<sub>2</sub> = NH compounds (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, S1)  
 R<sub>2</sub> = NEt compounds (4, 5)  
 R<sub>3</sub> = CO compounds (1, 2, 3, 4, 5, 8, S1)  
 R<sub>3</sub> = COEt compounds (6, 7, 9, 10)  
 R<sub>4</sub> = COEt compounds (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)  
 R<sub>4</sub> = COH compounds (8, 9, 10, S1)  
 R<sub>5</sub> = NH compounds (1, 3, 4, 6, 8, 9)  
 R<sub>5</sub> = NEt compounds (2, 5, 7, 10, S1)

Name	MH <sup>+</sup>	Fragments				
		A	B	C	D	E
(1) MSild	489.2277	377.1273 C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	311.1503 C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	283.1190 C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	113.1077 C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	99.0923 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(2) MSildEt <sup>N26</sup>	517.2599	377.1277 C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	311.1505 C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	283.1195 C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>141.1394</b> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>127.1238</b> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(3) MSildEt <sup>N4</sup>	517.2595	<b>405.1592</b> C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>340.1895</b> C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>311.1508</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	113.1083 C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	99.0928 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(4) MSildEt <sup>N6</sup>	517.2587	<b>405.1588</b> C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>339.1816</b> C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>311.1504</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	113.1085 C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	99.0929 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(5) MSildEt <sup>N6</sup> Et <sup>N26</sup>	545.2920	<b>405.1591</b> C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>339.1815</b> C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>311.1501</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>141.1392</b> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>127.1236</b> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(6) MSildEt <sup>O7</sup>	517.2602	<b>405.1591</b> C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>339.1815</b> C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>311.1501</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	113.1079 C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	99.0924 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(7) MSildEt <sup>O7</sup> Et <sup>N26</sup>	545.2922	<b>405.1588</b> C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>339.1817</b> C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>311.1500</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>141.1391</b> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>127.1236</b> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(8) MSildOH	461.1970	<b>347.0812</b> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>283.1198</b> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>255.1248</b> C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sup>+</sup>	113.1082 <sup>a</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	99.0926 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(9) MSildOHet <sup>O7</sup>	489.2295	<b>375.1127</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	311.1510 C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	283.1195 C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	113.1079 C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	99.0925 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(10) MSildOHet <sup>O7</sup> Et <sup>N26</sup>	517.2600	<b>375.1122</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	311.1506 C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	283.1191 C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>141.1391</b> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>127.1235</b> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(S1) MSildOHet <sup>N26</sup>	489.2281	<b>347.0809</b> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>283.1196</b> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>255.1245</b> C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sup>+</sup>	<b>141.1394</b> <sup>b</sup> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>127.1236</b> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>



R<sub>1</sub> = NH compounds (11, 13, S2)  
 R<sub>1</sub> = NEt compounds (12, 14)  
 R<sub>2</sub> = COEt compounds (11, 12, 13, 14)  
 R<sub>2</sub> = COH compound (S2)

(11) Sild	475.2130	377.1270 C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	311.1504 C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	283.1192 C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	100.1001 C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	84.0691 C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(12) SildEt <sup>N6</sup>	503.2447	<b>405.1596</b> C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>339.1816</b> C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>311.1510</b> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	100.1001 C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	84.0688 C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
(13) DeSild	313.1670	-	-	285.1353 C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-	-
(14) DeSildEt <sup>N6</sup>	341.1978	-	-	313.1660 C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-	-
(S2) SildOH	447.1814	<b>347.0812</b> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	<b>283.1203</b> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	<b>255.1248</b> C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sup>+</sup>	101.1081 C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	84.0691 C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>

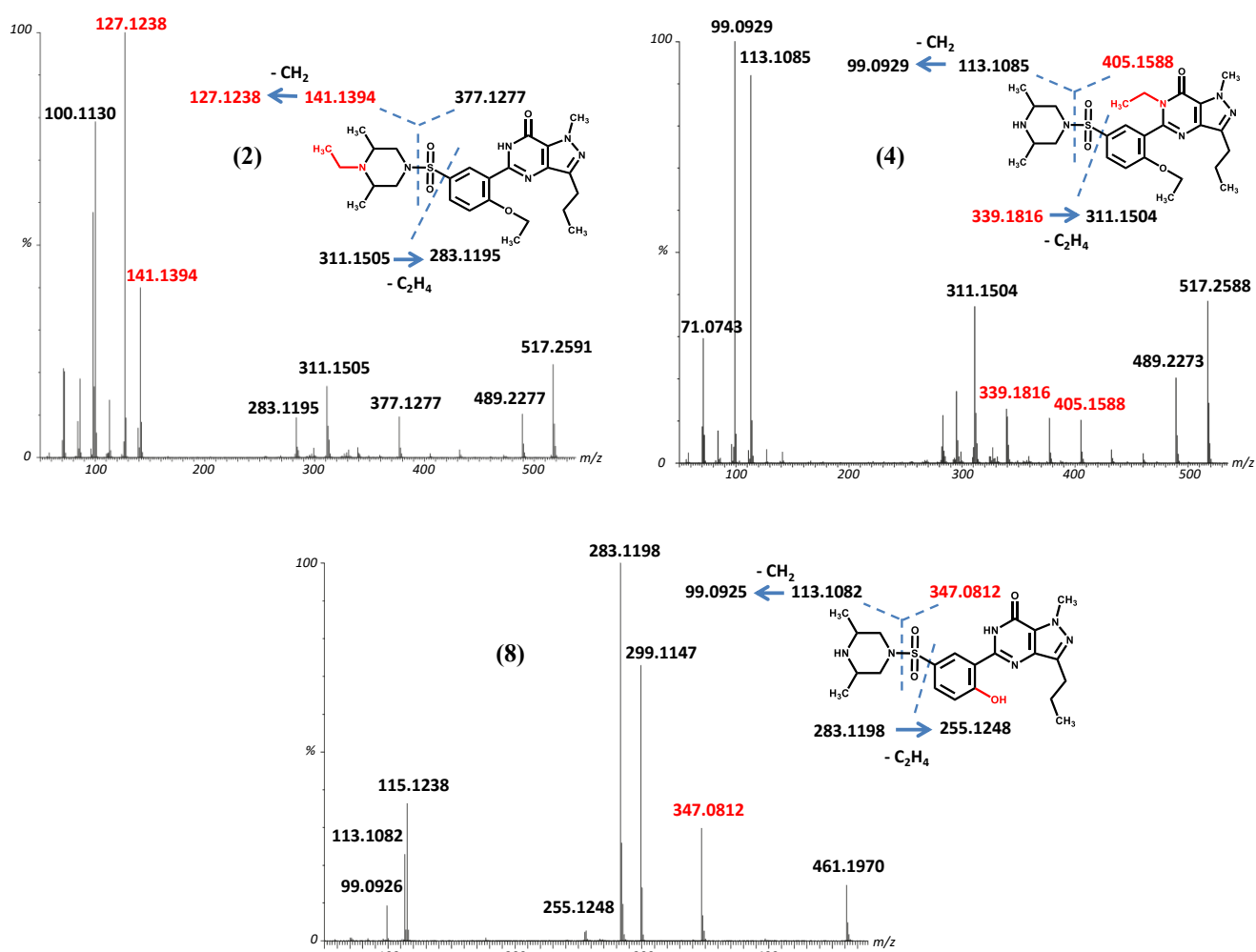


Figure 4: MS/MS fragmentations in positive ESI mode of the  $[M+H]^+$  ions of compounds **2**, **4** and **8**.

MS and MS/MS data under negative ionization condition are also reported in Table S1 of the supplementary materials. In these conditions the MS/MS of the pseudomolecular ions does not conduct to any fragmentations for compounds **3-7**, **12** and **14**. For other compounds, the main fragment corresponds to the loss of the piperazine-sulfonyl group, i.e. m/z 310 for compounds **1**, **2**, **9**, **10**, **11** and m/z 282 for compounds **8**, **S1** and **S2**. The ion m/z 282 is also observed in the MS/MS spectra of compounds **1**, **2**, **9**, **10**, **11**, it comes from the loss of an ethyl moiety (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) from the 310 fragments. Correspondingly, the MS/MS spectrum of the pseudomolecular ion of compound **13** at m/z 311 leads to a single fragment ion at m/z 282.



Table 4A:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of isolated methisosildenafil and related compounds with hydroxyl function in position 19.  $\delta$  were measured in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20).

N <sup>o</sup> (a)	MSild (1)				MSildOH (8)				MSildOHEt <sup>07</sup> (9)				MSildOHEt <sup>07</sup> Et <sup>N26</sup> (10)			
	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	
3	-	-	-	148.9	-	-	-	147.8	-	-	-	147.2 <sub>5</sub>	-	-	-	147.4
5	-	-	-	150.7 <sub>5</sub>	-	-	-	155.5	-	-	-	158.8	-	-	-	158.9 <sub>5</sub>
7	-	-	-	157.0	-	-	-	158.1	-	-	-	159.3 <sub>5</sub>	-	-	-	159.5
8	-	-	-	127.4	-	-	-	127.3	-	-	-	124.0 <sub>5</sub>	-	-	-	124.8
9	-	-	-	141.0	-	-	-	141.8	-	-	-	143.5 <sub>5</sub>	-	-	-	143.6
10	4.20 <sub>5</sub>	3H	s	40.4 <sub>5</sub>	4.17	3H	s	40.3 <sub>5</sub>	4.21	3H	s	41.0 <sub>5</sub>	4.22 <sub>5</sub>	3H	s	41.1
11	2.89	2H	t (7.4)	29.9 <sub>5</sub>	2.89	2H	t (7.4)	30.0	2.97 <sub>5</sub>	2H	t (7.4)	30.2 <sub>5</sub>	2.99 <sub>5</sub>	2H	t (7.4)	30.3 <sub>5</sub>
12	1.81	2H	sext (7.4)	24.8	1.81	2H	sext (7.4)	24.7 <sub>5</sub>	1.85 <sub>5</sub>	2H	sext (7.4)	24.6 <sub>5</sub>	1.86	2H	sext (7.4)	24.8
13	0.98 <sub>5</sub>	3H	t (7.4)	15.9	0.99	3H	t (7.4)	16.0 <sub>5</sub>	1.00 <sub>5</sub>	3H	t (7.4)	16.0	1.00	3H	t (7.4)	16.1
14	-	-	-	124.7 <sub>5</sub>	-	-	-	119.3 <sub>5</sub>	-	-	-	122.3 <sub>5</sub>	-	-	-	122.5 <sub>5</sub>
15	8.24 <sub>5</sub>	1H	d (2.4)	133.0	8.59	1H	d (2.7)	132.0 <sub>5</sub>	8.79 <sub>5</sub>	1H	d (2.4)	132.2	8.82 <sub>5</sub>	1H	d (2.4)	132.4
16	-	-	-	130.2 <sub>5</sub>	-	-	-	120.3	-	-	-	128.7	-	-	-	128.7 <sub>5</sub>
17	7.89 <sub>5</sub>	1H	dd (8.9 ; 2.4)	134.7	7.54	1H	dd (8.9 ; 2.7)	133.7	7.73 <sub>5</sub>	1H	dd (8.7 ; 2.4)	133.9 <sub>5</sub>	7.75	1H	dd (8.7 ; 2.4)	134.2
18	7.35 <sub>5</sub>	1H	d (8.9)	116.3	6.83	1H	d (8.9)	125.1 <sub>5</sub>	7.18	1H	d (8.7)	121.1	7.20	1H	d (8.7)	121.3
19	-	-	-	162.8	-	-	-	176.0 <sub>5</sub>	-	-	-	165.9 <sub>5</sub>	-	-	-	166.1
20	4.33	2H	q (7.0)	68.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	1.47 <sub>5</sub>	3H	t (7.0)	16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24/28 <sup>eq</sup> (c)	3.60	2H	md (11.3)	54.0 <sub>5</sub>	3.81	2H	md (11.9)	53.7	3.61	2H	md (11.2)	54.5	3.57	2H	md (11.2)	55.0 <sub>5</sub>
24/28 <sup>ax</sup> (c)	1.94	2H	app t (11.3)	54.0 <sub>5</sub>	2.32	2H	app t (11.5)	53.7	1.90	2H	app t (11.0)	54.5	2.15 <sub>5</sub>	2H	app t (11.0)	55.0 <sub>5</sub>
25/27	2.88	2H	m	52.7 <sub>5</sub>	3.30	2H	m	53.0 <sub>5</sub>	2.85 <sub>5</sub>	2H	m	52.8	2.73	2H	m	54.9
29/30	1.01	6H	d (6.4)	20.5	1.21	6H	d (6.5)	20.1 <sub>5</sub>	0.99	6H	d (6.4)	20.8	1.03	6H	d (6.3)	19.1
31	-	-	-	-	-	-	-	-	4.80	2H	q (7.1)	67.0	4.82	2H	q (7.1)	67.1
32	-	-	-	-	-	-	-	-	1.58	3H	t (7.1)	16.3 <sub>5</sub>	1.58	3H	t (7.1)	16.3 <sub>5</sub>
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.82	2H	q (7.2)	42.6 <sub>5</sub>
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.84 <sub>5</sub>	3H	t (7.1)	8.8

(a) Position number indicates either hydrogen or carbon

(b) Multiplicity: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; sext: sextuplet; m: multiplet; md: multiplet of doublet; app: apparent.

(c) ax: axial; eq: equatorial

Table 4B: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of isolated methisosildenafil related-compounds with an ethyl group in position 4, 6, 7 or 26. δ were measured in CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20).

N <sup>o</sup> (a)	MSildEt <sup>N4</sup> (3)			MSildEt <sup>N6</sup> (4)			MSildEt <sup>O7</sup> (6)			MSildEt <sup>N26</sup> (2)		
	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
3	-	-	140.7 <sub>5</sub>	-	-	148.2 <sub>5</sub>	-	-	148.3	-	-	148.9
5	-	-	158.4	-	-	153.1	-	-	158.4	-	-	150.9
7	-	-	164.7	-	-	157.1 <sub>5</sub>	-	-	159.1 <sub>5</sub>	-	-	157.1
8	-	-	129.4 <sub>5</sub>	-	-	127.5 <sub>5</sub>	-	-	124.2	-	-	127.5
9	-	-	130.5	-	-	138.9	-	-	146.2	-	-	141.1
10	4.24	3H s	40.5 <sub>5</sub>	4.21 <sub>5</sub>	3H S	40.4 <sub>5</sub>	4.20 <sub>5</sub>	3H s	41.0	4.20 <sub>5</sub>	3H s	40.5 <sub>5</sub>
11	2.91 <sub>5</sub>	2H app t (7.5)	31.8 <sub>5</sub>	2.79	2H t (7.4)	29.6 <sub>5</sub>	2.94	2H t (7.5)	30.2	2.89	2H t (7.4)	30.0
12	1.80	2H sext d (7.5 ; 1.2)	25.8	1.70	2H sext (7.4)	25.0	1.81	2H sext (7.5)	25.0	1.80 <sub>5</sub>	2H sext (7.4)	24.9 <sub>5</sub>
13	1.02 <sub>5</sub>	3H t (7.5)	15.9	0.92	3H t (7.4)	15.8	0.96	3H t (7.5)	16.0 <sub>5</sub>	0.98	3H t (7.4)	16.0 <sub>5</sub>
14	-	-	126.3	-	-	128.1	-	-	132.1 <sub>5</sub>	-	-	124.9 <sub>5</sub>
15	7.82	1H d (2.4)	132.4 <sub>5</sub>	7.81 <sub>5</sub>	1H d (2.4)	132.4	8.00	1H d (2.5)	133.8	8.22 <sub>5</sub>	1H d (2.4)	133.2
16	-	-	130.0 <sub>5</sub>	-	-	129.2 <sub>5</sub>	-	-	128.8	-	-	130.1
17	7.94	1H dd (8.9 ; 2.4)	134.8	7.96 <sub>5</sub>	1H dd (8.9 ; 2.4)	134.6 <sub>5</sub>	7.87	1H dd (8.8 ; 2.5)	133.5	7.89	1H dd (8.8 ; 2.4)	134.9
18	7.35 <sub>5</sub>	1H d (8.9)	116.0	7.35	1H d (8.9)	116.0 <sub>5</sub>	7.32 <sub>5</sub>	1H d (8.8)	116.45	7.35	1H d (8.8)	116.4
19	-	-	161.9	-	-	162.8	-	-	163.9	-	-	163.0
20	4.23 <sub>5</sub>	2H q (7.0)	68.1	4.21 <sub>5</sub>	2H q (7.0)	68.0 <sub>5</sub>	4.21	2H q (7.0)	67.9	4.32 <sub>5</sub>	2H q (7.0)	68.6
21	1.29	3H t (7.0)	16.5 <sub>5</sub>	1.26 <sub>5</sub>	3H t (7.0)	16.4 <sub>5</sub>	1.33	3H t (7.0)	16.8	1.47	3H t (7.0)	16.6
24/28 <sup>eq</sup> (c)	3.58 <sub>5</sub>	2H md (11.2)	54.0 <sub>5</sub> /53.9 <sub>5</sub>	3.86	2H md (13.0)	50.9 <sub>5</sub> /50.9 <sub>3</sub>	3.87	2H md (13.0)	51.0 <sub>5</sub>	3.54 <sub>5</sub>	2H md (11.3)	54.8
24/28 <sup>ax</sup> (c)	2.02 <sub>5</sub> /1.93 <sub>5</sub>	2H 2*app t (11.2)	53.3	2.46/2.38	2H 2*dd (13.0 ; 11.4)	50.9 <sub>5</sub> /50.9 <sub>3</sub>	2.43	2H dd (13.0 ; 11.6)	51.0 <sub>5</sub>	2.14 <sub>5</sub>	2H app t (11.3)	54.8
25/27	2.90	2H m	53.0/52.9	3.40 <sub>5</sub>	2H m	54.2 <sub>5</sub> /54.3 <sub>5</sub>	3.40 <sub>5</sub>	2H m	54.5	2.74	2H m	54.9
29/30	1.04/1.01 <sub>5</sub>	6H 2*d (6.5)	20.5	1.26/1.24	6H 2*d (6.8)	17.7	1.24 <sub>5</sub>	6H d (6.6)	17.8	1.04	6H d (6.4)	18.9
31	4.14 <sub>5</sub> /3.96	2H 2*qd (15.0 ; 7.2)	47.8	4.12/3.62	2H 2*qd (14.0 ; 7.1)	43.5	4.65	2H q (7.1)	66.4 <sub>5</sub>	2.84	2H q (7.2)	42.5 <sub>5</sub>
32	1.20	3H t (7.2)	17.5 <sub>5</sub>	1.07 <sub>5</sub>	3H t (7.1)	16.1	1.50	3H t (7.1)	16.5 <sub>5</sub>	0.86 <sub>5</sub>	3H t (7.2)	8.6

(a) Position number indicates either hydrogen or carbon

(b) Multiplicity: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; qd: quadruplet of doublet; sext: sextuplet; m: multiplet; md: multiplet of doublet; app: apparent.

(c) ax: axial; eq: equatorial

Table 4C: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of isolated methisosildenafil related compounds with 2 ethyl group in position 26 and 6 or 7. δ were measured in CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20).

N <sup>o</sup> (a)	MSildEt <sup>N6</sup> Et <sup>N26</sup> (5)			MSildEt <sup>O7</sup> Et <sup>N26</sup> (7)		
	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity (b) (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity (b) (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)
3	-	-	148.3 <sub>5</sub>	-	-	148.3 <sub>5</sub>
5	-	-	153.1	-	-	158.3 <sub>5</sub>
7	-	-	157.2 <sub>5</sub>	-	-	159.0
8	-	-	127.5 <sub>5</sub>	-	-	124.1
9	-	-	139.1	-	-	146.4 <sub>5</sub>
10	4.23	3H s	40.4	4.21 <sub>5</sub>	3H s	40.9
11	2.81	2H t (7.4)	29.6 <sub>5</sub>	2.96	2H t (7.4)	30.2
12	1.73	2H sext (7.4)	25.0	1.84	2H sext (7.4)	24.9 <sub>5</sub>
13	0.94	3H t (7.4)	15.8 <sub>5</sub>	0.98 <sub>5</sub>	3H t (7.4)	16.0
14	-	-	129.6	-	-	129.1 <sub>5</sub>
15	7.78	1H d (2.4)	132.5	8.01	1H d (2.5)	133.9
16	-	-	128.0	-	-	131.9
17	7.92 <sub>5</sub>	1H dd (8.9 ; 2.4)	134.4 <sub>5</sub>	7.83	1H dd (8.8 ; 2.5)	133.3
18	7.335	1H d (8.9)	115.8	7.31	1H d (8.8)	116.1 <sub>5</sub>
19	-	-	162.4	-	-	163.4 <sub>5</sub>
20	4.22 <sub>5</sub>	2H q (7.0)	67.9	4.22 <sub>5</sub>	2H q (7.0)	67.7
21	1.28	3H t (7.0)	16.4 <sub>5</sub>	1.35 <sub>5</sub>	3H t (7.0)	16.8
24/28 <sup>eq</sup> (c)	3.52	2H quintd (11.5 ; 2.2)	54.8/54.9	3.53 <sub>5</sub>	2H md (11.2)	54.9 <sub>5</sub>
24/28 <sup>ax</sup> (c)	2.17/2.11 <sub>5</sub>	2H 2*app t (11.1)	54.8/ 54.9	2.14 <sub>5</sub>	2H app t (11.2)	54.9 <sub>5</sub>
25/27	2.72 <sub>5</sub>	2H m	54.75/54.7	2.73	2H m	54.8
29/30	1.05/ 1.02 <sub>5</sub>	6H 2*d (6.4)	18.9	1.04	6H d (6.2)	19.0
31	4.15/3.63	2H 2*qd (14.1 ; 7.1)	43.4	4.67 <sub>5</sub>	2H q (7.1)	66.2
32	1.09	3H t (7.1)	16.1 <sub>5</sub>	1.51 <sub>5</sub>	3H t (7.1)	16.5
33	2.84	2H q (7.2)	42.4 <sub>5</sub>	2.83 <sub>5</sub>	2H q (7.2)	42.5 <sub>5</sub>
34	0.87	3H t (7.2)	8.5	0.86	3H t (7.2)	8.6 <sub>5</sub>

(a) Position number indicates either hydrogen or carbon

(b) Multiplicity: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; qd: quadruplet of doublet; quintd: quintuplet of doublet; sext: sextuplet; m: multiplet; md: multiplet of doublet; app: apparent.

(c) ax: axial; eq: equatorial

Table 4D: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of isolated sildenafil related-compounds. δ were measured in CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20).

N <sup>o</sup> (a)	Sild (11)				SildEt <sup>N6</sup> (12)				DeSild (13)				DeSildEt <sup>N6</sup> (14)				
	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity (b) (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)		δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity (b) (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)		δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity (b) (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)		δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicity (b) (J, Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)		
3	-	-	-	149.0	-	-	-	148.3 <sub>5</sub>	-	-	-	-	148.7 <sub>5</sub>	-	-	-	148.2 <sub>5</sub>
5	-	-	-	151.0	-	-	-	153.1 <sub>5</sub>	-	-	-	-	152.0 <sub>5</sub>	-	-	-	153.5 <sub>5</sub>
7	-	-	-	157.2	-	-	-	157.3	-	-	-	-	157.0	-	-	-	158.5 or 157.4
8	-	-	-	127.6	-	-	-	127.6	-	-	-	-	127.2	-	-	-	127.4 <sub>5</sub>
9	-	-	-	141.1	-	-	-	139.1	-	-	-	-	141.3	-	-	-	139.2 <sub>5</sub>
10	4.19	3H	s	40.6 <sub>5</sub>	4.23	3H	s	40.4 <sub>5</sub>	4.19	3H	s	40.4	4.22	3H	s	40.3 <sub>5</sub>	
11	2.87 <sub>5</sub>	2H	t (7.4)	30.0	2.81	2H	t (7.5)	29.6 <sub>5</sub>	2.89	2H	t (7.4)	29.9	2.79 <sub>5</sub>	2H	t (7.5)	29.7	
12	1.79	2H	sext (7.4)	25.0	1.73	2H	sext (7.5)	25.0	1.81	2H	sext (7.4)	24.8 <sub>5</sub>	1.73	2H	sext (7.5)	24.9	
13	0.97 <sub>5</sub>	3H	t (7.4)	16.1	0.94 <sub>5</sub>	3H	t (7.5)	15.9	0.99	3H	t (7.4)	15.9 <sub>5</sub>	0.94 <sub>5</sub>	3H	t (7.5)	15.9	
14	-	-	-	125.0 <sub>5</sub>	-	-	-	128.0	-	-	-	-	123.2 <sub>5</sub>	-	-	-	124.8
15	8.21 <sub>5</sub>	1H	d (2.4)	133.2 <sub>5</sub>	7.79	1H	d (2.4)	132.4	8.10	1H	dd (7.8 ; 1.7)	133.3	7.37	1H	dd (7.4 ; 1.8)	132.6 <sub>5</sub>	
16	-	-	-	130.2	-	-	-	129.7 <sub>5</sub>	7.15	1H	td (7.8)	124.0	7.12	1H	td (7.4)	123.4	
17	7.89	1H	dd (8.8 ; 2.4)	135.0	7.94	1H	dd (8.9 ; 2.4)	134.5 <sub>5</sub>	7.55	1H	m	135.5 <sub>5</sub>	7.54	1H	os	134.2 <sub>5</sub>	
18	7.34 <sub>5</sub>	1H	d (8.9)	116.5 <sub>5</sub>	7.34 <sub>5</sub>	1H	d (8.9)	115.8 <sub>5</sub>	7.19 <sub>5</sub>	1H	d (8.5)	115.9 <sub>5</sub>	7.16	1H	os	115.1 <sub>5</sub>	
19	-	-	-	163.1	-	-	-	162.4 <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	158.5 or 157.4
20	4.31 <sub>5</sub>	2H	q (7.0)	68.7	4.22	2H	q (7.0)	67.9 <sub>5</sub>	4.27	2H	q (7.0)	67.8 <sub>5</sub>	4.11	2H	q (7.0)	66.8 <sub>5</sub>	
21	1.46	3H	t (7.0)	16.7	1.27 <sub>5</sub>	3H	t (7.0)	16.5	1.48 <sub>5</sub>	3H	t (7.0)	16.7 <sub>5</sub>	1.23 <sub>5</sub>	3H	t (7.0)	16.7	
24/28	3.07	4H	b	48.3 <sub>5</sub>	3.05	4H	b	48.1	-	-	-	-	-	-	-	-	
25/27	2.56 <sub>5</sub>	4H	b	56.2 <sub>5</sub>	2.48 <sub>5</sub>	4H	app b t (4.7)	56.2 <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	2.26 <sub>5</sub>	3H	s	47.3	2.21 <sub>5</sub>	3H	s	47.3 <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	
31	-	-	-	-	3.64/ 4.13	2H	2*qd (14.1 ; 7.2)	43.4 <sub>5</sub>	-	-	-	-	4.15 <sub>5</sub> /3.65	2H	2*qd (14.0 ; 7.0)	43.1 <sub>5</sub>	
32	-	-	-	-	1.09	3H	t (7.0)	16.1 <sub>5</sub>	-	-	-	-	1.06	3H	t (7.0)	15.9	

(a) Position number indicates either hydrogen or carbon

(b) Multiplicity: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; qd: quadruplet of doublet; sext: sextuplet; app: apparent; b: broad signal, os: overlapped signal.

Table 4E:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of sildenafil analogues S1 and S2. Due to low solubility of these compounds,  $\delta$  were measured in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20) after basification of the medium by  $5\mu\text{L}$  of  $0.7\text{M}$   $\text{NaOD}$  added in the NMR tube.

N <sup>o</sup> (a)	MSidOHet <sup>N26</sup> (S1)				SildOH (S2)			
	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity <sup>(b)</sup> (J, Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	
3	-	-	-	147.7	-	-	-	147.8
5	-	-	-	156.7	-	-	-	156.1
7	-	-	-	159.1	-	-	-	158.6
8	-	-	-	127.6	-	-	-	127.5
9	-	-	-	142.2	-	-	-	142.0
10	4.18	3H	s	40.4	4.18	3H	s	40.4
11	2.90	2H	t (7.4)	30.2	2.90	2H	t (7.4)	30.1
12	1.75	2H	sext (7.4)	24.9	1.83 <sub>s</sub>	2H	sext (7.4)	24.9
13	1.00	3H	t (7.4)	16.2	1.01	3H	t (7.4)	16.2
14	-	-	-	119.8	-	-	-	120.1
15	8.50	1H	bs	132.3	8.57	1H	bs	132.3
16	-	-	-	127.4	-	-	-	120.5
17	7.46	1H	dd (8.9 ; 2.6)	133.7	7.48	1H	dd (8.8 ; 2.4)	133.7
18	6.75	1H	d (8.9)	125.0	6.77	1H	d (8.8)	125.2
19	-	-	-	176.3	-	-	-	176.3
24/28 <sup>eq</sup> (c)	3.49	2H	app bd (11.3)	55.1	3.01	2H	bs	48.6
24/28 <sup>ax</sup> (c)	2.12	2H	app t (11.3)	55.1				
25/27	2.73	2H	m	54.9	2.48	2H	bs	56.4
29/30	1.03	6H	d (6.2)	19.1	2.20	6H	s	47.5
31	2.83	2H	app q (7.1)	42.6				
32	0.87	3H	bt (7.1)	8.7				

(a) Position number indicates either hydrogen or carbon

(b) Multiplicity: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; qd: quadruplet of doublet; quintd: quintuplet of doublet; sext: sextuplet; m: multiplet; md: multiplet of doublet; app: apparent.

(c) ax: axial; eq: equatorial

To further explain the structural changes, NMR data of all analogues are reported in Table 4. Assignments were performed thanks to mono ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) and bi-dimensional (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) NMR experiments. First, considering 1D  $^1\text{H}$  NMR spectra, the methiso-substitution (i.e 2 methyl groups on the piperazine ring) give rise to one or two characteristic doublets between 0.99 and 1.26 ppm (compounds **1-10** and **S1** (Figure 5B and Table 4A-C, E). Then, the chemical shifts of the aromatic protons and particularly H15 are indicative of the nature and position of the structural modification. Indeed, by comparison of all the methisosildenafil derivatives spectra with methisosildenafil **1** itself (Figure 5A and Table 4A-C, E) a shielding effect on the chemical shift ( $\Delta\delta = [-0.23 - 0.46]$  ppm) is observed for H15 when an additional ethyl group is present on the pyrimidine ring for compounds **3-7** while the replacement of the ethoxybenzene ring by a phenol result in a deshielding effect on the chemical shift of H15 ( $\Delta\delta = [+0.36 - 0.58]$  ppm) for compounds **8, 9, 10** and **S1**. In main compounds, the key point of the assignment was to localize the positions of ethyl group(s). On one hand, a N26-ethyl substitution on the piperazine ring leads to a characteristic system triplet and quadruplet at  $\sim 2.83$  and  $0.85$  ppm respectively (compounds **2, 5, 7, 10** and **S1**). On the other hand, a N6-ethyl substitution, leads to an inequivalence, inducing two quadruplets of doublets around  $4.13$  and  $3.64$  ppm and one triplet at  $\sim 1.08$  ppm (compounds **4, 5, 12, 14**) whilst a N4-ethyl substitution conducts to the same pattern in which both the triplet ( $1.20$  ppm,  $\Delta\delta = +0.12$ ) and one of the quadruplet of doublet ( $3.96$  ppm,  $\Delta\delta = +0.32$  ppm) are slightly deshielded (compound **3**). Finally, for O7-ethyl substitution, the ethyl group leads to a quadruplet and one triplet resonating respectively at  $\sim 4.81$  and  $1.58$  ppm for compounds **9** and **10** (phenol moiety) and  $\sim 4.66$  and  $1.50$  ppm for compounds **6** and **7** (ethoxybenzene moiety). Obviously when the ethoxybenzene group is hydrolysed, the proton resonance corresponding to H20 ( $\sim 4.20$  ppm) and H21 ( $\sim 1.30$  ppm) are not detected, as clearly shown with compound (**8**) (Figure 5B and D) but also in compounds **S1, S2, 9** and **10**.

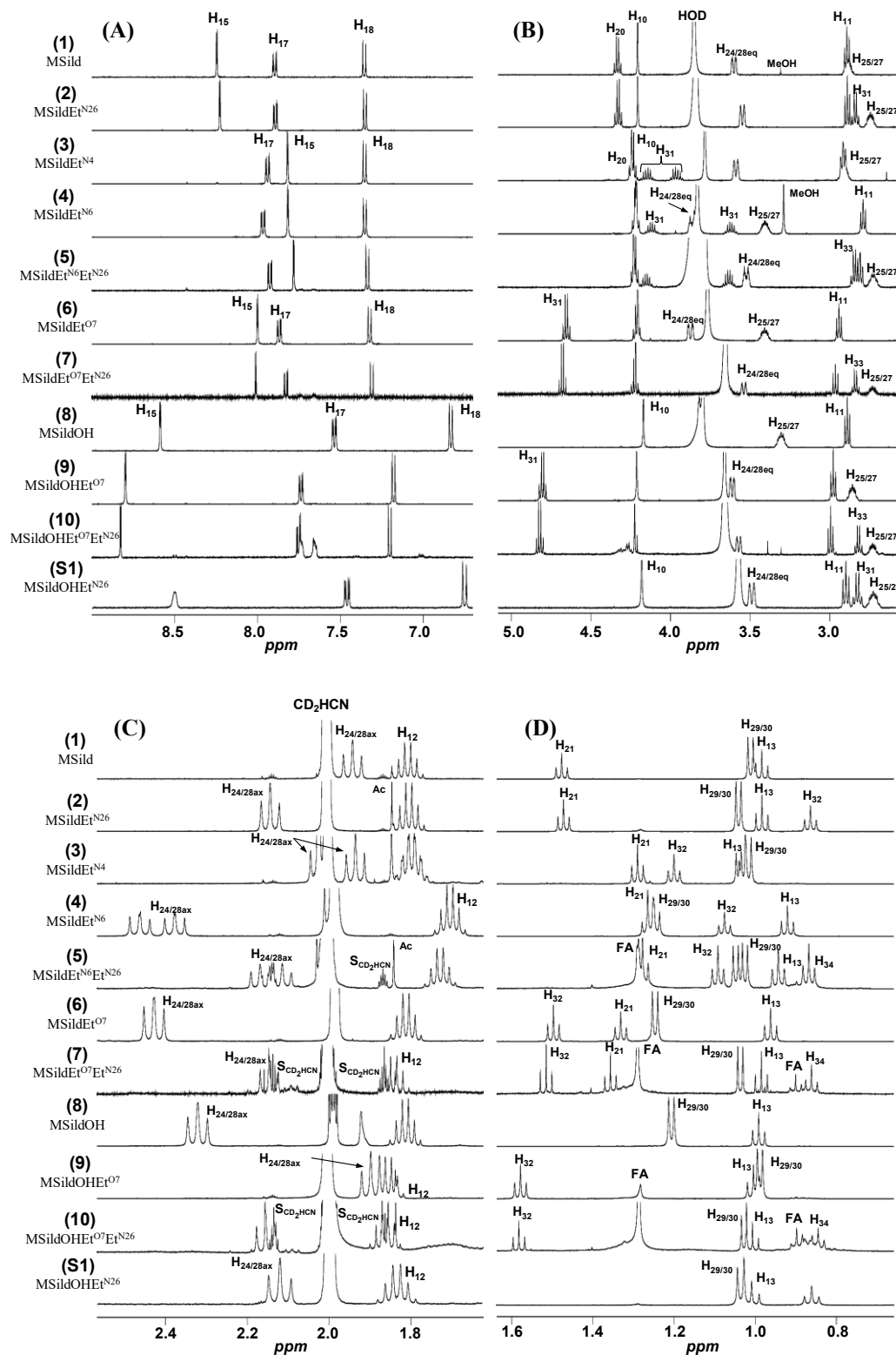
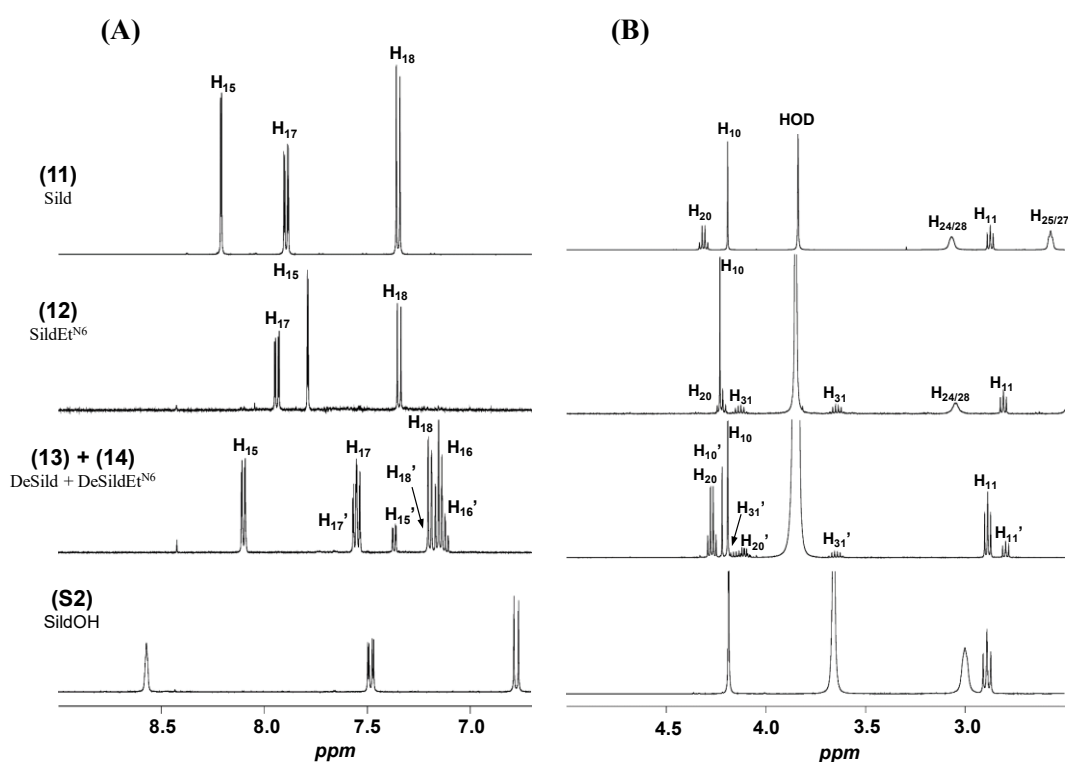


Figure 5:  $^1\text{H}$  NMR spectra of purified methisosildenafil (1) and related analogues recorded in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Region 6.7-9.0 ppm (A), 2.5-5.0 ppm (B), 1.7-2.6 ppm (C) and 0.7-1.6 ppm (D). MeOH: methanol, Ac: acetate, ACN: acetonitrile, HOD: residual water, FA: fatty acid,  $\text{S}_{\text{ACN}}$ :  $^{13}\text{C}$  satellite signals of acetonitrile. The signal of H10 is truncated in all spectra.

For sildenafil derivatives the NMR data are reported in Table 4D and illustrated in Figure 6. Close observations as the one done on methisosildenafil derivatives can be done between compounds **11** and **12** (related to compounds **1** and **4**) as well as compounds **11** and **S1** (related to compounds **1** and **8**) except that the proton corresponding to the CH<sub>2</sub> groups of the piperazine ring are much broader (Figure 6B). Another point to emphasize in the proton NMR patterns is that for the sildenafil derivatives **13** and **14** (Table D), the loss of the link to the sulfonyl group led to an obvious change of the multiplicity of the aromatic ring as for instance the signal of proton H15 became a doublet of doublet, due to its coupling with both H16 (<sup>3</sup>J) and H17 (<sup>4</sup>J).

The NMR characterizations of compounds **S1** and **S2** were trickier due to the relative insolubility of these compounds after their isolation. It has been necessary to basify the solution with a solution of NaOD (0.7 M) for a complete solubilization, NMR data are thus reported in a separate Table E. However, NMR data are consistent with the other compounds and chemical shifts are not significantly affected by the pH change.





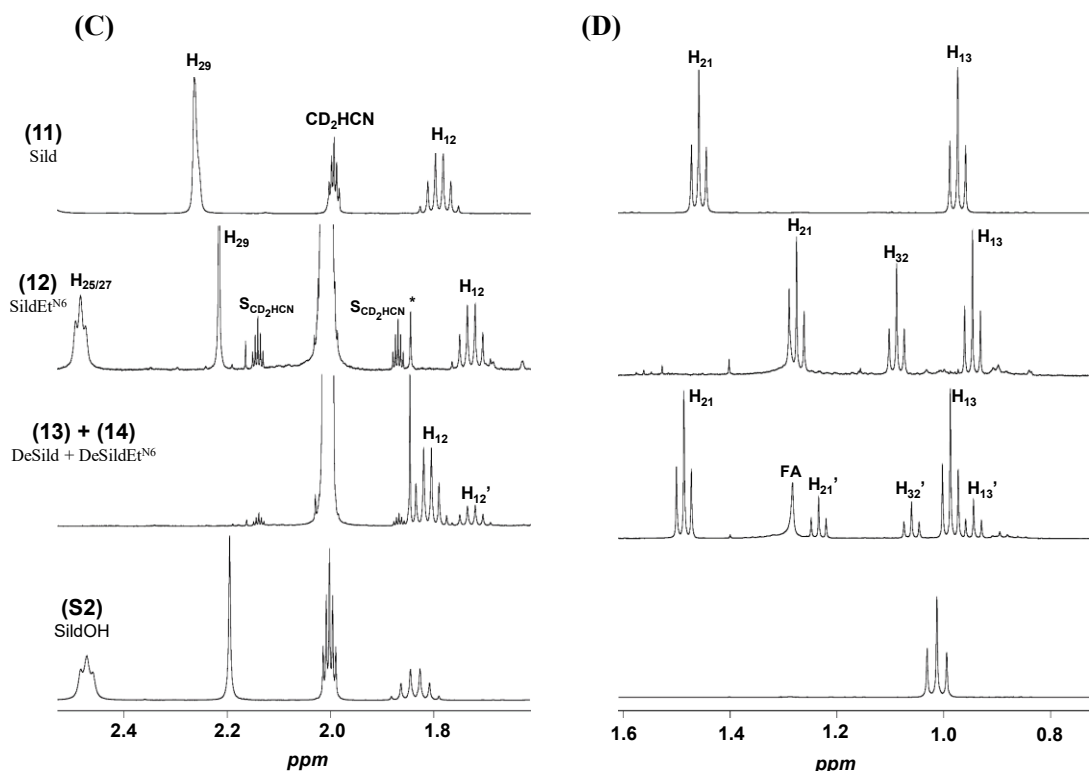


Figure 6:  $^1\text{H}$  NMR spectra of sildenafil and its analogues recorded in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Region 6.7-9.0 ppm (A), 2.5-5.0 ppm (B), 1.7-2.6 ppm (C) and 0.7-1.6 ppm (D). MeOH: methanol, ACN: acetonitrile, HOD: residual water, FA: fatty acid,  $S_{\text{ACN}}$ :  $^{13}\text{C}$  satellite signals of acetonitrile. The signal of H10 and H29 are truncated in all spectra. Signals annotated with a " ' " correspond to compound 14.

To ends the analysis of all NMR spectra, we can point out that the chemical shift of some typical carbons confirms the proposed structures. For instance, the  $\text{CH}_2$  of an N-ethylgroup is detected around 42 to 48 ppm while it raised to  $\sim 66$  ppm for O-ethylsubstitutions. Moreover, a slight downfield is observed for signals of carbons 18 and 19 for compounds with a phenol group (**8**, **9**, **10**, **S1** and **S2**). Figure 7 illustrates how the HMBC spectra allow to unambiguously determine the positions of substituents dealing with compounds **2**, **3**, **4** and **6** which are position isomers. Indeed, by focusing on the long-range correlations of H31 from each ethyl chain, it is possible to determinate its position on the pyrimidine or piperazine ring, i.e H31/C5 and C7 coupling for compound **4**, H31/C5 and C9 coupling for compounds **3**, H31/C25-27 for compound **2** and H31/C7 coupling for compound **6**. To further insure these results, NOESY experiments have been done on compounds **3**, **4** and **5** focusing on H31/H32 or H33/H34 dipolar correlations. As a result, when the ethyl moiety is on N4 (compounds **3**) we can see correlations between H31/H32 with H11, H12 and H13. When the functionalization is on the N6 (compound **4** and **5**), it appears a clear correlation with H15, and more surprisingly, one with H24/28. Finally, when the ethyl group is on the piperazine group (compound **5**) we detect a correlation between

the so called H33 and H34, and the piperazine protons (i.e H29/30 and H25/27). All NMR and MS data are consistent together and in agreement with published spectroscopic data of PDE-5 inhibitors and references cited in.<sup>2</sup> In Figure S1 are reported the NMR spectrum of the raw sample, recorded with GARP decoupling. The spectrum in this figure is similar to the one shown in Figure 2 except that the spectrum has been zoomed on the aromatic protons area and that the assignment of all characterized analogues in this work are reported.

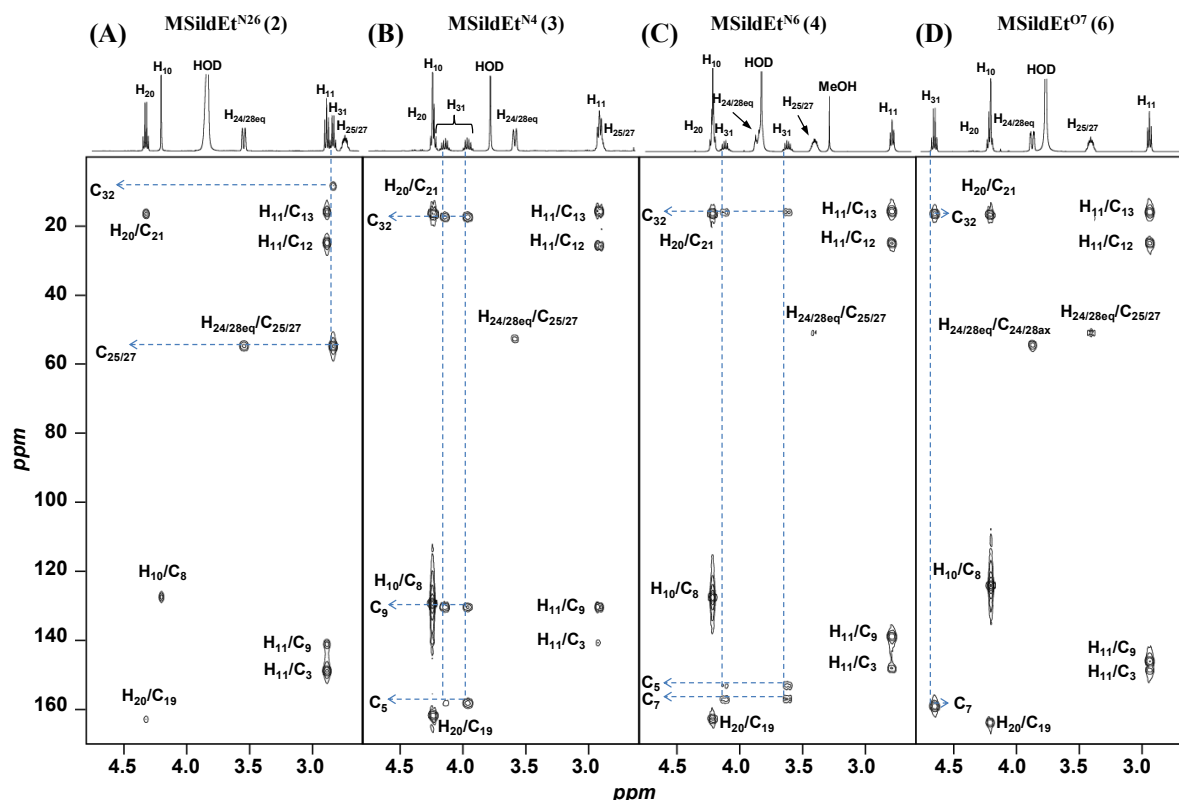


Figure 7: Part of  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spectrum of (A) compound **2**, (B) compound **3**, (C) compound **4** and (D) compound **6**. Correlations between proton H31 and specific carbons that indicated the position of ethyl group in the structure are indicated with dashed arrows. MeOH: methanol, HOD: residual water. Recorded in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v). See Figure 3 for chemical structures and numbering.

UV spectra of all compounds are reported in Figure 8. Even if UV spectroscopy is not the most efficient technic, according to these spectra it is possible to obtain some clues on the locations of the structural modifications. The chromophore of sildenafil **11**, is similar in methisosildenafil **1** and compound **2** and leads to two characteristic bands at  $\lambda \approx 225$  and  $294$  nm.<sup>2</sup> The N-ethyl substitution on the N6 of the pyrimidine ring induces a modification of the UV spectra with two main bands at  $\lambda \approx 208$  and  $283$  nm for compounds **4**, **5** and **12**. The replacement of the ethoxy function by a hydroxyl group on the position 19 of the benzene ring permits the observation of the fine vibrational structure for

compound **8**, **S1** and **S2**. Indeed, in addition to the main band subject to a bathochromic effect, resulting in a band at 232 nm, several bands are observable between 270 and 350 nm, similar profiles are observed for compounds **9** and **10** but in lesser extent. At last the O alkylation on the ketone function in position 7 of the pyrimidine ring gives a characteristic UV profile for compounds **6** and **7** with two main bands at 236 and 291 nm.

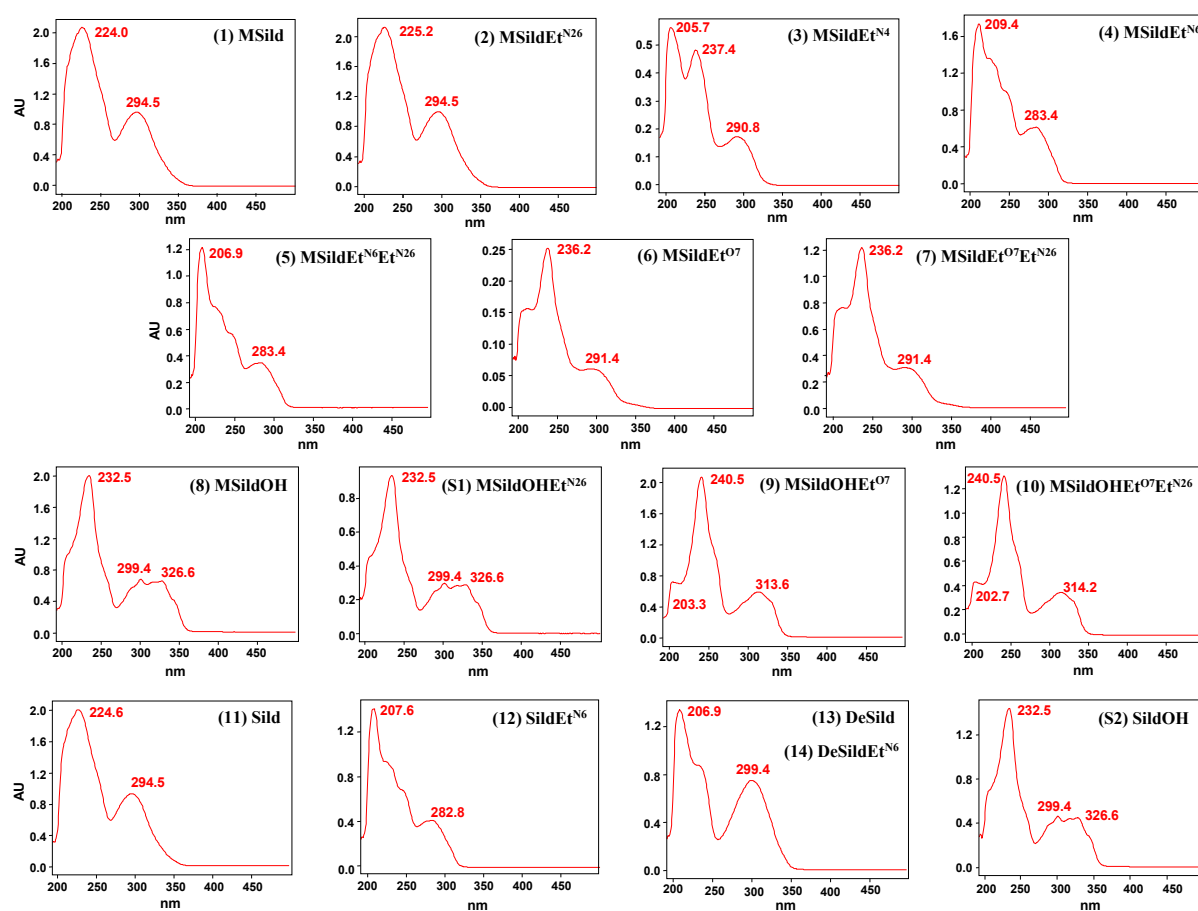


Figure 8: UV spectra of all PDE-5i and analogues reported in this study. Spectra were obtained from the UPLC analysis of the purified fractions.

### 3.4. Quantitative analysis

Quantitative analyses were done using NMR under qNMR recording conditions. The amount per capsule was estimated to 37.8 (53.8%), 22.1 (31.5%), 5.0 (7.1%), and 3.1 (4.4%) mg for methisosildenafil, sildenafil, compound **8** and compounds **4** respectively. The concentration of the other contaminants is lower and ranged from 0.01 to 0.50 mg per capsule representing a sum of 2.2 mg (3.2%). That ends up to 70.2 mg per capsule of active substances that were fraudulently added to this dietary supplement.

## 4. Discussion

This study allows the complete characterization of sixteen derivatives of phosphodiesterase inhibitors, including the lead drug sildenafil. Some of these adulterants have already been described, methisosildenafil (**1**) was first reported in 2007<sup>7</sup> as adulterant in an herbal dietary supplement. Compound **13**, a desulfosildenafil is known as an impurity of sildenafil and commercially available (CAS 139756-21-1). However, unlike desulfovardenafil,<sup>8</sup> it has never been reported as adulterant. Finally, the compounds **S2** previously described is an impurity of sildenafil claimed as impurity C in the European Pharmacopeia.<sup>9</sup> All other chemicals characterized in this study, i.e. twelve have, to our knowledge, never been reported neither as pure chemicals nor as adulterants.

The presence of sildenafil analogues in this sample is probably due to the intentional adulteration with the two main contaminants sildenafil and methisosildenafil. We can hypothesize that most of the minor compounds detected appeared during the synthetic process of the two main ones. Their presences are obviously due to a neglected purification procedure. The synthesis of methisosildenafil follows the same synthetic route as the sildenafil one described below but the nature of the piperazine part differs. In the Figure 9, are presented main synthetic pathways for sildenafil along with the numbers of each sildenafil derivative reported in this study. Many of them can be explained as impurities coming from the different possible pathways.

According to the chemical structures of the detected compounds, we can subdivide our discussion on two classes of compounds, the first one would concern the compounds **13** and **14** which do not bear a sulfonamide group. The second one is about all the other compounds containing a "labile" ethyl moiety on either nitrogen or oxygen atoms, which are, according to both the literature and the sildenafil reactivity,<sup>10</sup> preferential position to a nucleophilic substitution.

The first class of desulfonylated compounds could be explained by two main pathways. Indeed the older synthesis pathway described for sildenafil involves a late sulfonylation step.<sup>11</sup> However, this step has already been described as reversible, potentially leading to desulfonylated by-products<sup>12</sup> (Figure 9B). As an alternative, a Friedel-Crafts acylation with sulfamoyl chloride in the presence of AlCl<sub>3</sub><sup>13</sup> has been proposed to introduce the sulfonamide moiety. This procedure leads to a really incomplete conversion (45%), potentially inducing a large amount of starting reagent into the reaction medium Figure 9A. Thus, if the purification step has been neglected, or skipped, the presence of desulfonylated by products can be explained.

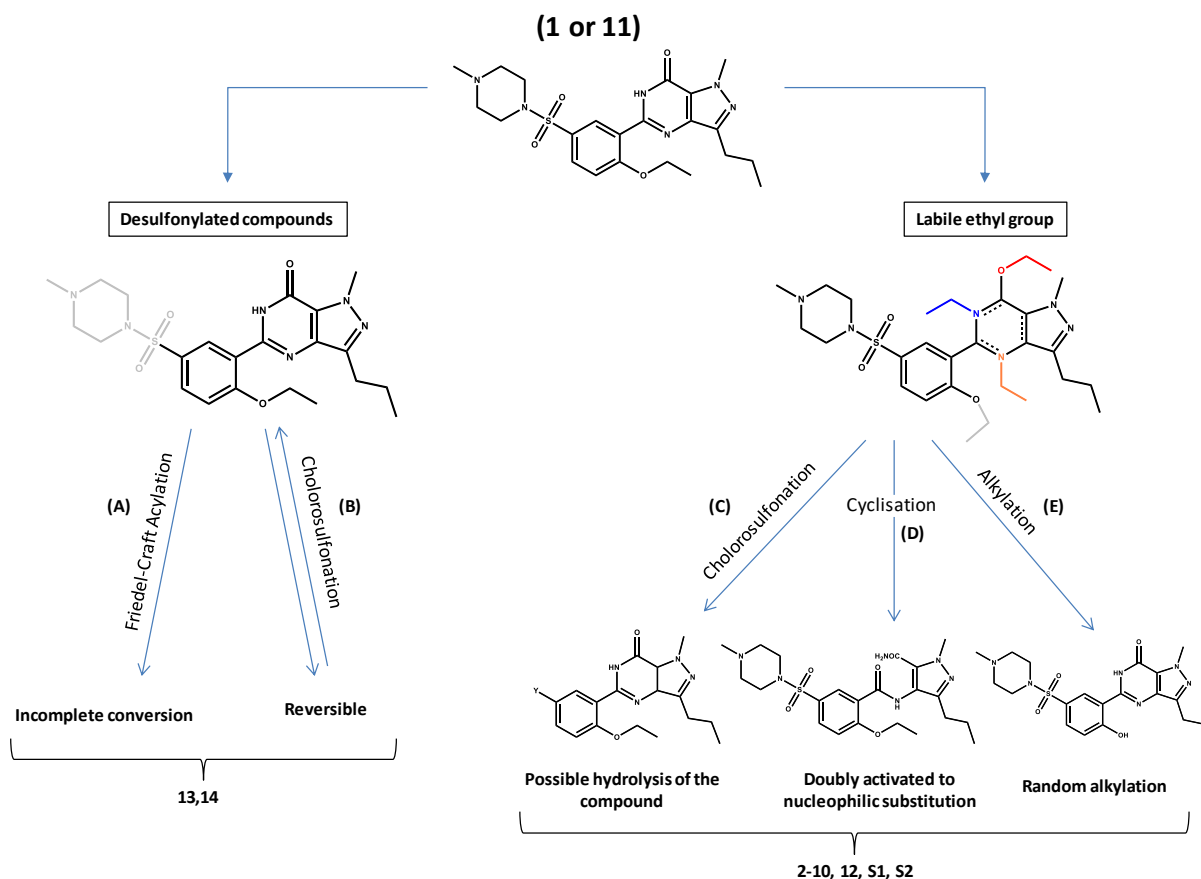


Figure 9 : Reported synthetic pathways for sildenafil from references [10-15]. The sildenafil derivatives described in this study are numbered.

The second class of by-products is trickier to explain, we will discuss here three potential pathways to explain the presence of an ethyl moiety on different positions. In the first proposed method, one of the sildenafil synthesis step involves the reaction of 5-(2-ethoxyphenyl)-1-methyl-3-n-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo[4,3-d] pyrimid-7-one with chlorosulfonic acid. It was reported that the scaling-up of this step is difficult due to the large amount of hydrochloric acid released while neutralizing the chlorosulfonic excess. Thus, the potential hydrolysis of the ethoxy group, involves the formation of an ethyl chloride which could attack the position subject to a nucleophilic substitution Figure 9C.<sup>11, 14</sup> Moreover, the highly acidic medium could also induce a potential intermolecular attack of the ethoxy moiety.

More recent synthetic pathways of sildenafil were reported, they involve an early introduction of the sulfonamide moiety. These processes occur under strong basic conditions. Two distinct pathways are proposed. In the first one, from 2-ethoxybenzoic acid as starting reagent (Figure 9D), the critical step is the cyclisation reaction. Indeed, the ethoxy moiety is doubly activated by the sulfonamide and amide groups and thus is prone to nucleophilic substitution.<sup>10, 15</sup> Another synthetic pathway was then proposed to circumvent this problem, in which all the synthesis is done with a phenol group and the O-alkylation of the phenol is carried out after the cyclisation reaction (Figure 9E).<sup>10</sup> Depending on the

alkylating conditions it has been reported earlier by Kumar *et al.*<sup>10</sup> that either hydrolysis of the alcohol, O-,N- alkylation or a mix of these reactions can occur on the pyrimidine(-one) ring similarly to the characterized compounds obtained in the present study.

All hypothesis described above for the formation of impurities indicated that the synthesis process of sildenafil and methisosildenafil used by the manufacturers of the dietary supplement studied, do not include the classical necessary purification steps whatever the synthesis pathways chosen. A similar problematic of an erectile dietary supplement containing synthetic impurities in minor amounts was previously reported by Schramek *et al.*<sup>16</sup> In that case, the dietary supplement contained dithiodesmethylcarbodenafil as the major compound and three more compounds were found possibly coming from the synthetic pathways of dithiodesmethylcarbodenafil.

At last, it is important to underline that there is a real toxicological health risk for a consumer who would ingest this dietary supplement as the pharmacological and toxicological data of the sildenafil analogues present in this preparation are unknown.<sup>17</sup> Changes in molecular structure from the parent sildenafil may retain the corresponding pharmacological and toxicological properties or rather, have different ones. In any cases, the safety of this type of food supplement is not demonstrated. Thus, recently a fatal case of ingestion of a sildenafil analogue was described for a man who probably consumed a dietary supplement.<sup>18</sup> In the case of the dietary supplement described in this study, beyond the risks induced by each of the compounds present in the commercial preparation, the synergistic effect of a mixture of 16 different molecules is likely to be considered.

## 5. Conclusion

The dietary supplement investigated in this study, contained a mixture of sixteen components. Two major, sildenafil and methisosildenafil and fourteen minor compounds. All the compounds were isolated thanks to the orthogonality between SFC and LC separations and their structure elucidated using UV spectroscopy, high resolution and tandem mass spectrometry and one- and two-dimensional NMR data. The fourteen minor compounds probably came from the synthetic pathways of sildenafil and methisosildenafil and result of a lack of purification step. It seems that the crude reaction mixture(s) was(were) directly used as adulterant in the dietary supplement. This provides some clues about the synthetic processes used by the manufacturers of such a preparation. Even if this dietary supplement illegally contains active pharmacological substances fraudulently added, the manufacturing methods of these unscrupulous manufacturers are very far away from the quality standards needed for a pharmaceutical preparation.

## Supplementary Material

Table S1: Accurate mass data of parent and fragment ions in negative ESI mode for methisosildenafil, sildenafil and their analogues.

Formula	Experimental mass	Theoretical mass	Error (ppm)
<b>(1) MethisoSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 487</b>			
C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	487.2136	487.2127	1.85
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	310.1427	310.1430	-0.97
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1114	282.1117	-1.06
<b>(2) N26-Ethyl MethisoSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 515</b>			
C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	515.2448	515.2440	1.55
C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	487.2124	487.2128	-0.82
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	310.1422	310.1430	-2.58
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1114	282.1117	-1.06
<b>(8) HydroxyPhenylMethisoSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 459</b>			
C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	459.1817	459.1814	0.65
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1117	282.1117	0.00
<b>(9) O7-EthylHydroxyPhenylMethisoSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 487</b>			
C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	487.2131	487.2127	0.82
C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	459.1817	459.1815	0.44
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	326.1386	326.1379	2.15
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	310.1431	310.1430	0.32
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1112	282.1117	-1.77
<b>(10) O7,N26-DiethylHydroxyPhenylMethisoSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 515</b>			
C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	515.2446	515.2440	1.16
C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	487.2124	487.2128	-0.82
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	326.1373	326.1379	-1.84
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	310.1426	310.1430	-1.29
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1116	282.1117	-0.35
<b>(11) Sildenafil (Sild) [M - H]<sup>-</sup> m/z 473</b>			
C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	473.1965	473.1958	1.48
C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	445.1657	445.1658	-0.22
C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	310.1436	310.1430	1.93
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1115	282.1117	-0.71
<b>(13) DesulfoSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 311</b>			
C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	311.1515	311.1508	2.25
C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	283.1192	283.1195	-0.35
C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	254.0795	254.0804	0.79
<b>(S1) N26-EthylHydroxyPhenylSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 487</b>			
C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	487.2136	487.2127	1.85
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1119	282.1117	0.71
<b>(S2) HydroxyPhenylSildenafil [M - H]<sup>-</sup> m/z 445</b>			
C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S <sup>-</sup>	445.1665	445.1658	1.57
C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	282.1114	282.1117	-1.06

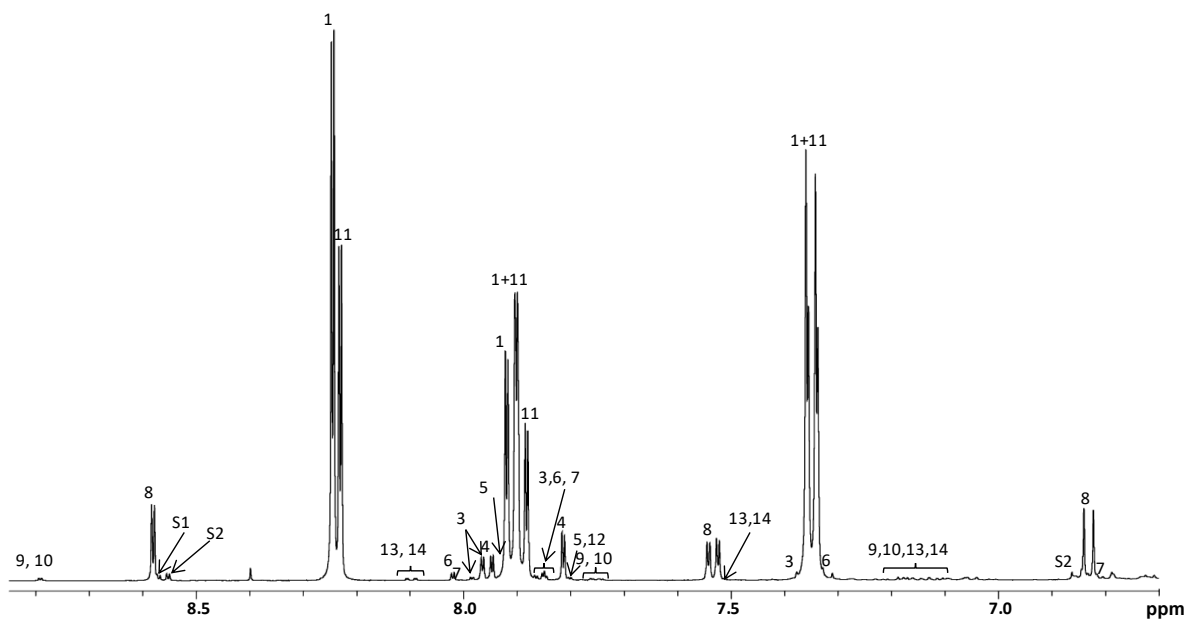


Figure S1:  $^1\text{H}$  NMR assignment of the aromatic region of the initial spectrum, corresponding to the A part of the Figure 2. Recorded in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v).

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Cristina Da Costa, Jérôme Marini and Antoine Pradines (Preparative Chromatography, EVOTEC, Toulouse). They also wish to acknowledge Aritz Perez e Iñiguez de Heridia for helpful discussions.



## References

1. Shin, M. H.; Hong, M. K.; Kim, W. S.; Lee, Y. J.; Jeoung, Y. C., Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction. *Food Addit Contam* **2003**, *20* (9), 793-6.
2. Kee, C. L.; Ge, X.; Gilard, V.; Malet-Martino, M.; Low, M. Y., A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *147*, 250-277.
3. Gilard, V.; Balayssac, S.; Tinaugus, A.; Martins, N.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Detection, identification and quantification by H-1 NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance. *J Pharmaceut Biomed* **2015**, *102*, 476-493.
4. Mustazza, C.; Borioni, A.; Rodomonte, A. L.; Bartolomei, M.; Antoniella, E.; Di Martino, P.; Valvo, L.; Sestili, I.; Costantini, E.; Gaudiano, M. C., Characterization of Sildenafil analogs by MS/MS and NMR: a guidance for detection and structure elucidation of phosphodiesterase-5 inhibitors. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *96*, 170-86.
5. Kee, C. L.; Ge, X.; Low, M. Y., Application of Orbitrap-mass spectrometry to differentiate isomeric sildenafil- and thiosildenafil-like analogues used for the adulteration of dietary supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2015**, 1-12.
6. Wilfried M. A. Niessen, R. A. C. C., *Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides*. John Wiley & Sons: 2017.
7. Reepmeyer, J. C.; Woodruff, J. T.; d'Avignon, D. A., Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2007**, *43* (5), 1615-21.
8. Lam, Y. H.; Poon, W. T.; Lai, C. K.; Chan, A. Y.; Mak, T. W., Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product. *J Pharm Biomed Anal* **2008**, *46* (4), 804-7.
9. European Pharmacopeia Edition 2018 9.5.
10. Kumar, I. V. S.; Ramanjaneyulu, G. S.; Bindu, V. H., Synthesis of Sildenafil Citrate and Process Related Impurities. *Lett Org Chem* **2011**, *8* (9), 668-673.
11. Dale, D. J.; Dunn, P. J.; Golightly, C.; Hughes, M. L.; Levett, P. C.; Pearce, A. K.; Searle, P. M.; Ward, G.; Wood, A. S., The chemical development of the commercial route to sildenafil: A case history. *Org Process Res Dev* **2000**, *4* (1), 17-22.
12. Raghava Reddy, A. V.; Srinivas, G.; Takshinamoorthy, C.; Gupta Peruri, B.; Naidu, A., A Facile, Improved Synthesis of Sildenafil and Its Analogues. *Sci Pharm* **2015**, *84* (3), 447-455.
13. Baumann, M.; Baxendale, I. R., An overview of the synthetic routes to the best selling drugs containing 6-membered heterocycles. *Beilstein J Org Chem* **2013**, *9*, 2265-2319.
14. Dunn, P. J.; Galvin, S.; Hettenbach, K., The development of an environmentally benign synthesis of sildenafil citrate (Viagra (TM)) and its assessment by Green Chemistry metrics. *Green Chem* **2004**, *6* (1), 43-48.
15. Dunn, P. J., Synthesis of commercial phosphodiesterase(V) inhibitors. *Org Process Res Dev* **2005**, *9* (1), 88-97.
16. Schramek, N.; Wollein, U.; Eisenreich, W., Identification of new synthetic PDE-5 inhibitors analogues found as minor components in a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *96*, 45-53.
17. Skalicka-Wozniak, K.; Georgiev, M. I.; Orhan, I. E., Adulteration of herbal sexual enhancers and slimmers: The wish for better sexual well-being and perfect body can be risky. *Food Chem Toxicol* **2017**, *108* (Pt B), 355-364.
18. Bakota, E. L.; Kelly, A. T.; Walterscheid, J. P.; Phatak, D. R., A Case Report of Fatal Desmethyl Carbodenafil Toxicity. *J Anal Toxicol* **2017**, *41* (3), 250-255.

## 3 Analyse de compléments alimentaires pour sportifs

### 3.1 Contexte de l'étude

Cette étude a été initiée par le biais de deux collaborations, d'une part à la suite d'une saisie judiciaire réalisée par les douanes Française et d'autre part par une collaboration avec le centre anti dopage polonais de Varsovie. Dans ce contexte, nous avons été amenés à analyser différents produits ayant pour but d'améliorer les performances sportives. Les produits saisis étaient de différentes formes et d'indications diverses.

Une première partie sera consacrée à l'étude de préparations que nous allons qualifier ici de « compléments alimentaires » dans la mesure où ils sont consommés par les sportifs en complément de leur alimentation, même si cette classification peut être discutable pour certains d'entre eux. La seconde partie sera consacrée à l'étude de certaines solutions injectables pour lesquelles il a été nécessaire de développer une méthode d'analyse spécifique.

### 3.2 « Compléments alimentaires »

Cette partie porte sur la description des 58 formulations étudiées (voir tableau annexe) qui s'apparentent à des compléments alimentaires. Or, environ la moitié de ces préparations annonçaient la présence d'actifs alors que l'autre moitié était vendue comme un mélange de substances naturelles ou bien comme un mélange propriétaire, c'est à dire un cocktail de substances (actives ou pas) regroupées sous une appellation, un peu comme une marque quelconque le ferait. Pourtant, comme explicité dans l'introduction de ce chapitre, en plus des allégations portées, une partie des produits saisis annoncent contenir des substances formellement interdites par l'agence mondiale anti-dopage.<sup>1</sup> Au vu de la diversité des actifs annoncés (hormones, stéroïdes, anticancéreux...) et de la potentielle mauvaise qualité de ces préparations, la RMN, pour toutes les raisons explicitées précédemment et surtout pour sa pertinence pour l'étude de mélange complexe, pourrait être une technique de choix pour étudier l'ensemble des substances collectées.

Nous présenterons cette partie en étudiant les produits saisis selon les deux catégories précédemment évoquées : « sans actif annoncé » ou « avec actif annoncé ». Au vu du grand nombre d'échantillons analysés, nous nous limiterons pour plus de clarté à décrire en détail, certains cas représentatifs. Dans un premier temps, nous aborderons le cas des préparations qui sont les plus fortement apparentées à un complément alimentaire et nous y aborderons au travers de quelques exemples concrets des cas

d'adultérations plus ou moins complexes. Dans un second temps nous étudierons des substances plus difficiles à classer de par le fait qu'elles annoncent contenir des actifs.

### 3.2.1 Compléments alimentaires sans actifs annoncés

Comme écrit précédemment, environ la moitié des formulations analysées, semblent pouvoir correspondre à la définition de compléments alimentaires. Pourtant, en se référant au tableau présenté en annexe, récapitulant l'ensemble des 28 formulations étudiées (numéros 1 à 28), quelques problèmes de compatibilité, avec la définition européenne précédemment explicitée, se doivent d'ores et déjà d'être mis en évidence. C'est notamment le cas des formulations 5, 13 et 21 qui ne présentent aucune indication quant à leur composition. En effet, ces dits compléments alimentaires sont vendus dans des boîtes ne comportant aucun étiquetage. Ces 3 cas seront détaillés et élucidés un peu plus tard. Le cas de la formulation 12 mérite aussi quelques explications car bien que nous l'ayons placé dans la catégorie des compléments alimentaires sans actifs annoncés, ce complément alimentaire déjà reporté par Bastiaan Venhuis et son équipe en 2014,<sup>2</sup> a été retiré du marché allemand la même année parce qu'il provoquait de sévères effets secondaires. Or, il est toujours commercialisé et la présence illégale d'isopropyloctopamine est toujours annoncée. Sur le site du fournisseur, cette substance est présentée comme suit : « *un bruleur de graisse ou un agent lypolitique. Il n'y a pas encore beaucoup d'informations mais c'est un ingrédient prometteur* ». <sup>3</sup> En effet, le développement de cette substance n'a jamais dépassé le stade pré-clinique, et donc les données sur l'homme ne sont pas disponibles.

L'ensemble des autres formulations, semblent elles répondre à la définition d'un complément alimentaire, et ne pas annoncer directement de substances ajoutées. Les formulations présentées dans le Tableau 1 (5, 6, 8, 13 et 21) seront étudiées et rapprochées des autres formulations au besoin.

Tableau 1 : Cas des formulations étudiées n'annonçant pas d'actif qui seront présentées en détail.

<b>Compléments alimentaires sans actifs annoncés</b>			
<b>Formulation</b>	<b>Nom</b>	<b>Fabricants/distributeurs</b>	<b>N° lot Date expiration</b>
<b>5</b>	<b>Aucun</b>	<b>Aucun</b>	<b>Aucun</b>
<b>6</b>	<b>Black Bombs</b>	<b>Dorian Yates Sports Nutrition</b>	<b>Aucun</b>
<b>8</b>	<b>Black Widow</b>	<b>Hi-tech pharmaceuticals, inc</b>	<b>140911106 12-2019</b>
<b>13</b>	<b>« DIA »</b>	<b>Aucun</b>	<b>Aucun</b>
<b>21</b>	<b>« OXY »</b>	<b>Aucun</b>	<b>Aucun</b>

### 3.2.1.1 Cas des formulations 13 (DIA) et 21 (OXY)

Les formulations 13 et 21 sont traitées ensemble parce que à priori, elles pourraient être confondues. En effet bien que nous les ayons nommées ici « DIA » et « OXY » pour des raisons que nous expliciterons ci-dessous, ces comprimés étaient vendus dans des boîtes blanches parfaitement identiques, sans aucun étiquetage. Nous les avons nommées ainsi car, sur le couvercle de chacune des 11 boîtes répertoriées, il était inscrit à la main au marqueur effaçable par le revendeur soit « DIA » pour 7 d'entre-elles, soit « OXY » pour les 4 autres.

Etant donné le contexte, qui est celui des compléments alimentaires ayant pour but d'améliorer les performances sportives, le terme « DIA » pouvait facilement laisser penser à « DIAnabol » qui est un produit pharmaceutique vendu pour contenir de la méthandrosténone. Ce produit, déjà employé par les pratiquants de bodybuilding (tels qu'Arnold Schwarzenegger ou Sergio Oliva) notamment pour sa spectaculaire action sur la synthèse de protéines, est désormais interdit mais circule encore sur les marchés parallèles.<sup>4</sup> La même réflexion peut être menée pour la formulation 21, en effet OXY peut référer au terme « OXYmétholone » autrement connu sous le nom d'Anadrol. Cette substance, initialement créée pour aider les personnes souffrant d'anémie, a été détournée par le monde du bodybuilding pour favoriser la prise de masse musculaire. Actuellement, malgré la liste importante d'effets secondaires existants et répertoriés, cette substance considérée comme l'une des plus efficace dans le domaine, continue elle aussi d'être distribuée sur le marché noir.<sup>5</sup>

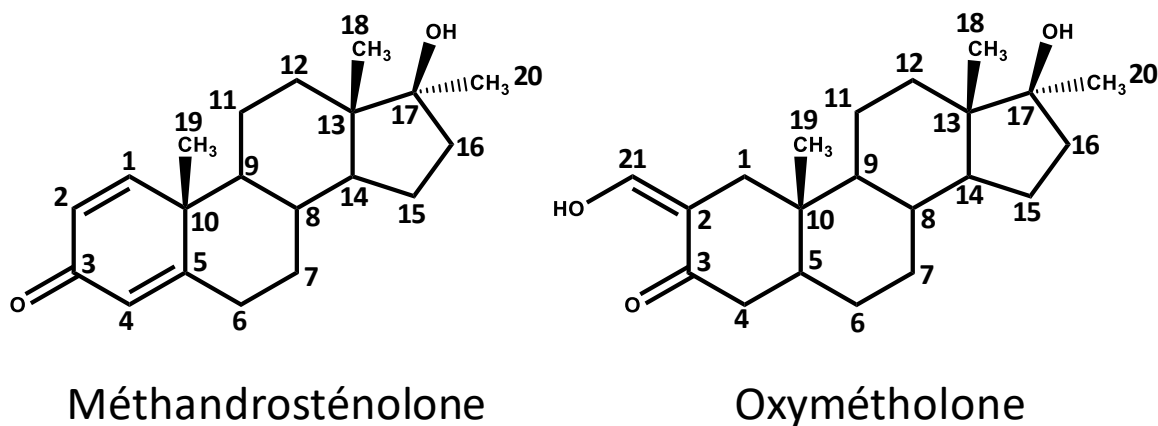


Figure 1 : Structures des substances suspectées dans les formulations 13 : la méthandrosténone et 21 : l'oxymétholone.

Au vu des suspicions que nous avons sur la présence de stéroïdes dans ces comprimés et connaissant la grande solubilité de ce genre d'actifs dans des solvants tels que le méthanol, une première analyse qualitative a été menée par RMN du proton sur chacune des 11 boîtes. Les spectres RMN <sup>1</sup>H présentaient des profils similaires pour toutes les boîtes annotées « DIA », qui ont donc la même

composition chimique. Comme montré dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  en Figure 2, la présence d'une zone aliphatique complexe et caractéristique d'un cœur stérane confirme l'hypothèse envisagée quant à la présence d'un stéroïde anabolisant. Cependant, dans le spectre RMN, un seul proton éthylénique/aromatique est observé sous la forme d'un singulet à 7,25 ppm très déblindé ce qui exclut la présence de méthandrosténolone. En effet, la présence de cette molécule conduirait à l'observation des signaux de 3 protons éthyléniques (les protons 1, 2 et 4) dont les déplacements chimiques seraient moins déblindés que celui détecté. De plus, la multiplicité attendue n'est pas cohérente avec un singulet, en effet au vu de la conjugaison du cycle portant les protons 1, 2 et 4 on s'attendrait à deux doublets pour les protons 1 et 2, et un singulet pour le proton 4. Cependant la présence d'un seul signal éthylénique associé à 3 singulets, à respectivement 0,77, 0,87 et 1,20 ppm, ne permet pas d'élucider qu'un stéroïde en particulier est présent, mais seulement de conclure sur la présence probable d'un stéroïde, en effet les méthyles en position 18, 19 et 20 (Figure 1), sont présents dans la majorité des stéroïdes.

A noter également que la présence d'acide stéarique (St) ainsi que de glycérol en tant qu'excipients ont été repérés (cf. les attributions de signaux dans le spectre, Figure 2).

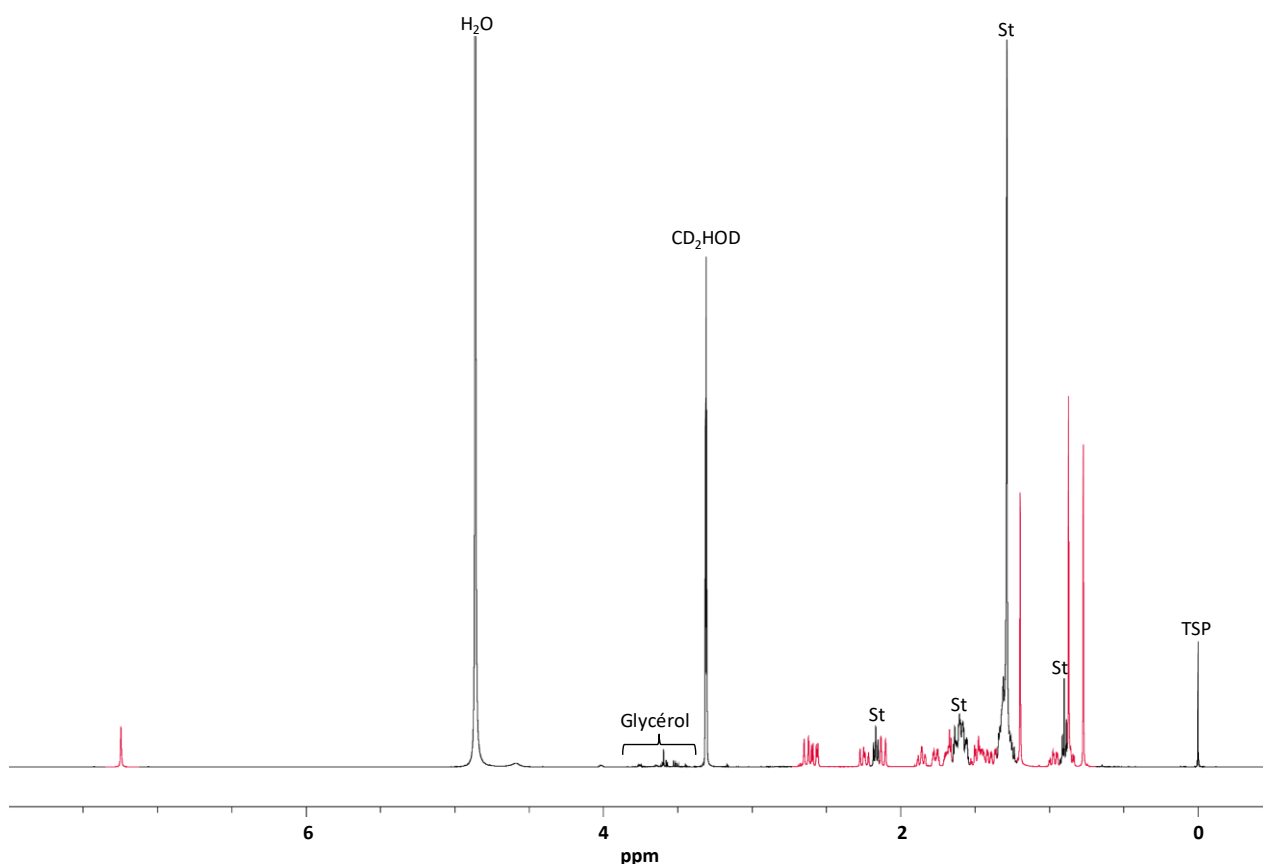


Figure 2 : Spectre RMN  $1\text{D}^1\text{H}$  d'un comprimé d'une des boîtes annotée « DIA », enregistré dans du méthanol- $d_4$ . TSP : référence interne de déplacement chimique, St : Acide stéarique,  $\text{CD}_2\text{HOD}$  : solvant résiduel. Les signaux en rouge sont ceux du stéroïde à identifier.

Pour compléter cette analyse RMN, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse haute résolution en introduction directe sur un comprimé de l'une des 7 boîtes choisies de façon aléatoire. La présence d'un pic unique d'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  329,2595 détecté en ionisation ESI positive, pouvant d'après sa masse exacte correspondre à une structure de formule brute :  $C_{21}H_{32}N_2O$  a été mise en évidence. La fragmentation de cet ion pseudo-moléculaire, donnant accès aux fragments de masse respectives 81, 95, 107, 121 et 203 permet de conclure conformément à la littérature à la présence de stanozolol.<sup>6</sup>

La présence de stanozolol, dont la structure est donnée en Figure 3, est en accord avec la RMN. En effet, la présence un peu surprenante du singulet très déblindé à 7,25 ppm, s'explique aisément par la présence d'un cycle aromatique de type pyrazole à 5 carbones, dont le proton 21 en alpha de l'azote est cohérent avec le déplacement chimique obtenu. De plus il contient lui aussi comme une grande partie des stéroïdes, 3 groupements méthyles (18, 19 et 20) sur son cœur stérane.

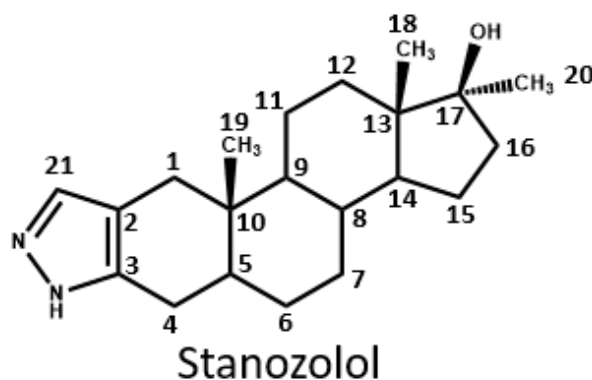


Figure 3 : Structure du stanozolol détecté dans la formulation 13 : DIA.

Une des formulations a par la suite été quantifiée sur le signal du proton aromatique (21) et une quantité de  $4,8 \pm 0,4$  mg a été mesurée. Sachant qu'un grand nombre de formulations contenant du stanozolol à 5 mg/comprimé sont répertoriées, ces résultats semblent en accord avec le marché.

Le cas d'OXY, lui est un peu différent. En effet, sur les 4 boîtes étudiées, 2 (les boîtes 2 et 3) contenaient également du stanozolol, mis en évidence en rouge sur la Figure 4, comme dans le cas précédent. Par contre, deux d'entre-elles contenaient en plus des excipients (St et glycérol) une substance présentant là encore, une zone aliphatique complexe correspondant à un cœur stérane (signaux en vert). Les spectres RMN  $^1H$  des 4 boîtes sont présentés en Figure 4.

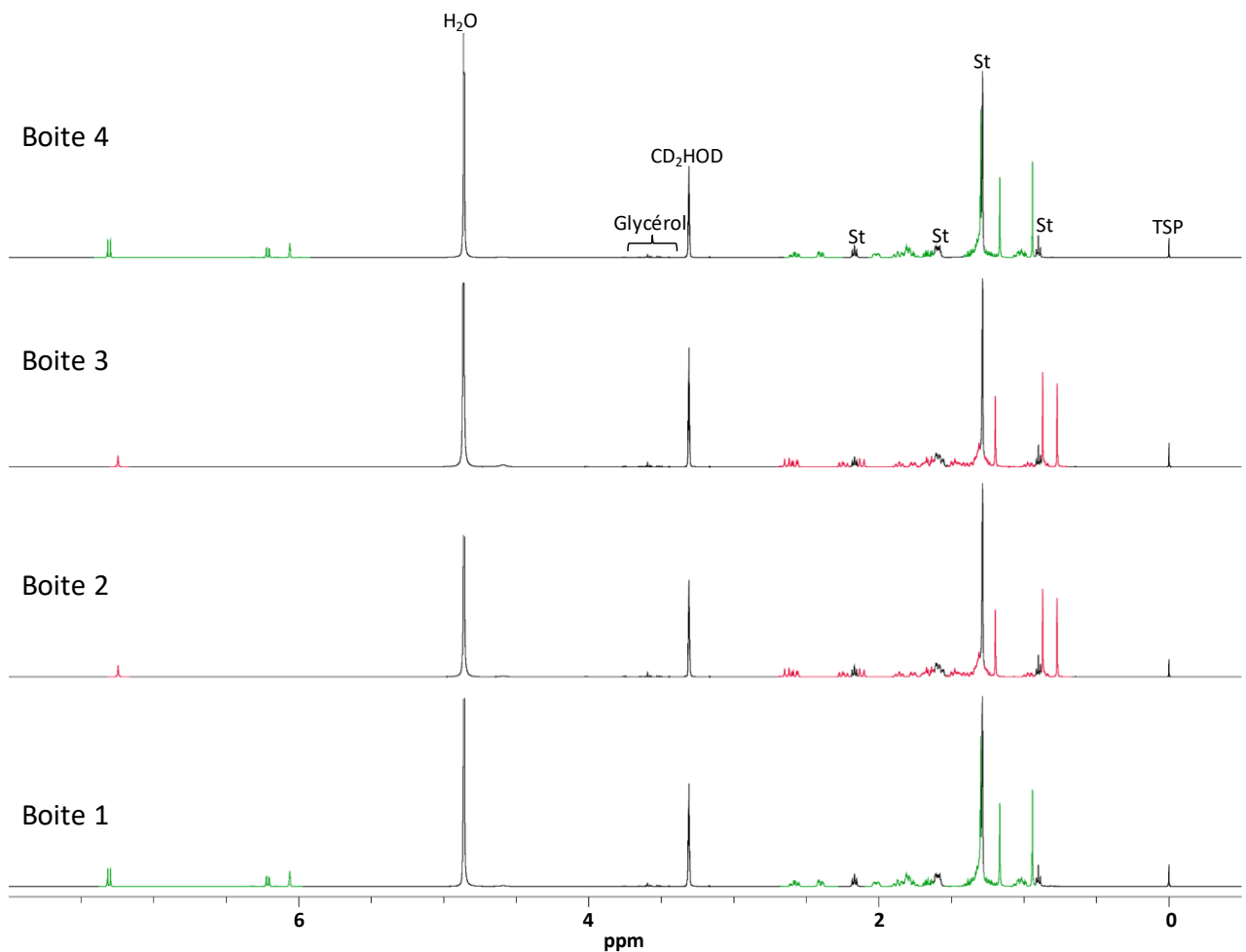
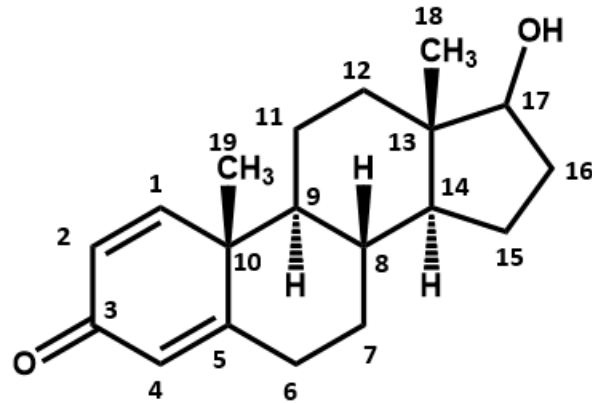


Figure 4 : Spectres RMN 1D  $^1\text{H}$  des comprimés contenus dans les 4 boîtes de la formulation 21 : OXY, enregistrés dans du méthanol- $d_4$ . TSP : référence de déplacement chimique, St : Acide stéarique,  $\text{CD}_2\text{HOD}$  : solvant résiduel. Les signaux en vert correspondent au stanozolol, et ceux en rouge correspondent au stéroïde inconnu.

Les spectres RMN proton des comprimés contenus dans les boîtes 1 et 4, présentent cette fois encore, 3 signaux correspondant à des méthyles à des déplacements chimiques respectifs de 0,94, 1,17 et 1,30 ppm, dont le plus déblindé est partiellement recouvert par le signal à 1,28 ppm du stéarate. La zone éthylénique est cette fois plus caractéristique et contient un doublet, un doublet légèrement ( $J < 2\text{Hz}$ ) dédoublé et un singulet (signaux en vert dans la Figure 4). Cette signature spectrale dans la zone éthylénique, est caractéristique de la famille des boldénones (Figure 5). Cependant, la présence de signaux caractéristiques de 3 groupements méthyles exclu la présence de boldénone elle-même dont le carbone en position 17 ne porte pas de méthyle, mais la présence d'une boldénone fonctionnalisée reste envisageable. Par contre, la présence d'oxymétholone comme nous l'avions suspecté dans un premier temps est exclue, car incompatible avec les signaux observés dans la zone éthylénique.



Boldénone

Figure 5 : Structure de la boldénone.

Là encore une analyse par spectrométrie de masse haute résolution en introduction directe donne accès à un pic unique d'ion pseudo moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z$  301,2167 en ionisation positive, pouvant par le calcul aboutir préférentiellement à une formule brute du type :  $C_{20}H_{28}O_2$ . Cette formule brute correspond à 3 protons et un carbone près à celle de la boldénone précédemment envisagée. Ces résultats sont en accord avec la présence d'un méthyle supplémentaire détecté sur le spectre RMN proton.

De plus la fragmentation, donnant accès aux ions de masses 283, 149 et 121, en accord avec la littérature confirme la présence de méthandrosténolone, déjà décrit en Figure 1, qui est en effet une boldénone fonctionnalisée par un méthyle en position 17.<sup>7</sup>

Un comprimé dans chacune des boites a été quantifié sur un/le proton éthylénique/aromatique et donne accès aux valeurs suivantes :

Boite 1 : Stanozolol ;  $4,9 \pm 0.1$  mg/comprimé

Boite 2 : Méthandrosténolone ;  $4,1 \pm 0.1$  mg/comprimé

Boite 3 : Stanozolol ;  $4,4 \pm 0.1$  mg/comprimé

Boite 4 : Méthandrosténolone ;  $4,4 \pm 0.1$  mg/comprimé.

Ces valeurs quantitatives contrairement à celle de DIA sont globalement légèrement en dessous de celles des substances vendues (illégalement) sur le marché.

Cet exemple est une illustration de la complexité et la diversité des substances qui peuvent être vendues sous une même appellation avec une répartition des actifs à priori aléatoire entre les boites. On retrouve d'une part la présence complètement inattendue au vu des inscriptions temporaires, de



stanozolol et de méthandrosténone, ce dernier étant interdit à la consommation depuis le début des années 90. Il est impossible pour le consommateur de tels produits de savoir ce qu'il ingère.

### 3.2.1.2 Cas de la formulation 5

Tout comme l'exemple précédemment évoqué sur les formulations 13 et 21, la formulation 5 était une simple poudre blanche contenue cette fois dans un flacon en verre scellé. Cette fois, le spectre RMN proton dans du méthanol ne procure par d'informations suffisantes pour l'interpréter entièrement. De plus, en première approche, l'allure générale du spectre ne correspond pas du tout à un profil caractéristique de stéroïde. Le spectre RMN a donc, après divers essais, été réalisé dans un mélange de solvant classiquement utilisé au laboratoire, à savoir un mélange acétonitrile- $d_3$ / $D_2O$  ;  $CD_3CN:D_2O$  (80:20 v/v), et est présenté en Figure 6.

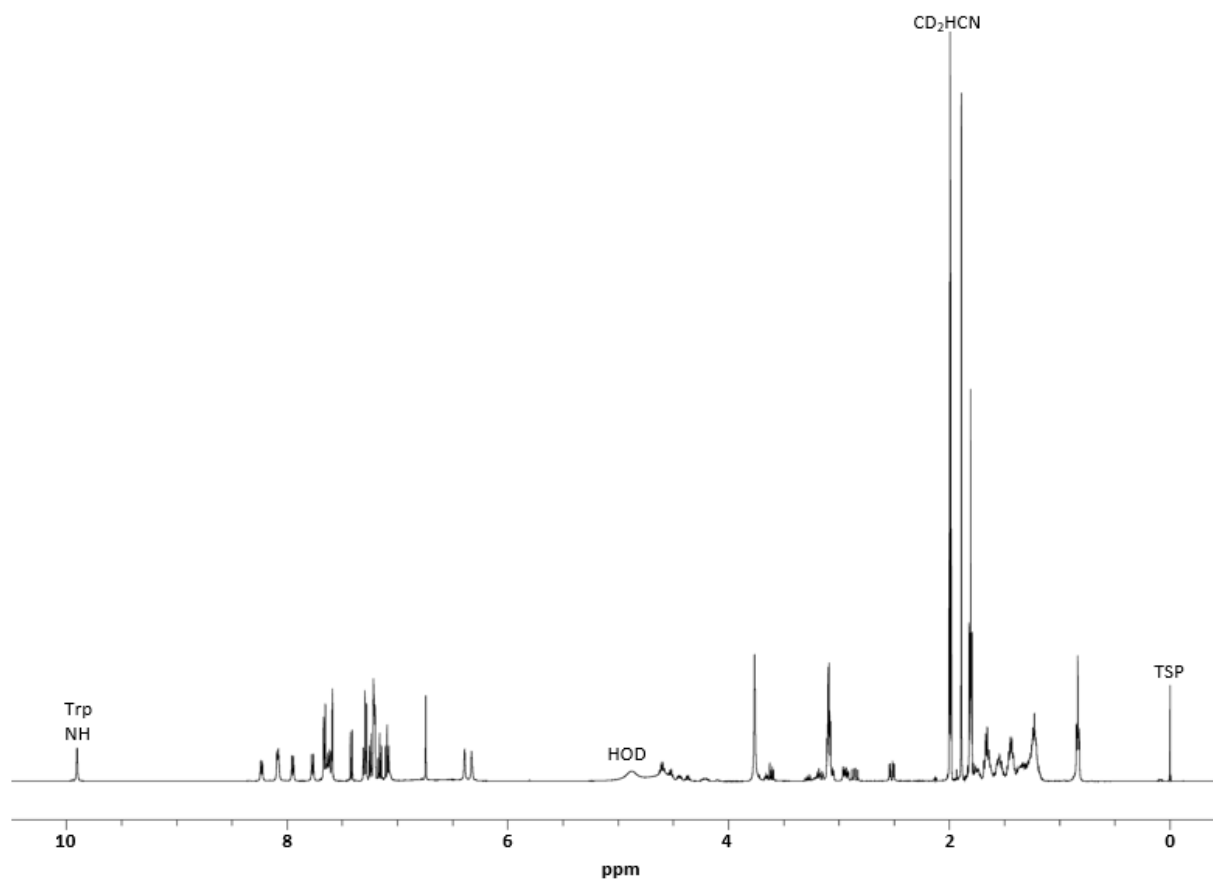
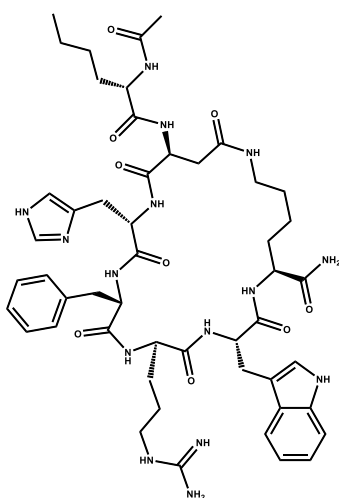


Figure 6 : Spectre RMN 1D,  $^1H$  de la formulation 5, enregistré dans un mélange  $CD_3CN:D_2O$  (80:20 v/v). TSP : référence interne de déplacement chimique, Trp : tryptophane, HOD et  $CD_2HCN$  : solvants résiduels.

Bien que très complexe, le spectre RMN permet la détection de mannitol et de différents signaux pouvant très vraisemblablement correspondre à des acides aminés. Par exemple, la détection à 9,90 ppm du singulet du NH indolique du tryptophane est caractéristique.

L'analyse par spectrométrie de masse donne accès à un ion majoritaire de masse 512,7787 avec un massif isotopique caractéristique dont la différence de 0.5 uma indique qu'il est di-chargé. De fait, l'ion pseudo-moléculaire de notre produit d'intérêt est repéré à  $m/z$  1024,5465 correspondant préférentiellement à une molécule de formule brute  $C_{50}H_{69}N_{15}O_9$ . La fragmentation de l'ion di-chargé majoritaire donne accès à deux fragmentations principales à 128,1074 et 110,0716. Ces ions peuvent être caractéristiques en accord avec la littérature<sup>8</sup> de la présence d'un peptide, le melanotan II (Figure 7).



**Melanotan II**

*Figure 7 : Structure du melanotan II détecté dans la formulation 5.*

La présence de ce peptide, compatible avec les acides aminés détectés déjà par RMN a ensuite été confirmée par une analyse RMN plus complète, en utilisant des séquences classiquement utilisées en RMN des peptides. A l'aide d'une séquence TOCSY (TOtal Correlation Spectroscopy) et d'une séquence NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permettant de voir respectivement les couplages scalaires ( $^1H$ - $^1H$ ) longues distances et les interactions dipôles dipôles à travers l'espace, le séquençage de ce peptide cyclique a pu être résolu et les signaux RMN entièrement attribués comme reporté dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Attribution RMN du melanotan II détecté dans la formulation 5. Haro = proton aromatique.

Numéro	Acide aminé	$\delta$ HN (ppm) (J en Hz)	$\delta$ Ha (ppm) (J en Hz)	$\delta$ H $\beta$ (ppm)	$\delta$ autres protons ( $\delta$ H $\gamma$ / $\delta$ /...) (ppm) (J en Hz)
	Ace (CO-CH <sub>3</sub> )	-	-	-	1,89
1	Nle (Norleucine)	7,66 (7.7)	4,20 (5.5 & 8.6)	1,55	H $\gamma$ : 1,55; 1,64; H $\delta$ : 1,24; H $\epsilon$ : 0,84
2	Asp (Aspartate)	8,23 (7.6)	4,52 (6.4)	2,92 ; 2,52	
3	His (Histidine)	8,08 (6.7)	4,11 (5.3 & 9.0)	3,08 ; 2,95	Haro : 6,74 ; 7,59 (1)
4	D-Phe (Phénylalanine)	7,95 (7.6)	4,45 (4.6 & 10.2)	3,17 ; 2,86	Haro : 7,22 ; 7,30
5	Arg (Arginine)	7,61 (8.2)	4,36 (7.3)	1,67	H $\gamma$ : 1,44; H $\delta$ ; 3,09; NH: 7,09; NH <sub>2</sub> ; 6,33; 6,39
6	Trp (Tryptophane)	8,09 (6.7)	4,60 (8.0)	3,29 ; 3,18	Haro : 7,66 (7.9) ; 7,42 (8.2) : 7,16 ; 7,10 ; HNindolique : 9,90 ; CH : 7,20
7	Lys (Lysine)	7,77 (8.2)	4,23 (3.5 & 11)	1,56 ; 1,75	H $\gamma$ : 1,33; H $\delta$ : 1,44; H $\epsilon$ : 3,09; 3,21; NH: 7,62 (8.0)

Par la suite, le peptide a été quantifié sur le proton aromatique de l'histidine (à 6,74 ppm), permettant d'obtenir une valeur de  $3,8 \pm 0,3$  mg/flacon. Cette valeur est en accord avec celle du marché où il est fréquent de retrouver des valeurs de 4 mg/flacon.

Le melanotan II a été décrit comme un candidat médicament pour traiter les problèmes de dysfonctionnement sexuel, tant chez l'homme que chez la femme. Cependant depuis 2003, tous les développements cliniques ont cessé concernant ce produit. Pourtant depuis les sportifs continuent de détourner ce peptide pour ses propriétés « bronzantes », d'où son surnom sarcastique à l'heure actuelle, « la barbie drug ».

### 3.2.1.3 Cas de la formulation 8

A *contrario* des formulations décrites jusqu'alors, la formulation 8 que nous pouvons rapprocher des formulations 9, 12, 20 et 22 annonce contenir différents cocktails de substances énergisantes, souvent regroupées sous des « formulations brevetés ou mélanges propriétaires ». Par exemple dans le cas de la formulation 8, c'est en lisant les substances contenues sous l'appellation

breveté : « Thermo-Rx and extend-Rx technology » que l'on peut commencer à s'interroger sur la compatibilité d'une telle substance avec la législation mise en place. En effet, dans ce cocktail divers dérivés méthylés de synéphrine et de phénéthylamines (PEA) -dont les structures sont présentées en Figure 8- sont annoncées sous couvert d'extrait de feuilles de *senegala berlandieri* alors qu'ils sont pourtant bannis par les instances règlementaires.<sup>1</sup> C'est notamment le cas de l'oxilofrine également appelé méthylsynéphrine qui est une synéphrine méthylée en position 1, mais aussi le cas de divers dérivés de phénéthylamines méthylées sur l'azote et/ou sur le carbone en position 2.

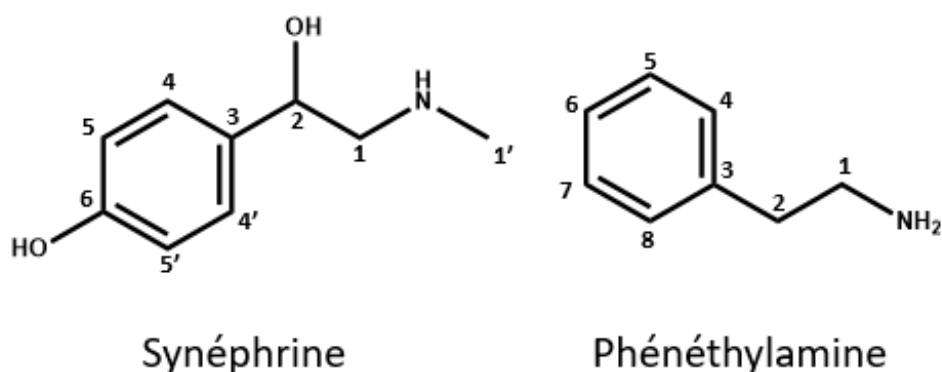


Figure 8 : Structures de la synéphrine et de la phénéthylamine.

De fait et toujours dans l'optique de potentiellement détecter d'autres substances interdites que nous savons très solubles dans les alcools, une première investigation a été menée dans du méthanol-d<sub>4</sub> (Figure 9a) comme pour les formulations 13 et 21. Cependant, au vu de la faible résolution spectrale obtenue dans un tel solvant (Figure 9Ba et Figure 9Ca), une attribution correcte ne pouvait pas être réalisée. Nous avons donc comme pour la formulation 5, envisagé le mélange CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20 v/v) comme présenté dans la Figure 9b), le gain en résolution spectrale notamment dans la zone de 2,5 à 3,5 ppm est cependant compensé par un spectre plus complexe dans la zone de 0,5 à 1,7 ppm (Figure 9Cb). Il s'avère finalement que ces spectres sont bien plus facilement analysables quand les échantillons sont dans de l'eau deutérée pure (Figure 9c), on note dans ce cas un gain de résolution significatif dans toutes les régions du spectre.

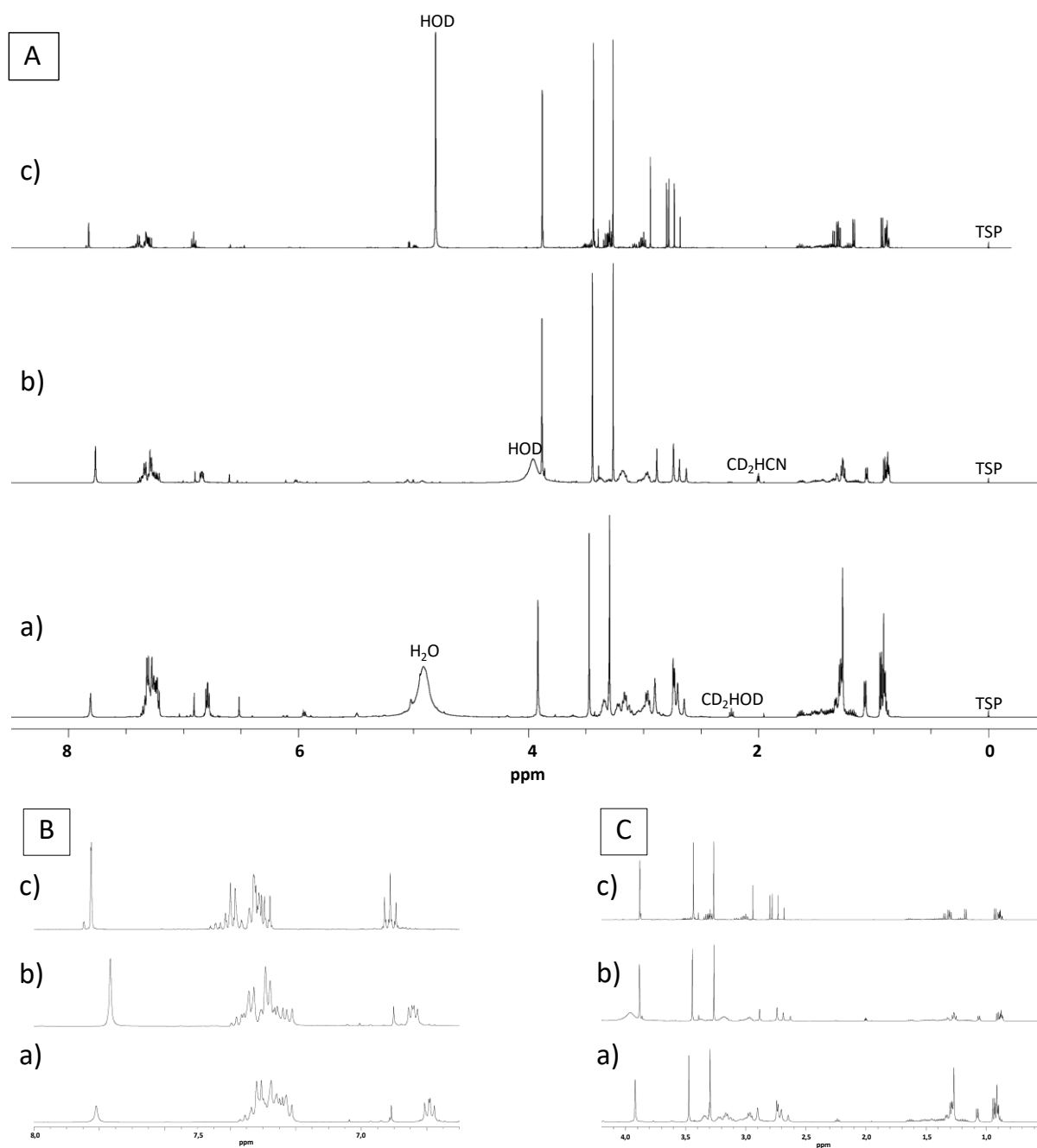


Figure 9 : A : Spectres RMN 1D  $^1\text{H}$  de la formulation 8 enregistré dans a) du méthanol- $d_4$ , b) un mélange  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20 v/v) et c) dans du  $\text{D}_2\text{O}$ . (B) : Zoom des spectres (A) de 6,5 à 8,0 ppm. (C) Zoom des spectres (A) dans la zone de 0,5 à 4,2 ppm. TSP : référence de déplacement chimique, HOD,  $\text{CD}_2\text{HOD}$  et  $\text{CD}_2\text{HCN}$  : solvants résiduels.

Ces analyses ont ensuite été complétées par spectrométrie de masse haute résolution et en tandem du mélange en introduction directe. Nous avons observé que les petites molécules suspectées (i.e phénéthylamine(s) et synéphrine(s)), ont tendance à se fragmenter lors de l'ionisation, de fait et comme présenté dans Figure 10 nous avons décidé de travailler à deux énergies d'ionisations différentes avec des tensions de cône de 30V (Figure 10A) et 10V (Figure 10B).

Plusieurs résultats expérimentaux sont à mentionner : Tout d'abord les ions à 164,1075, 105,0686 et 91,0520 de la Figure 10A diminuent considérablement lorsque l'on baisse l'énergie d'ionisation. Ceci semble indiquer qu'ils ne sont que des fragments d'autres ions présents dans le mélange. Comme montré sur la Figure 10 chaque pic a pu être attribué. De plus, la haute résolution assurée par l'association d'un analyseur à temps de vol avec un analyseur quadripolaire, nous a même permis de séparer le pic à 150,1280 correspondant aux dérivés doublements méthylés de phénéthylamines, du pic à 150,0913 correspondant au premier fragment de la synéphrine, pourtant séparé uniquement de 0,0367 uma.

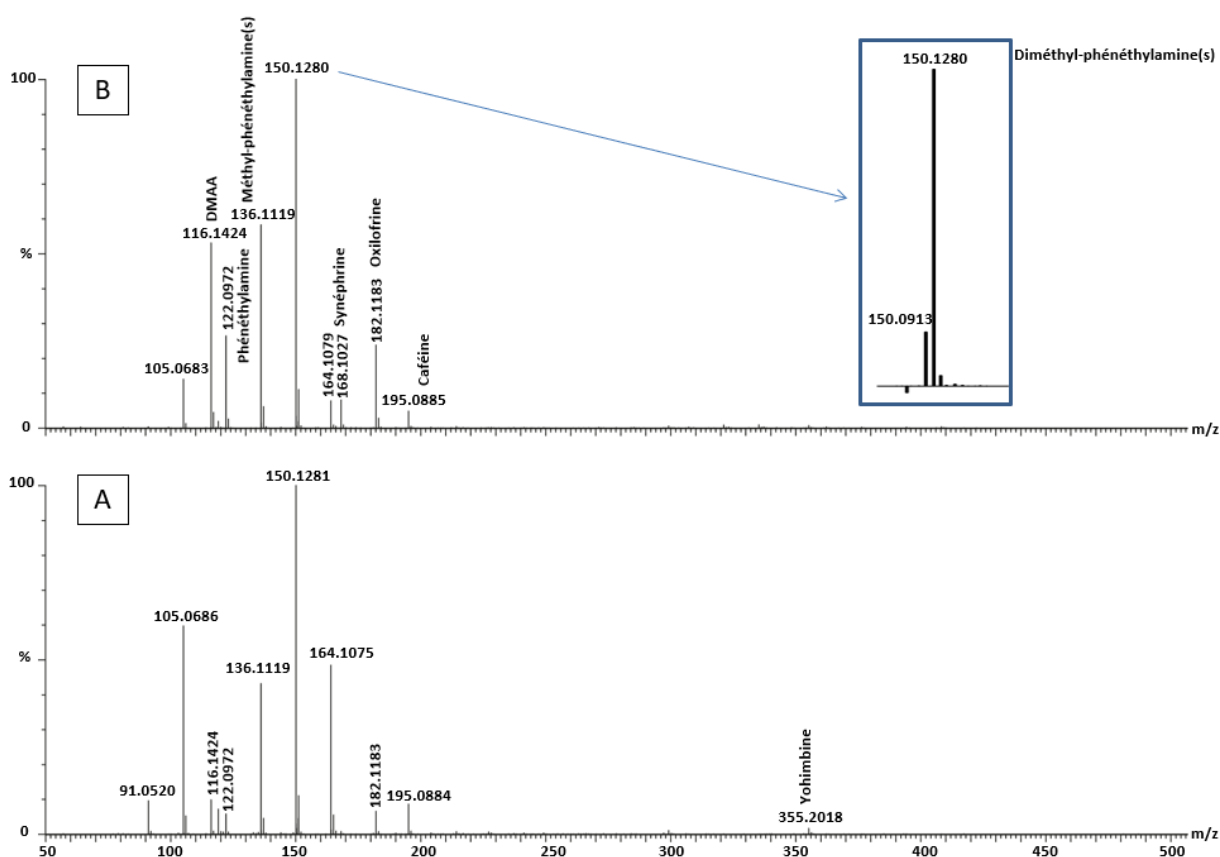


Figure 10 : Spectres de masse (ESI<sup>+</sup>) en introduction directe de la formulation 8 réalisée avec une tension de cône de A) 30V et B) 10V. Les ions annotés correspondent aux ions pseudo-moléculaires [M+H]<sup>+</sup> de chaque espèce mentionnée. DMAA : Diméthylamylamine.

Cependant au vu de la proximité structurale des molécules annoncées (phénéthylamine et dérivés et synéphrine et dérivés), il nous était impossible par une simple analyse MS de déterminer si les pics correspondant aux ions pseudos moléculaires de masse 136 et 150 correspondaient à une seule molécule ou bien à plusieurs. Nous avons alors décidé d'étudier les fragments de ces ions pseudos moléculaires qui seront en réalité un mélange des fragments de chacune des molécules présentes dans l'ion père fragmenté du fait de la capacité de sélection unitaire de l'analyseur quadripolaire. Les résultats donnés en Figure 11 montrent les fragmentations de l'ion pseudo moléculaire de masse 150,1

(Figure 11A) et de l'ion pseudo moléculaire 136,1 (Figure 11B) à différentes énergies de collisions (i.e 15V, 25V ou 35V). Il s'avère, en comparaison des fragmentations respectives des standards, que l'ion de masse 136,1 était issu d'un seul composé : la N-Méthyl-phénéthylamine (MW 135). Alors que l'ion de masse 150,1 était lui en réalité formé à partir de 3 composés, un correspondant (ions en bleu sur le spectre) à la synéphrine (ici son premier fragment que nous venons re-fragmenter), un (ions en rouge) correspondant à l'ion pseudo-moléculaire de la N,N diméthylphénéthylamine, et le dernier (en vert) correspondant à l'ion pseudo-moléculaire de la N-Méthyl,  $\beta$ -méthylphénéthylamine. A noter que les fragments à 77 et 79 uma sont communs à la synéphrine et à la la N,N diméthylphénéthylamine.

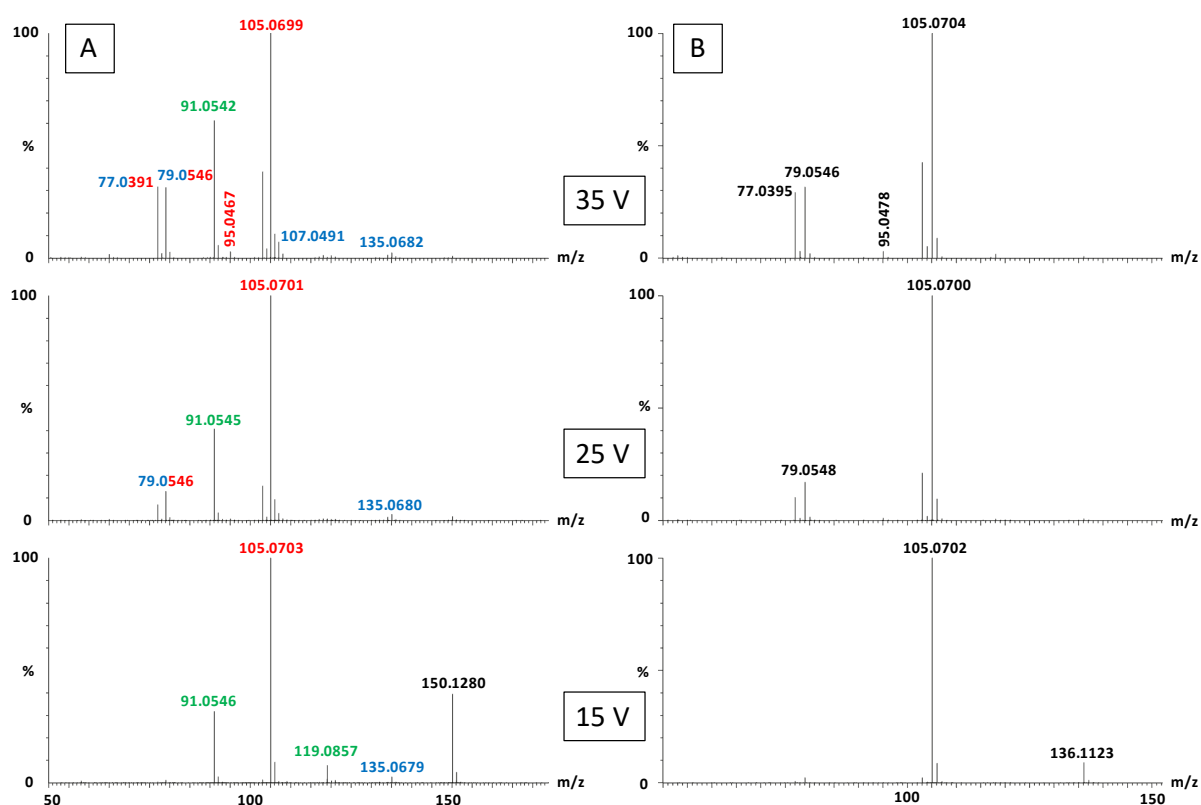


Figure 11 : Spectres MS/MS des ions pseudo moléculaires (A) 150.1 et (B) 136.1 à différentes énergies de collisions. Réalisé sur la formulation 8, en comparaison des fragmentations des standards de synéphrine, N-Méthyl,  $\beta$ -méthylphénéthylamine, N,N diméthylphénéthylamine, et N-méthyl-phénéthylamine.

Cette étude par spectrométrie de masse a pu être consolidée par une analyse RMN  $^1\text{H}$ . En effet, l'attribution complète du spectre enregistré dans de l'oxyde de deutérium a pu être établie grâce à l'ajout des différents standards dans le mélange. L'ajout des différents dérivés de phénéthylamines et de synéphrines a été réalisé dans un mélange à pH légèrement acide (pH = 6,5). Ces composés sont des bases faibles avec des pKa de l'ordre de 9,5 et ces expériences d'ajouts ont nécessité quelques précautions pour éviter des modifications spectrales. De fait, à chaque fois le pH de la solution ajoutée dans le mélange a été ajusté au pH de la solution ( $\approx 6,5$ ) par l'ajout de DCl, permettant de nous placer dans la zone de prédominance des formes  $\text{R-NH}_3^+$  (pH < pKa-2), l'utilisation de solutions tamponnées

s'étant avérée totalement inadaptée. Un article paru juste après la réalisation des travaux confirme l'intérêt d'utiliser des milieux légèrement acidifiés pour l'étude de telles matrices.<sup>9</sup> A titre d'exemple, est montré dans la Figure 12 l'ajout de synéphrine dans deux régions spectrale (i.e 2,6-3,0 ppm et 4,95-5,02 ppm : Figure 12A), ainsi que l'ajout dosé de N-méthylphénéthylamine là encore dans la région allant de 2,6 à 3,0 ppm (Figure 12B). L'unique augmentation des signaux appartenant à la molécule ajoutée, nous a permis d'établir l'attribution de l'ensemble des signaux du spectre, comme présenté en Figure 13.

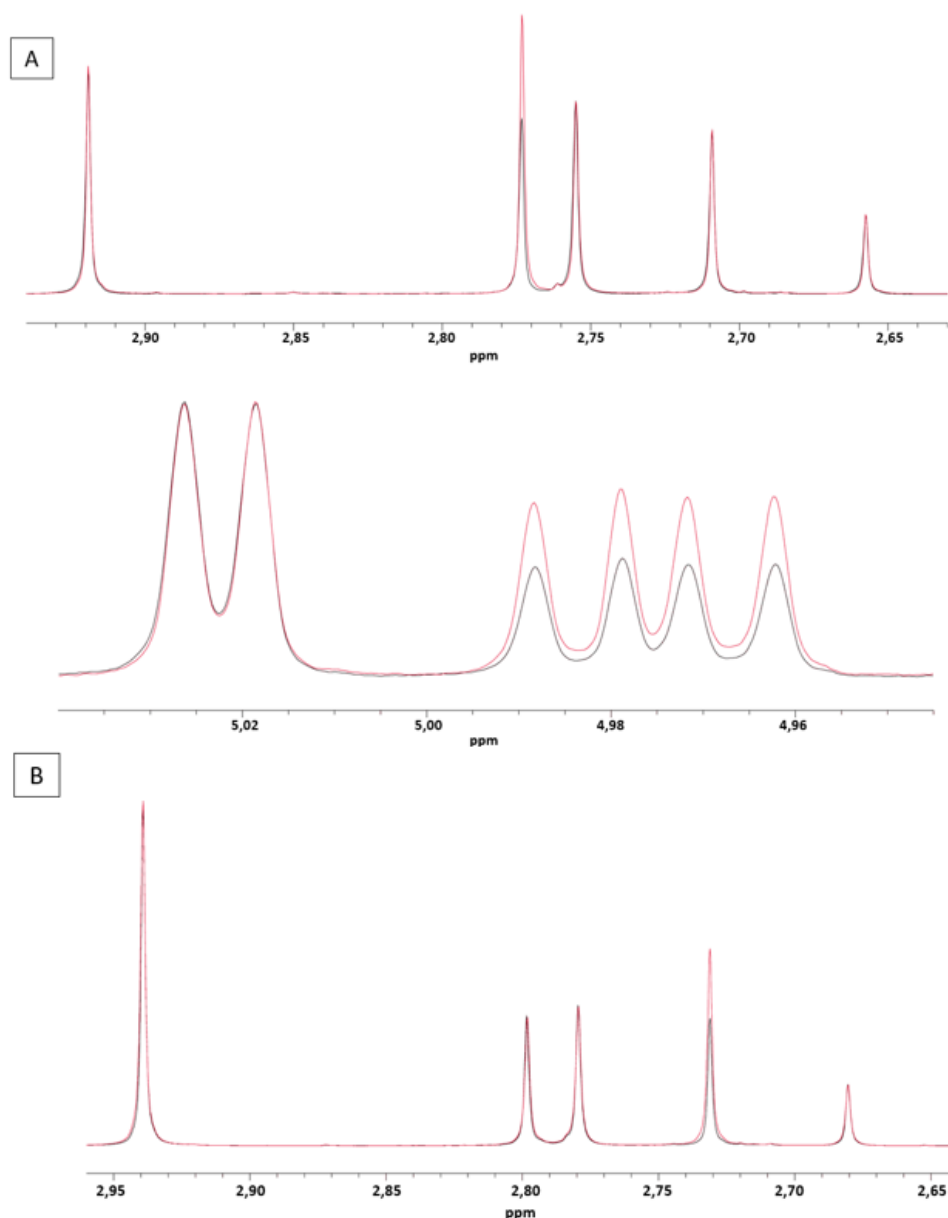
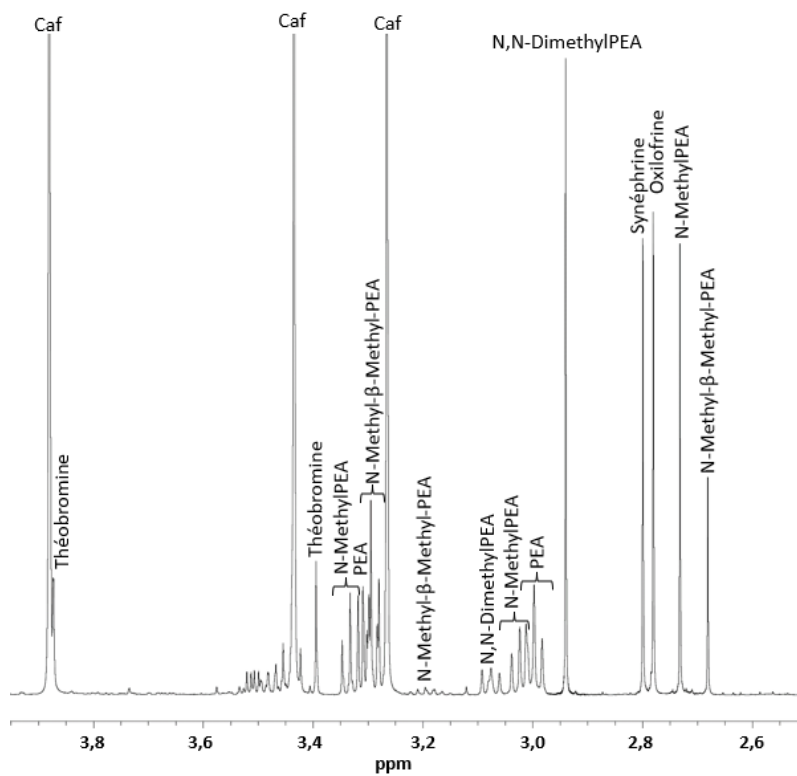
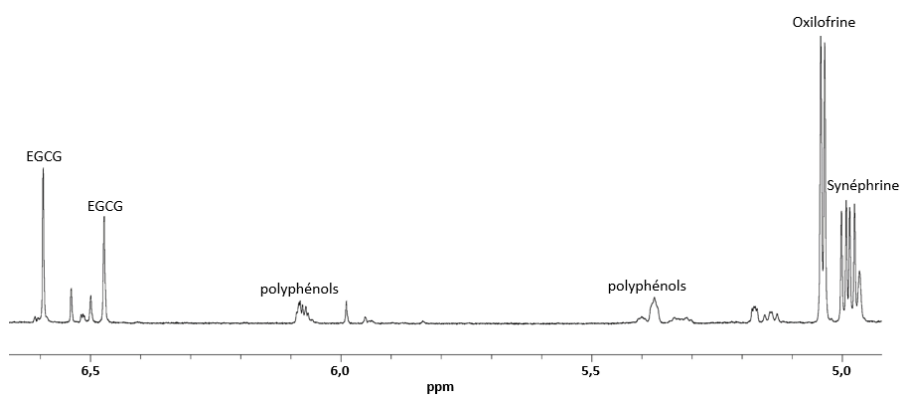
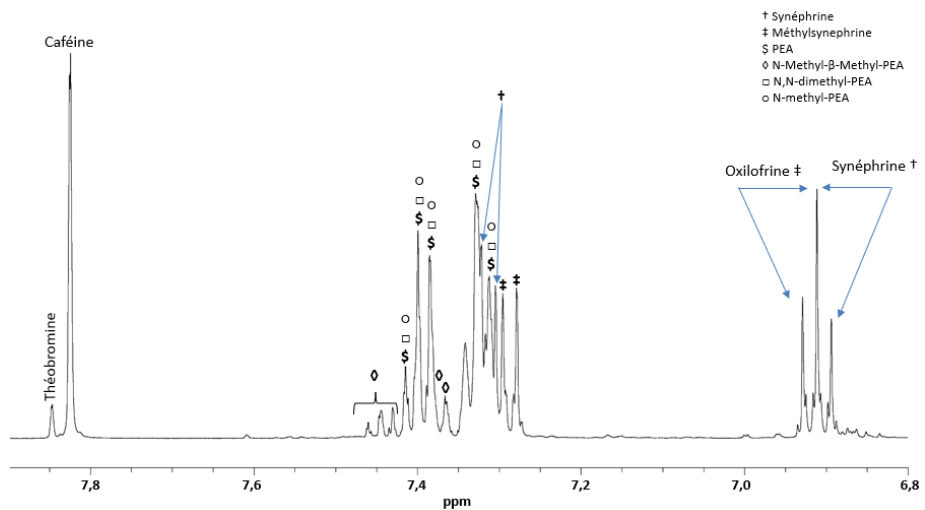


Figure 12 : Spectres RMN 1D <sup>1</sup>H avant (spectres noirs) et après ajouts (spectres rouges) dans la formulation 8 de (A) synéphrine dans 2 zones spectrales (2,6-3,0 ppm et 4,95-5,05 ppm) et (B) N-méthylphénéthylamine dans la zone allant de 2,6 à 3,0 ppm. Le pH des solutions de synéphrine et N-méthylphénéthylamine a été réajusté à ~6,5. Les spectres sont enregistrés dans D<sub>2</sub>O.





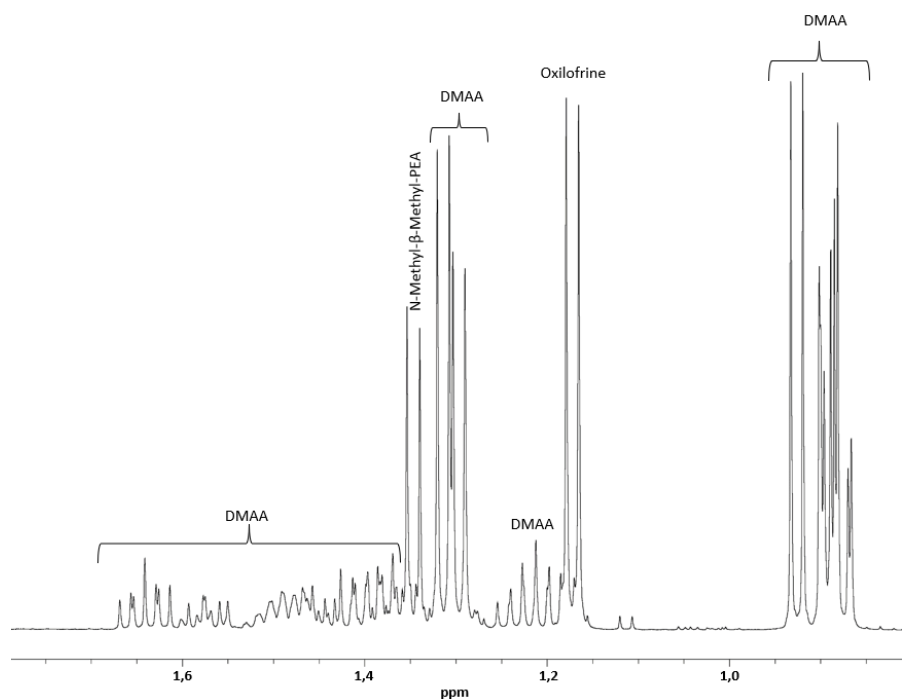


Figure 13 : Attribution complète du spectre RMN proton de la formulation 8 enregistré dans D<sub>2</sub>O. PEA : phénéthylamine, DMAA : Diméthylamylamine, caf : caféine, EGCG : épigallocatechine gallate.

Afin de quantifier ces substances répertoriés S6 (stimulants) et de fait interdites par l'agence mondiale anti-dopage, nous avons utilisé la zone présentée ci-dessus en Figure 12B pour isoler le signal correspondant aux différents N-CH<sub>3</sub> des molécules étudiées, correspondant respectivement à 3 protons pour la synéphrine, l'oxilofrine (= MéthylSynéphrine), la N-méthylphénéthylamine, la N-Méthyl-β-méthylphénéthylamine, et à 6 protons pour la NN-diméthylphénéthylamine. Les résultats obtenus sont les suivants :

**MethylSynephrine** :  $27,4 \pm 2,2$  mg/gélule ; **Synephrine** :  $23,3 \pm 2,0$  mg/gélule ; **N-Methyl-B-Methyl-PEA** :  $9,7 \pm 0,7$  mg/gélule ; **NN-Dimethyl-PEA** :  $13,9 \pm 0,6$  mg/gélule ; **N-Methyl-PEA** :  $20,3 \pm 0,9$  mg/gélule.

La quantification de la phénéthylamine elle-même n'a pas pu être réalisée directement du fait que l'ensemble de ses signaux sont au moins partiellement recouverts. De fait sachant que le massif aromatique comme montré en Figure 13 contient des signaux correspondant à 5 protons de chacune des phénéthylamines, à 2 protons de la synéphrine et à 2 protons de l'oxilofrine. Nous avons, par le calcul déterminé la quantité de phénéthylamine présente dans le mélange. En effet, l'aire du massif à 6,90 ppm correspondant à la somme (2H syn + 2H oxilofrine) a été soustraite à l'aire du massif allant de 7,30 à 7,50 ppm nous permettant d'aboutir à une valeur d'aire correspondante à 5 protons de chacune des 4 phénéthylamines. Cette valeur a été divisée par 5 pour aboutir à une aire correspondante à 1 proton de chaque phénéthylamine. Finalement les aires mesurées grâce à la zone

allant de 2,60 à 2,90 ppm et ramenées à 1 proton ont été soustraites à l'aire précédemment obtenue, permettant d'aboutir sur une quantité de phénéthylamine de  $38,4 \pm 1,7$  mg/gélule.

Cette méthodologie de quantification a été appliquée à l'ensemble des formulations contenant des dérivés de phénéthylamines et de synéphrines.

La quantité de **DMAA** ainsi que celle de **caféine** ont également été mesurées permettant d'obtenir des valeurs de respectivement  $43,4 \pm 1,7$  mg /gélule et  $141,3 \pm 7,2$  mg/gélule.

En réponse aux problématiques d'adultération récentes, l'intérêt de développer des techniques analytiques compatibles avec les substances détectées est de prime importance. Dans l'objectif d'étudier des substances considérées comme « stimulants » par l'agence mondiale anti-dopage, de nombreuses techniques, là encore principalement chromatographiques ont été développées, on reporte notamment des études par HPLC avec divers modes de détections,<sup>10-14</sup> des études par GC-MS,<sup>15</sup> et des études par électrophorèse capillaire.<sup>16-17</sup> Cependant, outre la nécessité de se procurer les standards de références, les auteurs reportent régulièrement la difficulté d'analyser des matrices complexes sans connaissances préalables de l'échantillon. De plus la difficulté, du développement de méthode associé conduit régulièrement à l'étude au cas par cas de chacune de ces substances illicites et à de potentielles erreurs, ne permettant pas de conclure principalement quant à la présence d'amphétamine ou de  $\beta$ -Méthyl-phénéthylamine.<sup>18</sup> Très dernièrement, Zhao et son équipe<sup>19</sup> confirment l'intérêt d'adapter les techniques analytiques à ce genre de substances et mettent en évidence, la pertinence d'utiliser la RMN pour à la fois détecter et quantifier ces substances sans ambiguïtés. Les auteurs reportent tout comme nous, la capacité d'aboutir sur une attribution complète des spectres, en prenant en compte l'influence de paramètres expérimentaux tels que le pH, la concentration, ou encore la polarité des substances étudiées. Les auteurs reportent également des valeurs de quantifications élevés, dans l'ordre d'idée de celles que nous mesurons ici, valeurs qu'ils qualifient de non cohérentes avec les « plantes ou extraits » de plantes annoncés sous la forme de mélange propriétaire, en accord avec des études récentes menées par UHPLC-QTOF-MS. Les études menées ici, permettent d'aboutir sur la détection de substances semblables, nos études permettent cependant la détection supplémentaire des dérivés doublements méthylés de phénéthylamines ainsi que de N-méthylphénéthylamine et *a contrario*, n'a pas mis en évidence la présence ni d'octopamine, ni de méthyltyramine.<sup>9</sup> Finalement la convergence des résultats entre notre étude et celle de Zhao, permet de placer la RMN comme un outil extrêmement efficace pour l'étude de telles formulations, ces études extrêmement récentes, méritent d'être considérées et pourraient faire de la RMN une méthode de références pour l'analyse de telles matrices.

### 3.2.1.4 Cas de la formulation 6

L'analyse RMN de la formulation 6, a, tout comme les précédentes, été abordée avec 2 solvants, dans un premier temps du méthanol- $d_4$  pour la mise en évidence potentielle de stéroïdes, et dans un second temps un mélange  $CD_3CN:D_2O$  (80:20 v/v). Cependant et pour les raisons que nous allons voir ensuite, après avoir exclu la présence de stéroïdes, nous avons décidé de continuer à travailler dans le mélange acétonitrile- $D_2O$ . En effet, comme présenté dans le spectre RMN proton en Figure 14, en plus de la mise en évidence rapide des signaux caractéristiques de quelques composants annoncés (caféine, stéarate, acide chlorogénique, vitamine B3, PEG et taurine), il demeurait quelques signaux non attribués, principalement des signaux à 6,82 et 7,24 ppm caractéristiques d'un système aromatique para- substitué (signaux en rouge sur la Figure 14) ne correspondant pas à la synéphrine pourtant annoncée dans cette formulation. Après vérification, il s'est avéré une certaine proportionnalité entre les aires de ces signaux, celles des deux doublets à 1,32 ppm et celles des deux doublets à 4,86 ppm. Ce dernier signal justifie la difficulté de travailler dans du méthanol pour un tel produit, étant donné que c'est extrêmement proche du déplacement chimique auquel résonne les protons de l'eau résiduelle dans du méthanol.

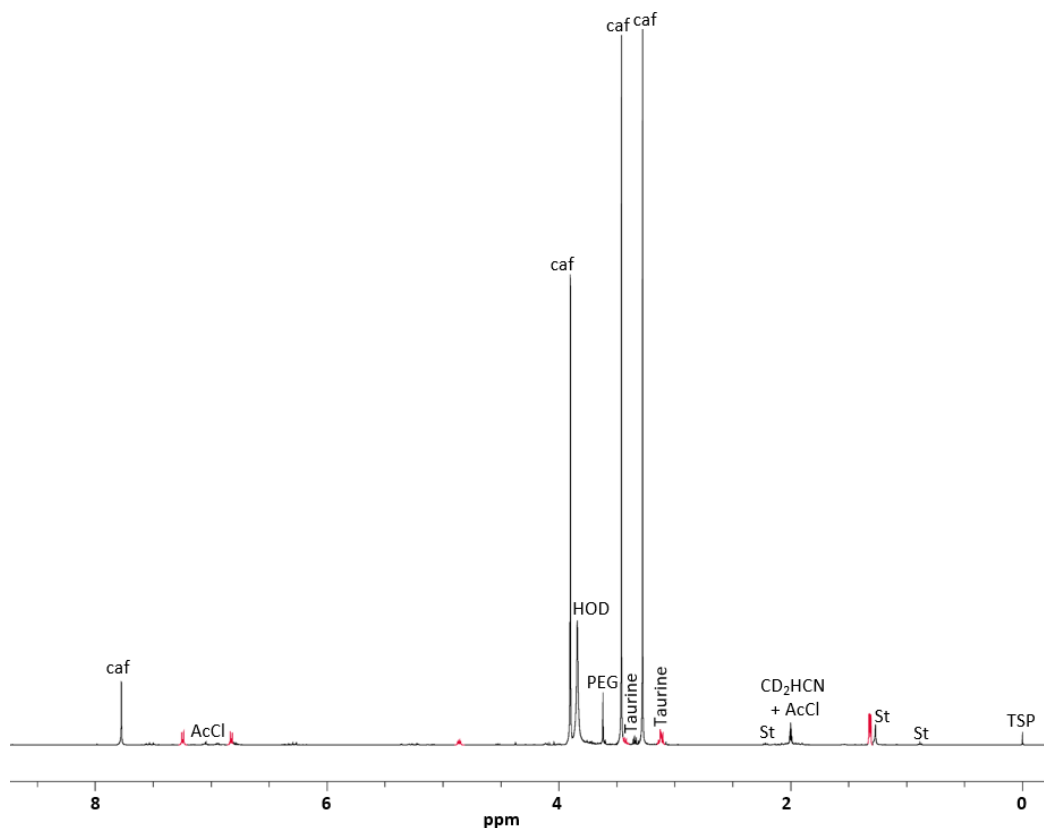


Figure 14 : Spectre RMN 1D,  $^1H$  de la formulation 6, enregistré dans un mélange  $CD_3CN:D_2O$  (80-20 v/v). TSP : référence interne de déplacement chimique, St : stéarate, AcCl : acide chlorogénique, Caf : caféine, HOD et  $CD_2HCN$  : solvants résiduels. Les signaux en rouge correspondent à un produit inconnu.

Afin d'élucider la structure de ce composé, diverses expériences bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC) ainsi qu'une expérience monodimensionnelle carbone (J-Mod) ont été réalisées directement sur le mélange. Ces expériences ont permis de mettre en évidence des corrélations avec des signaux résonnant sous les signaux de taurine et de caféine en RMN  $^1\text{H}$ , rendant inatteignables leurs multiplicités ainsi que leurs aires. De plus, le fait de réaliser des expériences bi-dimensionnelles et des expériences  $^{13}\text{C}$  J-Modulés (pour lesquelles l'intensité des signaux est affectée par les effets NOEs) directement sur un mélange ne permet pas d'obtenir beaucoup plus d'informations sûres, principalement au niveau des carbones quaternaires.

Fort de ces premiers résultats, une analyse par spectrométrie de masse du mélange en introduction directe a été réalisée, donnant accès à 2 ions majoritaires l'un à  $m/z$  195,0888 et l'autre à  $m/z$  178,1235. L'ion pseudo moléculaire à 195,0888 correspond tant par sa masse exacte que sa fragmentation à la caféine. Par contre l'ion à 178,1235 ne correspond à priori à aucune des molécules que nous avons observées par RMN dans notre mélange. Cependant en regardant de plus près les massifs isotopiques de la caféine de formule brute  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$  il s'avère que le ratio isotopique entre le  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et son premier isotope n'est pas cohérent en effet d'après le calcul on devrait obtenir  $8 \cdot 1.1 + 0.36 \cdot 4 = 10.24\%$  pourtant si l'on considère ici le spectre montré en Figure 15A, il s'avère que le ratio isotopique est plus de l'ordre d'une quinzaine de pourcent.

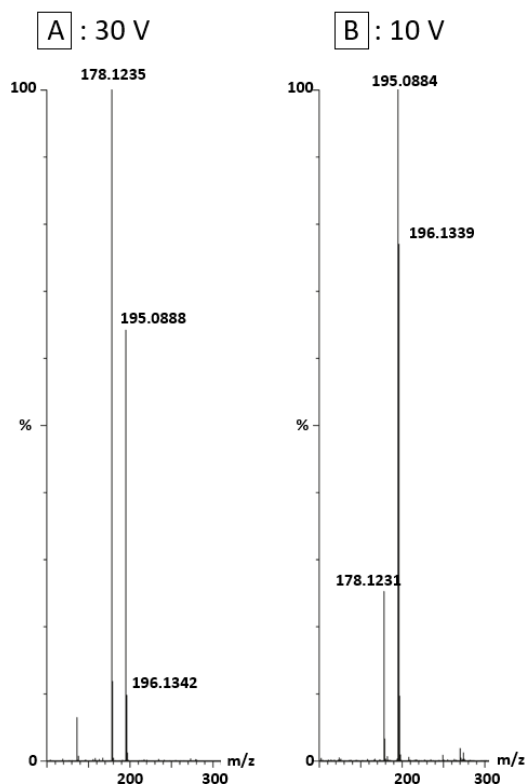


Figure 15 : Spectre de masse en introduction directe (ESI $^+$ ) de la formulation 6 réalisé avec une tension de cône de (A) 30V et (B) 10V.

De fait et par une approche similaire à celle de la formulation 8, nous avons reproduit l'analyse en baissant l'énergie d'ionisation pour évaluer les changements d'intensité des ions formés. Il s'avère alors comme présenté en Figure 15B, que le pic à 178,1231 diminue considérablement, alors que ce que nous considérons jusqu'alors comme le ratio isotopique de la caféine évolue jusqu'à environ 80%. La fragmentation du désormais ion pseudo-moléculaire 196,1, donne accès à un premier fragment majoritaire à 178,1237, confirmant que ce dernier n'était qu'un fragment directement formé en sortie de la source ionisante. La composition élémentaire de l'ion pseudo moléculaire à 196,1342, nous propose alors préférentiellement une formule brute  $C_{11}H_{17}NO_2$  avec 4 insaturations.

En recoupant ces informations, et celles obtenues par RMN, il nous a été possible de conclure à la présence d'isopropyloctopamine autrement nommé détéréinol. Comme décrit dans l'introduction de cette partie, ce n'est pas la première fois que cette substance est mise en évidence dans des compléments alimentaires pour sportifs malgré les potentiels risques pour la santé humaine. Dans notre étude cet actif (présenté en Figure 16) a été retrouvé 4 fois, dans les formulations 6, 7, 11 et 12.

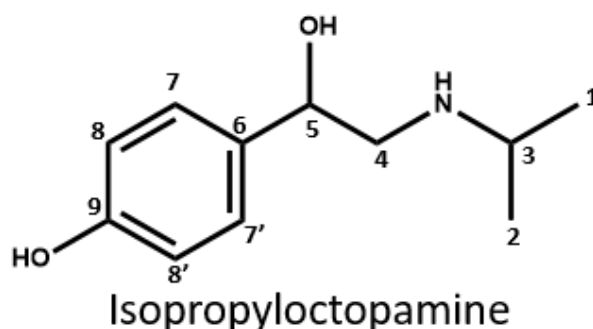


Figure 16 : Structure de l'isopropyloctopamine détecté dans les formulations 6, 7, 11, 12.

Ce produit a été quantifié sur son signal à 4.86 ppm correspondant au proton 5. Permettant de remonter à une valeur de  $18,03 \pm 0,9$  mg/comprimé, la quantité d'isopropyloctopamine détectée, est dans le même ordre d'idée que celle détectée dans la publication citée dans la partie introductive de ce chapitre.<sup>2</sup> L'étude de la formulation 12, qui porte le même nom que le composé étudié dans la publication précédemment citée, permet de mettre en évidence les mêmes substances que celles décrites dans le papier, cependant ce papier reporte la difficulté de caractériser par UPLC-MS, 2 produits au sein du mélange. Pour l'un des produits les auteurs proposent la  $\beta$ -méthylphénéthylamine comme substance possible.<sup>2</sup> Dans ce cas la RMN nous a permis, bien que nous ne puissions pas assurer que notre produit et celui de l'étude soient les mêmes, de conclure quant à la présence de N-méthylphénéthylamine et de N-Méthyl- $\beta$ -méthylphénéthylamine, rappelant une fois encore que la RMN semble une technique parfaitement adaptée à cette application.

### 3.2.2 Compléments alimentaires avec actifs annoncés

Bien que la définition d'un complément alimentaire interdise l'ajout d'une substance active au sein d'une matrice naturelle, certains distributeurs, au vu de la législation trop confuse qui entoure ce secteur, n'hésitent pas à annoncer directement le nom d'un actif dans leur formulation. Dans notre étude c'était même majoritairement le cas, étant donné que 30 des formulations sur 58 étudiés annonçaient contenir des substances de façon délibéré. En effet, comme nous l'avions vu précédemment avec le cas notamment de la formulation 8, certains actifs étaient bel et bien annoncés mais sous couvert d'un mélange. Ici et comme répertorié dans le tableau 3, aucun des actifs annoncés n'est dissimulé. De la même façon que précédemment, l'ensemble des cas ne seront pas détaillés ici, mais seulement ceux présentés dans le Tableau 3. L'ensemble des résultats obtenus seront présentés dans le tableau annexe à ce chapitre page 141 (formulations 29 à 58). Nous sommes conscients que la définition de complément alimentaire ne peut pas être associée à toutes les formulations présentées dans cette catégorie de « compléments avec actifs » mais la classification de préparation si diverses est complexe et a donc été envisagé comme tel.

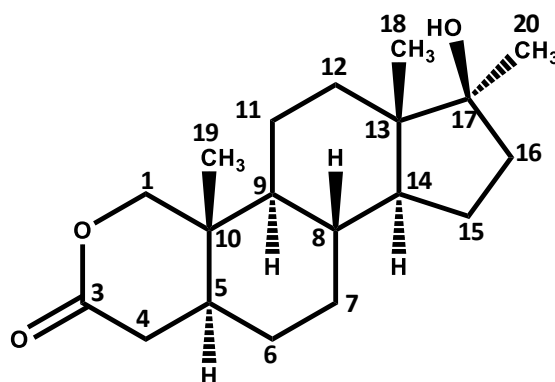
Pour bien comprendre l'étude des cas choisis, il est important de se replacer dans le contexte de certains milieux sportifs. Un sportif -qu'il soit débutant ou confirmé- qui décide d'avoir recours aux produits « dopants » va rentrer dans un monde extrêmement codifié nécessitant l'usage de différents produits, souvent sous la forme de cure. La prise de ces produits a généralement tendance à créer des dysfonctionnements, principalement au niveau de la régulation du taux d'hormones dans le sang. Les problèmes induits étant d'ores et déjà connus du corps médical, des solutions ont déjà été envisagées, c'est principalement visible par l'élaboration d'actif visant à reproduire les effets « positifs » des stéroïdes anabolisants tout en limitant les effets secondaires, on parle alors de SARM (selective androgen receptor modulator). Ces produits sont eux aussi régulièrement retrouvés dans le monde du sport. Les stéroïdes anabolisants ont également, la propriété de « s'aromatiser » facilement en œstrogène lors du métabolisme et possèdent alors des propriétés latérales féminisantes.<sup>20</sup> Ainsi, un homme consommant des stéroïdes anabolisants peut présenter par exemple une gynécomastie. Or, l'aspect physique n'étant pas délaissé par les sportifs, ils peuvent se résoudre à prendre des anticancéreux œstrogène-dépendants, bloquant les récepteurs à l'œstrogène et limitant par conséquent les effets de leurs activations. Nous étudierons donc dans cette partie les cas successifs d'un stéroïde anabolisant de synthèse annoncé, d'un SARM puis d'un inhibiteur d'aromatase.

Tableau 3 : Cas des formulations contenant des actifs qui seront présentées en détail.

Compléments alimentaires avec actifs annoncés				
Formulation	Nom	Actif (s) annoncé (s)	Fabricants Distributeurs	N° lot Date expiration
36	Letrozole	Létrozole	Ajanta pharma Ltd	BN0075C 02/2019
37	Lixus anavar	Oxandrolone	Lixus labs	Aucun 06-2016
41	Osta R.X	Ostarine	IronMagLabs	301115
56	6-Oxo	4-androstene-3,6,17-trione indole-3-carbinol	German pharmaceuticals	1600742 06-2018

### 3.2.2.1 Cas de la formulation 37

Le cas de ce comprimé : Lixus anavar, vendu pour contenir un stéroïde de synthèse : l'oxandrolone (présenté en Figure 17) se révèle un exemple parfait pour démontrer les problématiques engendrées par la mise sur le marché de produits non contrôlés et avec des effets si importants.



Oxandrolone

Figure 17 : structure de l'actif annoncé dans la formulation 37 : l'oxandrolone.

En effet, dans la mesure où ces produits sont annoncés comme contenant un actif, nous les avons étudiés dans le solvant solubilisant le plus aisément l'actif décrit. Ici, nous avons donc travaillé dans du méthanol- $d_4$ . Bien que les signaux aliphatiques correspondant au cœur stérane et aux 3 méthyles confortent la présence d'une structure type stéroïde dans ce comprimé, la présence d'un singulet éthylénique/aromatique à 7,26 ppm, nous permet d'exclure rapidement la présence d'oxandrolone, qui est un stéroïde anabolisant ne présentant aucune conjugaison dans ses cycles (Figure 18). Comme mis en évidence dans la Figure 18 en comparaison des standards respectifs d'oxandrolone et de



stanozolol (en rouge), il s'avère que la formulation ne contient pas l'actif annoncé mais bien du stanozolol précédemment décrit (Figure 3), expliquant bien la présence d'un signal aromatique à 7,26 ppm.

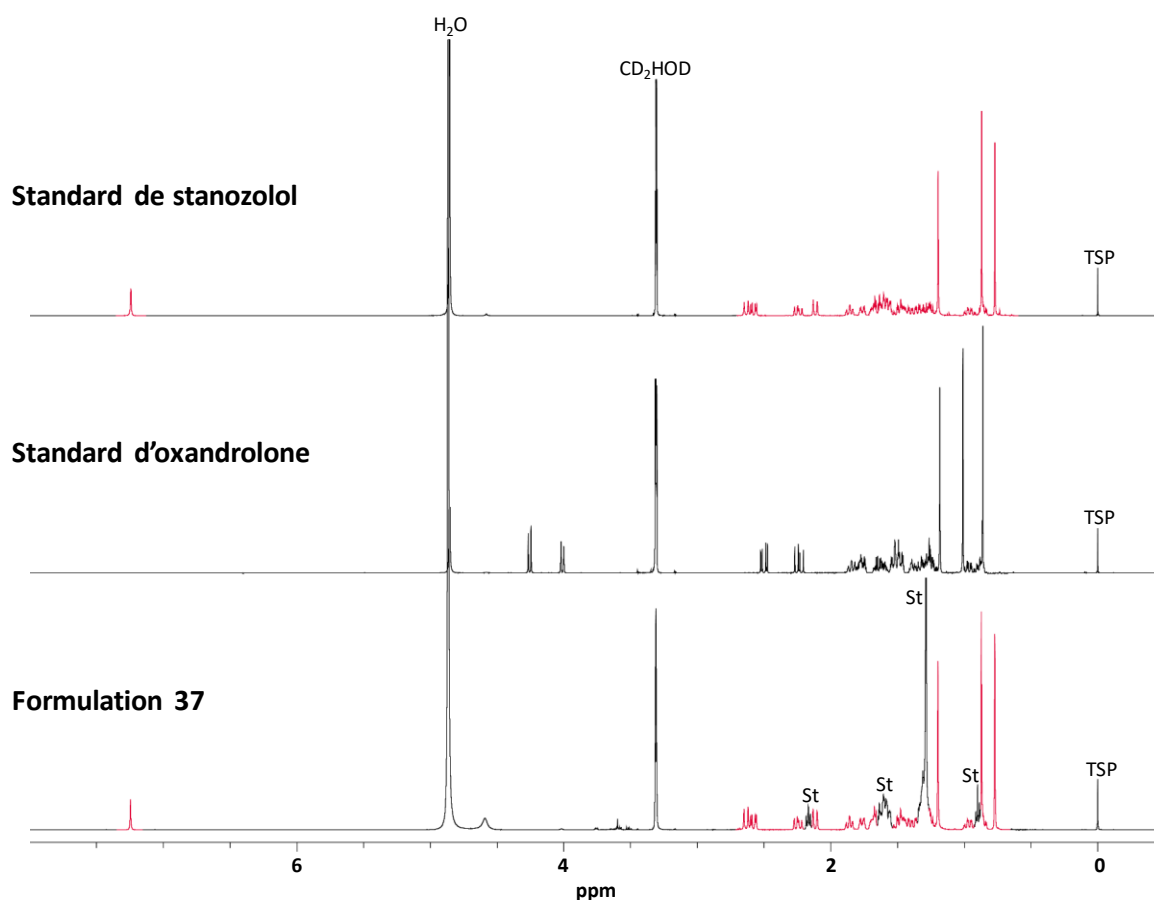


Figure 18 : Comparaison des spectres RMN de la formulation 37, à l'actif annoncé : l'oxandrolone et à celui de l'actif envisagé : le stanozolol. Les signaux coïncidant entre le produit et le standard de stanozolol sont en rouge. St : stéarate, CD<sub>2</sub>HOD : solvant résiduel, TSP : référence interne de déplacement chimique. Enregistrés dans du méthanol-d<sub>4</sub>.

Ces résultats ont pu être confirmés par spectrométrie de masse, avec la présence d'un ion pseudo moléculaire de masse 329,2592 correspondant bien à une structure de formule brute C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O. De plus, les fragments caractéristiques de ce stéroïde de synthèse, à savoir 81, 95, 107, 121 et 203 ont bien été observés en accord avec la littérature.<sup>6</sup>

L'actif a pu être quantifié sur le signal aromatique (H21) et une valeur de 4,5 ± 0,1 mg/ comprimé a été mesurée.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, remplacer un produit par un autre, est une pratique courante pour diminuer les coûts de production et vendre des produits plus chers qu'ils ne le sont vraiment. En effet, le prix public de la spécialité Oxandrolone (boîte de 50 cp à 10 mg/cp) est de 69 euros alors que le prix du Stanozolol (quantité similaire : boîte de 50 cp à 10 mg/cp) est de 25 euros chez le même laboratoire.<sup>21</sup> Dans ce cas précis le problème est encore plus alarmant. D'après quelques

cas reportés, il s'avère que lors des phases de cures menées par ces sportifs l'oxandrolone et le stanozolol, sont souvent pris en association.<sup>22</sup> Ici le consommateur s'expose à de forts risques de surdosage et à ses conséquences.

### 3.2.2.2 Cas de la formulation 41

Comme déjà dit dans la partie introductive, les stéroïdes anabolisants pris en excès, qu'ils soient naturels ou de synthèse, induisent des effets secondaires importants. Or, de plus en plus de compléments alimentaires à base de modulateur de récepteur d'androgène sélectif (SARM) se développent. Ces produits existent depuis les années 1940. Les premiers étaient des dérivés stéroïdiens et depuis les années 1990, il existe des SARMs non stéroïdiens ayant pour but de reproduire les effets des stéroïdes anabolisants en limitant les effets secondaires de par leur sélectivité.<sup>23</sup> Bien que les retours sur leurs utilisations dans le monde du sport soient encore faibles l'organisation mondiale anti-dopage bannit déjà ce genre de substance et la FDA a reporté des risques associés à l'usage de ces derniers.<sup>24</sup>

Ces substances sont de plus en plus détectées lors de contrôles anti-dopage.<sup>25</sup> Parmi ces SARMs l'ostarine, également appelé MK-2866 (ou enobosarm) est reportée comme la substance la plus retrouvée. Certains sites spécialisés (et sûrement peu fiables) se vantent même que 10% des athlètes de bodybuilding auraient recours à cette substance. L'ostarine permettrait principalement de limiter la « fonte musculaire » pendant les périodes hors entraînement. C'est cette substance (Figure 19) qui est annoncée dans la formulation 40. Pourtant après une rapide analyse du spectre RMN (Figure 20), il apparaît clairement l'absence de signaux qui seraient caractéristiques de l'ostarine. Ainsi, principalement dans la zone des protons aromatiques, où moins 2 signaux pour le système aromatique para-substitué (protons 2,2' et 3,3'), et 3 signaux pour les protons 9,10 et 13 du cycle aromatique à 6 chaînons tri-substitué seraient attendus. De plus un spectre RMN du fluor-19 a été enregistré, ne permettant pas de mettre en évidence le groupement trifluorométhyle en position 14.

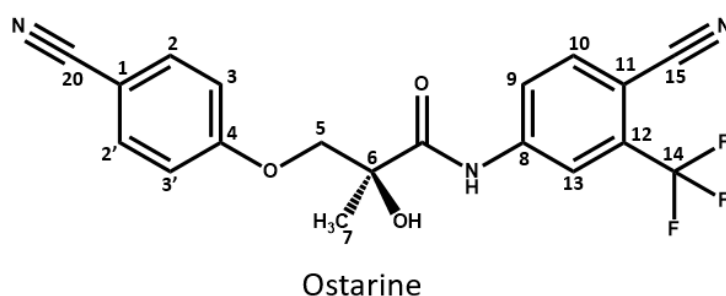


Figure 19 : Structure du composé annoncé dans la formulation 41 : l'ostarine.

Par contre, la présence de deux singulet à 7,24 et 5,70 ppm, associée avec la présence d'au moins 4 singulets dans une zone aliphatique extrêmement complexe, laisse présager la présence de stéroïdes anabolisants dans cette formulation.

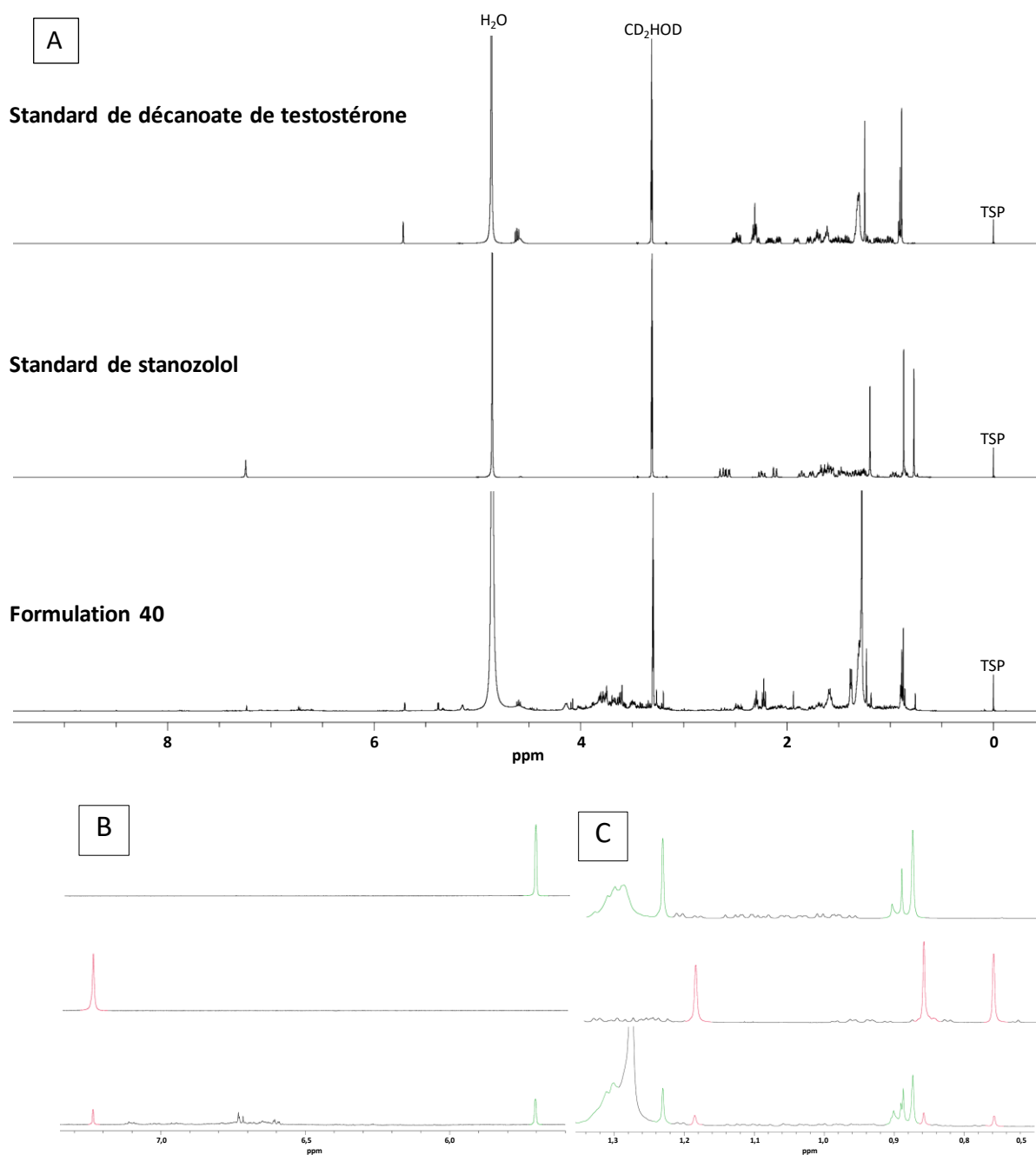


Figure 20 : A : Spectre RMN 1D <sup>1</sup>H de la formulation 40 comparé avec les standards de stanozolol et de décanoate de testostérone, enregistrés dans du méthanol-d<sub>4</sub>. B : agrandissement de la zone de 5,5 à 7,5 ppm. C : Agrandissement de la zone de 0,5 à 1,4 ppm. TSP : référence interne de déplacement chimique, CD<sub>2</sub>HOD : solvant résiduel.

Pour cet exemple, des agrandissement du spectre RMN des zones discutées sont présentés dans la Figure 20 (B et C), la comparaison des spectres avec ceux de notre base de données permet d'envisager une fois encore la présence de stanozolol (en rouge) ainsi que celle de décanoate de testostérone (en vert), principalement détectable grâce à son signal à 5,70 ppm et grâce à la complexification du signal

à 1,27 ppm -correspondant majoritairement au stéarate- par la longue chaîne carbonée formant le groupement décanoate.

Les résultats ont été confortés par spectrométrie de masse, mettant en évidence 2 ions pseudomoléculaires majoritaires de masse 329,2585 et 443,3511 correspondant respectivement au stanozolol et au décanoate de testostérone. Pour les deux ions, la fragmentation est en accord avec la littérature.<sup>6, 26</sup> Les esters de testostérone en électrospray positifs se fragmentent tous en suivant les mêmes voies de fragmentation : ils perdent leur groupement ester caractéristique, puis se déshydratent 2 fois consécutivement et enfin un clivage entre deux cycles du cœur stérane est observé. Le schéma de fragmentation sera donné dans la partie suivante de ce chapitre.

La quantification de ces deux stéroïdes anabolisants a été effectuée sur leurs signaux éthyléniques/aromatiques, permettant de mesurer une quantité de  $5,5 \pm 0,3$  mg de décanoate de testostérone et  $1,2 \pm 0,1$  mg de stanozolol par comprimé. Bien que ces quantités soient relativement faibles, n'oublions pas que l'intérêt de cette formulation était d'éviter les effets secondaires des stéroïdes anabolisants par la prise de substances « non stéroïdiennes ». En achetant ce produit, en plus d'être dupé sur le contenu, le consommateur va aussi à l'encontre de ce qu'il désirait.

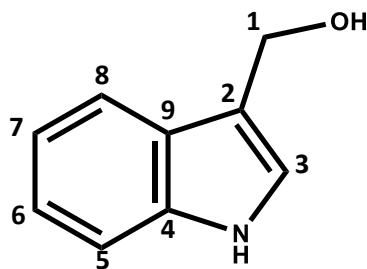
Il nous semble nécessaire ici de discuter la présence de stanozolol dans différentes préparations. En effet, comme déjà reporté 4 fois, avec les formulations 13, 21, 37 et 41 la présence de stanozolol est relativement courante dans les formulations étudiées. Ce n'est pas la première fois que des adultérations par cette substance sont mises en évidence. En 2015, Odoardi et son équipe ont détecté entre autres cette substance parmi les 30 compléments alimentaires analysés par HPLC-MS.<sup>27</sup> Plus généralement, la détection de stéroïdes anabolisants dans des médicaments ou dans des compléments alimentaires est bien documentée dans la littérature, principalement via des techniques chromatographiques. A titre d'exemple, en Italie Pellegrini et son équipe reportent dans une étude que 8 produits sur 15 analysés contiennent des stéroïdes anabolisants.<sup>28</sup> En Corée du sud, Cho et son équipe reportent également la présence de stéroïdes anabolisants parmi les 19 formulations étudiées.<sup>29</sup> En Belgique, Van Poucke a publié que sur 19 compléments alimentaires analysés, 11 contenaient des substances interdites.<sup>30</sup> Enfin Abbate au Royaume Unis annonce 16 sur 24 compléments alimentaires achetés en lignes comme adultérés.<sup>31</sup>

Dans la majorité des cas reporté ci-avant les auteurs décrivent des méthodes uniquement qualitatives. Dernièrement dans deux publications consécutives, Ribeiro et son équipe, utilisent pour la première fois la RMN pour l'étude de potentielles adultérations ou malfaçons de produits pour améliorer les performances sportives.<sup>32-33</sup> Dans la première, les auteurs étudient des formulations se présentant sous différentes formes (comprimés, gélules, solutions injectables) par RMN du proton et

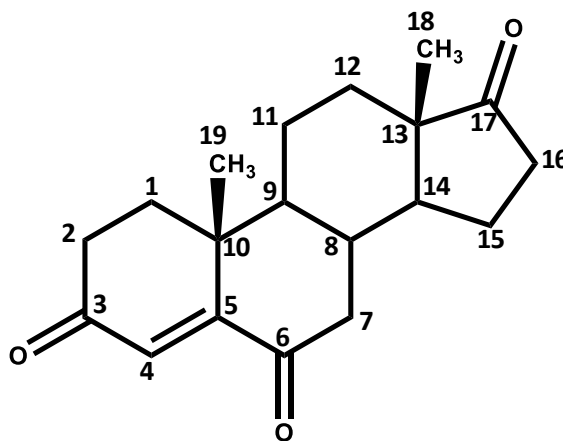
reportent la possibilité de détecter et quantifier les stéroïdes anabolisants, la validation de méthode associée leur permet d'obtenir un taux de récupération allant de 95,2 à 104,0 % dans des temps d'analyses plus court que ceux utilisés en chromatographie. Dans cette étude, ils détectent 4 formulations ne contenant pas les actifs annoncés. Ces résultats confirment la pertinence de l'étude menée ici, et l'intérêt de la RMN pour analyser des substances visant à améliorer les performances physiques. Les résultats obtenus par les auteurs sur les formulations injectables sont cependant un peu plus discutables et seront détaillés un peu plus tard dans ce chapitre. Dans leur second papier, en utilisant la méthode développée dans le premier, les auteurs étudient 40 formulations et mettent en évidence 8 cas dans lesquels l'actif annoncé n'est pas détecté. Ils reportent alors 3 cas d'adultération : l'absence d'actif, l'ajout d'une substance inattendue (ici du citrate de sildénafil) et des produits sous-dosés. Là encore les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés dans notre étude, comme résumé dans le tableau annexe.

### *3.2.2.3 Cas des formulations 36 et 56*

Pris à forte dose, les stéroïdes anabolisants ou dérivés, ont comme décrit brièvement la propriété de s'aromatiser facilement en œstrogène par une action enzymatique. L'œstrogène étant l'hormone sexuelle primaire de la femme, elle induit par nature une féminisation toute au moins partielle du corps, et principalement au niveau des organes sexuels. On note notamment l'apparition de gynécomastie mais aussi une forte atrophie des gonades. Pour pallier ces problèmes induisant des imperfections physiques, les culturistes ont régulièrement recouru à ce que l'on appelle des inhibiteurs d'aromatase. Comme leur nom l'indique, ces derniers ont pour fonctions de limiter la conversion de stéroïdes anabolisants en œstrogène, et donc de limiter cette « féminisation » indésirée.<sup>34</sup> Dans les formulations étudiées divers inhibiteurs d'aromatases étaient annoncés, on notera principalement celle de létrozole ou de clomiphène (formulation 36 et 33) utilisé pour le traitement de cancer œstrogène-dépendant. Dans cette étude de cas, nous étudierons l'une d'entre elle, ici la formulation 36 mais également un complément alimentaire (formulation 56) vendu pour contenir un couple de substances inhibitrices d'aromatase, ici la 4-androstène-3,6,17-trione et l'indole-3-carbinol dont les structures sont représentées en Figure 21.



indole-3-carbinol



4-androstene-3,6,17-trione

Figure 21 : Structures des produits annoncés dans la formulation 56 : l'indole-3-carbinol et la 4-androstene-3,6,17-trione.

Après une étude rapide du spectre RMN proton de la formulation 56 enregistré dans du méthanol- $d_4$  (Figure 22), plusieurs non-conformités apparaissent, la première est l'absence totale de signaux dans la zone aliphatique caractéristique des cœurs stéranes que l'on devrait retrouver dans la 4-androstene-3,16,17-trione. Plus globalement, aucun signal n'est détecté de 0 à 6 ppm alors que ces deux substances sont annoncées pures dans le complément alimentaire et devraient toutes deux avoir au moins 1 signal dans cette zone. De plus les intégrations dans la zone aromatiques, nous permettent de déterminer la présence d'un minimum de 8 protons détectables, or l'indole-3-carbinol lui n'en possède que 5. Il semblerait donc qu'aucune de ces 2 substances ne soient présentes dans ce complément alimentaire. Par contre en étudiant le spectre RMN, il semblerait que nous soyons en présence d'un seul actif qui ne contiendrait que des protons aromatiques (ou éthylénique) et au nombre de 8. Au vu de l'allure du spectre les massifs à 7,55 et 8,00 ppm mettent en évidence la présence d'un cycle aromatique mono-substitué avec des intégrations de respectivement 3 et 2 protons. Le singulet à 6,72 ppm met lui en évidence la présence d'un proton probablement éthylénique mais assez fortement déblindé. Les 2 signaux à 6,22 et 6,47 ppm présentent une constante de couplage identique faible ( $\approx 2\text{Hz}$ ) pouvant coïncider avec une constante de couplage  $^4J_{\text{HH}}$  aromatique semblant indiquer la présence d'un deuxième cycle aromatique tétrasubstitué. Les expériences de RMN du carbone-13 permettent de mettre en évidence la présence de 15 carbones, dont 7 quaternaires.

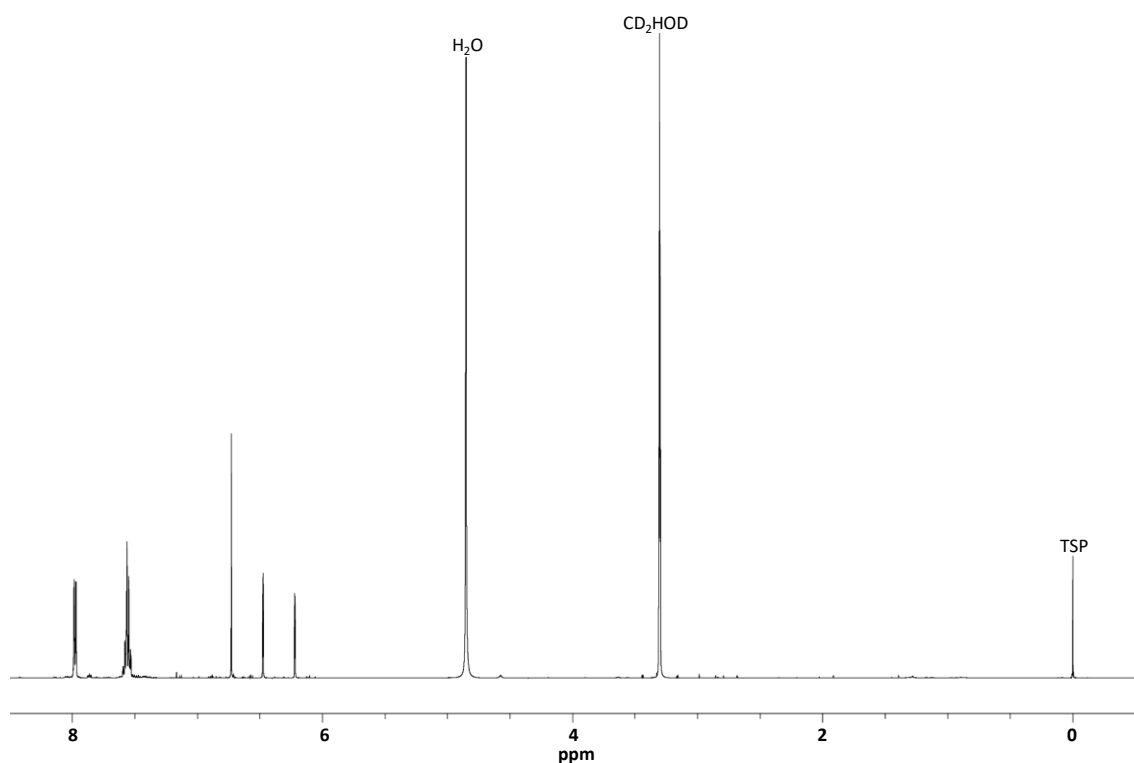


Figure 22 : Spectre RMN 1D  $^1\text{H}$  de la formulation 56 enregistré dans du méthanol- $d_4$ . TSP : référence interne de déplacement chimique,  $\text{CD}_2\text{HOD}$  : solvant résiduel.

L'analyse par spectrométrie de masse en introduction directe confirme dans un premier temps l'absence des 2 actifs annoncés et mets en évidence un ion pseudo moléculaire majoritaire à 255,0661 en ionisation positive et 253,0501 en ionisation négative. Cette substance se fragmente plus facilement après une ionisation négative et donne des fragments majoritaires à  $m/z$  209, 181, 143, 119 et 109 décrits en littérature pour être caractéristique de la chryisine dont la structure est donnée en Figure 23.<sup>35</sup>

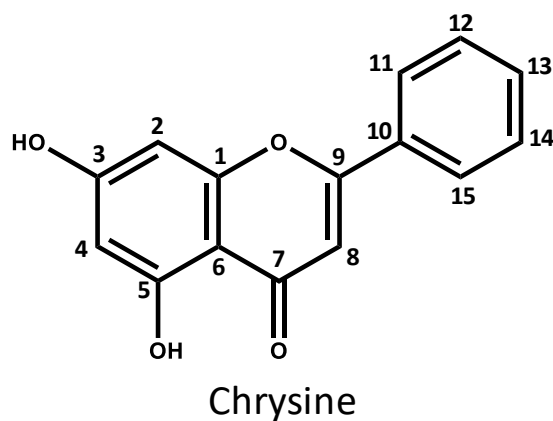


Figure 23 : Structure de la substance détectée dans la formulation 56 : la chryisine.

Ce composé dont la structure est parfaitement en accord avec le spectre RMN obtenu a été quantifié sur son singulet à 6,72 ppm correspondant au proton 8, nous avons déterminé une valeur de  $98,3 \pm 3,9$  mg/ comprimé.

La chryisine est vendue aux athlètes, comme inhibiteur de l'aromatase bien que des études *in vivo* ne montrent aucune activité. Des premières preuves furent apportées au début des années 1980 à travers des études *in vitro*.<sup>36-38</sup> Des études prolongées ont d'ailleurs montré que les membranes cellulaires bloquent efficacement la pénétration de la chryisine dans les cellules et que celle-ci n'a aucune action sur le niveau d'œstrogène dans l'organisme.<sup>39</sup> La chryisine aurait d'autres effets préjudiciables dans le corps, en particulier sur le fonctionnement de la thyroïde, entraînant parfois des variations de poids alarmantes.

L'étude de la formulation 36 s'est révélée encore plus directe. En effet, cette formulation était annoncée comme contenant du létrozole, pourtant après avoir vérifié la solubilité (ici dans un mélange  $CD_3CN:D_2O$ ) et la capacité de cette molécule à s'ioniser dans nos conditions d'analyse sur le standard il s'est avéré, comme montré sur la Figure 24 que la formulation vendue, ne contenait que des excipients, à savoir dans ce cas du mannitol et du stéarate.

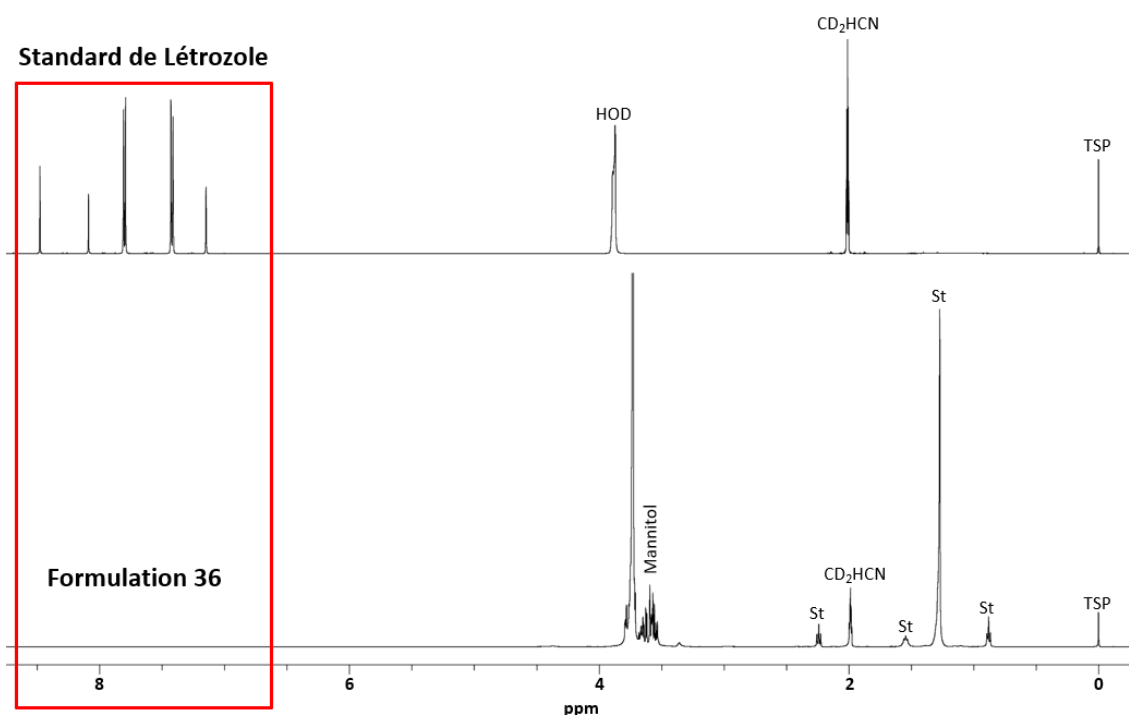


Figure 24 : Spectre RMN proton de la formulation 35 en comparaison du spectre du standard de létrozole, enregistré dans un mélange  $CD_3CN:D_2O$  (80:20 v/v). TSP : référence interne de déplacement chimique, St : stéarate, HOD et  $CD_2HCN$  : solvants résiduels.

Ces résultats ont été confirmés par spectrométrie de masse, où aucune trace de létrozole n'a pu être mise en évidence malgré une sensibilité de détection supérieure à celle de la RMN.



Dans le cas de cette formulation, en l'absence de létrozole, le consommateur ne recevra pas l'actif annoncé que ce soit pour traiter de réels problèmes ou bien pour pallier les effets secondaires de stéroïdes anabolisants.

### 3.2.3 Bilan des cas présentés

Tableau 4 : Récapitulatif des 9 cas de compléments alimentaires avec actifs détaillés.

Formulation	Nom	Actif annoncé (quantité)	Actif détecté (quantité)
5	Aucun	Aucun	Melanotan II (3,8 ± 0,3 mg/flacon)
6	Black Bombs	Caféine Acide chlorogénique Synéphrine Hespéridine Taurine	Caféine (207,0 ± 2,0 mg/cp) Isopropyloctopamine (18,3 ± 0,9 mg/cp)
8	Black Widow	Mélange propriétaire	Caféine (141,3 ± 7,2 mg/cap) N-methyl-PEA (20,3 ± 0,9 mg/cap) N,N-dimethyl-PEA (12,5 ± 1,4 mg/cap) N-methyl-β-methyl-PEA (9,7 ± 0,7 mg/cap) PEA (38,4 ± 1,7 mg/cap) Synéphrine (23,3 ± 2,0 mg/cap) Oxilofrine (27,5 ± 2,2 mg/cap) DMAA (43,4 ± 2,1 mg/cap)
13	« DIA »	Aucun	Stanozolol (4,8 ± 0,4 mg/cp)
21	« OXY »	Aucun	Méthandrosténolone (Boite 1 : 4,9 ± 0,1 mg/cp) (Boite 4 : 4,4 ± 0,2 mg/cp)
			Stanozolol (Boite 2 : 4,1 ± 0,1 mg/cp) (Boite 3 : 4,4 ± 0,1 mg/cp)
36	Létrozole	Létrozole (2,5 mg/cp)	Aucun
37	Lixus anavar	Oxandrolone (10 mg/cp)	Stanozolol (4,5 ± 0,1 mg/cp)
41	Osta R.X	Ostarine (6,5 mg/cp)	Stanozolol (1,2 ± 0,1 mg/cp) Décanoate de Testostérone (5,5 ± 0,1 mg/cp)
56	6-Oxo	4-androstene-3,6,17-trione (75 mg) Indole-3-carbinol (25 mg)	Chryisine (98,3 ± 3,9 mg/cap)

Finalement, au travers des 9 exemples récapitulés dans le Tableau 4, il apparaît que le marché des substances visant à améliorer les performances sportives, est grandement affecté par divers cas d'adultération ou malfaçon et que toutes ces formulations induisent des risques réels pour la santé du consommateur, qu'il soit désireux de réellement prendre une substance active ou qu'il croit aux bienfaits des dits compléments alimentaires. Dans les cas présentés, ces substances en libre distribution auront vraisemblablement pour la plupart un effet positif sur les performances sportives, mais induiront en contrepartie des effets secondaires et des possibles sanctions disciplinaires pour les sportifs professionnels.

Les exemples choisis ici, reflètent bien le fait que l'adultération touche aussi bien les substances dites alimentaires, que les produits annonçant des stéroïdes anabolisants. Cette étude met aussi en évidence que les substances développées et consommées pour pallier les problèmes intrinsèques aux stéroïdes anabolisants sont elles aussi victimes d'adultération, faisant du « monde » des produits de santé pour sportifs, un milieu à haut risques, nécessitant des contrôles importants à tous niveaux.

### 3.2.4 Bilan de l'ensemble des 58 préparations analysées

En étudiant l'ensemble des cas présentés dans le tableau présenté en annexe au chapitre, nous avons observé que dans le cas où aucun actif n'est annoncé (Figure 25B) 61% des substances sont pourtant considérés comme dopantes, car contenant au moins une des substances bannies par l'agence mondiale anti-dopage. Dans le cas où un actif est annoncé (Figure 25A), on note un taux global de non-conformité de 40 %, dans ces derniers, la moitié correspondent à des problématiques de sous dosage, un quart correspondent à la détection d'un actif inattendue, et 3% à l'absence d'actif.

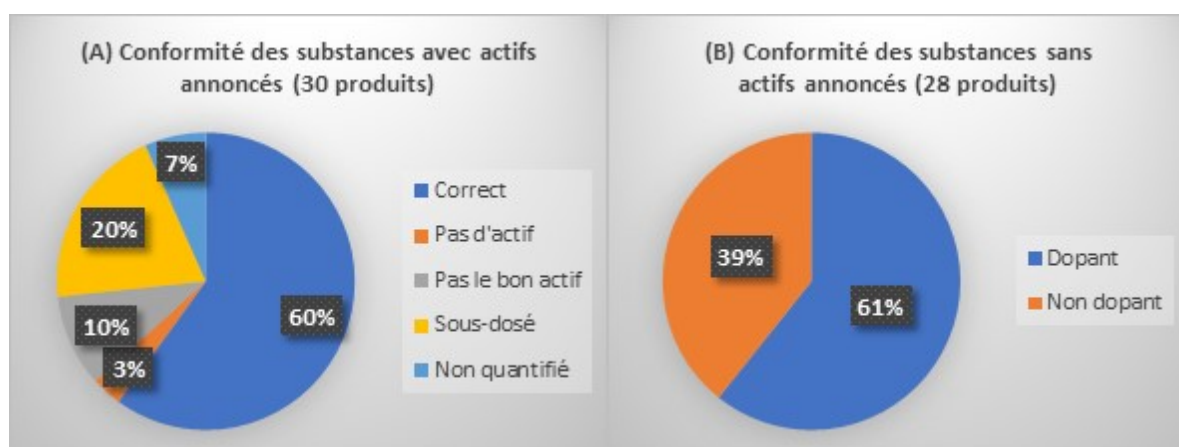


Figure 25 : Bilan portant sur l'ensemble des 58 substances analysées et présentées en annexe (A) Conformité des substances avec actif annoncés (30 produits), (B) Conformité des substances sans actif annoncés (28 produits).

Si l'on globalise ces résultats et bien que ce chiffre ne soit que peu significatif, au vu d'une part de la différence entre les 2 classes de produits étudiés et d'autre part du nombre restreint d'échantillons étudiés (ici 58), nous atteignons un taux de non-conformité voisin des 50 %, chiffre qui est cependant suffisamment significatif pour justifier la nécessité d'un contrôle quant à la qualité de ces produits.

### 3.3 Préparations injectables

Nous avons jusqu'alors étudié les diverses formulations à l'aide d'expériences RMN conventionnelles simples, cette approche a permis d'élucider des cas d'adultérations et a montré l'efficacité de la RMN pour traiter ces problématiques. Cependant il existe sur le marché un grand nombre de formulations injectables plus complexes à analyser car elles sont formulées dans des matrices huileuses, elles présentent toutes le point commun d'annoncer l'actif utilisé. Nous allons voir dans cette seconde partie, dans un premier temps les limites de la RMN pour l'étude de matrices grasses annonçant des stéroïdes et dans un second temps nous proposerons une approche RMN originale pour résoudre ces problèmes.

#### 3.3.1 Présentation des produits étudiés

L'ensemble des substances étudiées ici se présentent sous la forme d'un flacon en verre scellé et étiqueté comme présenté en Figure 26.



Figure 26 : Exemple d'un flacon d'une des solutions injectables analysées. Cas de Super Bold 250.

De prime abord, bien qu'annonçant des produits interdits, ces produits semblent de bonne facture avec une présentation qui laisse présager d'une concordance entre le contenu et l'étiquetage. Ils présentent un numéro de lot ainsi qu'une date d'expiration, une indication sur la concentration ainsi que la voie d'injection à utiliser. Le Tableau 5 présente un résumé des formulations étudiées.

Tableau 5 : Solutions injectables analysées.

<b>Formulation</b>	<b>Nom</b>	<b>Actifs annoncés</b>	<b>Excipients annoncés</b>	<b>N° de lot Date de péremption</b>
<b>1</b>	Super Ace	Acétate de trenbolone 120 mg/1 mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>2</b>	Super Big	Enanthate de testostérone 150 mg/mL Cypionate de testostérone 150 mg/mL Décanoate de nandrolone 150 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>3</b>	Super Bold	Boldenone undécylénate 250 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>4</b>	Super Cyp	Cypionate de testostérone 300 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>5</b>	Super Deca	Décanoate de nandrolone 300 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>6</b>	Super Primo	Méthénolone 120 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>7</b>	Super Prop	Propionate de testostérone 120 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>8</b>	Super Shred	Propionate de testostérone 100 mg/mL Acétate de trenbolone 100 mg/mL Propionate de drostanolone 100 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>9</b>	Super Sust	Propionate de testostérone 60 mg/mL Enanthate de testostérone 120 mg/mL Cypionate de testostérone 120 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>10</b>	Super Test	Enanthate de testostérone 300 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>11</b>	Super Tri007	Enanthate de testostérone 75 mg/mL Acétate de trenbolone 75 mg/mL Hexahydro-benzylcarbonate de trenbolone 75 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018
<b>12</b>	Super Tri008	Enanthate de testostérone 75 mg/mL Acétate de trenbolone 75 mg/mL Hexahydro-benzylcarbonate de trenbolone 75 mg/mL	Huile de pépin de raisin Alcool benzylique Benzoate de benzyle	SJ649B 12/2018

L'analyse de ce tableau laisse apparaître un premier indice quant à une possible faible qualité de ces produits. En effet, bien que toutes annoncées différentes, ces formulations présentent toutes un numéro de lot et une date de péremption identiques. Toutes ces formulations annoncent également une liste d'excipients identique : huile de pépin de raisin, alcool benzylique et benzoate de benzyle. Ces excipients sont classiques pour des solutions injectables, la présence d'huile associée à un alcool type alcool benzylique permet d'atteindre une viscosité cible pour l'injection en voie intramusculaire, de plus l'alcool benzylique agit comme un anesthésiant local permettant de réduire la douleur associée aux injections intramusculaire.<sup>40</sup> Le benzoate de benzyle, permet lui d'aider à la solubilisation des actifs dans ce genre de formulation huileuse. L'ensemble des actifs annoncés ici, sont eux tous répertoriés comme substances médicales et tous également interdits à la consommation dans le monde sportif.

### 3.3.2 Analyses préliminaires

#### 3.3.2.1 Choix du solvant

La problématique abordée ici étant la même entre les 12 formulations, nous étudierons en détail le cas de la formulation 3 Super Bold, nous permettant d'explicitier tous les problèmes surmontés et nous mettrons les résultats en perspectives avec les 11 autres formulations étudiées.

Au vu des données à notre disposition et de la prédominante quantité d'huile annoncé par rapport aux actifs (ratio environ 8 :1 en poids) une première analyse a été menée dans du chloroforme. Ces conditions expérimentales sont en accord avec celles publiées dernièrement par Ribeiro et son équipe, car elles permettent de solubiliser à la fois les excipients et les actifs annoncés.<sup>32</sup> Ces travaux n'étaient pas publiés au moment de la réalisation des travaux et de la mise au point des conditions expérimentales. Comme montré en Figure 27A, l'abondante présence d'huile, et notamment les signaux correspondant à l'enchaînement de groupement  $\text{CH}_2$  aliphatiques ainsi que les méthyles terminaux, rendent cependant extrêmement complexe l'attribution ainsi que la détection des différences entre ces esters de stéroïdes (en rouge sur la Figure 27) qui, dans leur majorité, du fait de leurs structures semblables ne sont discernables uniquement que grâce aux signaux de la région aliphatique. Deux problèmes intrinsèques s'ajoutent à ce problème, la solubilisation d'une grande quantité d'huile rend le milieu analysé extrêmement visqueux et de fait diminue la dynamique moléculaire donnant un rôle primordial à la relaxation transversale ( $T_2^*$ ). La zone aliphatique de ces substances présentant toutes un cœur stérane semblable en devient donc quasi inexploitable. Le second problème est plus un problème intrinsèque à la RMN, l'abondante présence des signaux d'acides gras rend également difficile un réglage approprié de l'atténuation du récepteur, rendant les

signaux des produits actifs plus mal digitalisés que ceux des acides gras. Bien que ces difficultés ne soient pas discutées dans leur publication par Ribeiro et son équipe, nous pouvons constater au travers des exemples montrés qu'ils obtiennent également des spectres mal résolus, pour lesquels une attribution univoque uniquement par RMN semble complexe.<sup>32-33</sup>

Pour toutes ces raisons, nous avons décidé de changer de solvant et d'utiliser un solvant plus polaire, permettant une solubilité intéressante des actifs annoncés, mais une solubilité plus faible voire négligeable des acides gras. De fait, nous avons décidé de travailler dans du méthanol-d<sub>4</sub>, une comparaison directe entre le ratio des valeurs d'intégrations d'un signal caractéristique des stéroïdes à environ 5,70 ppm et le signal à environ 1,20 ppm des acides gras entre les deux solvant, nous a permis de noter une amélioration d'un facteur environ 30. (Figure 27B vs Figure 27A)

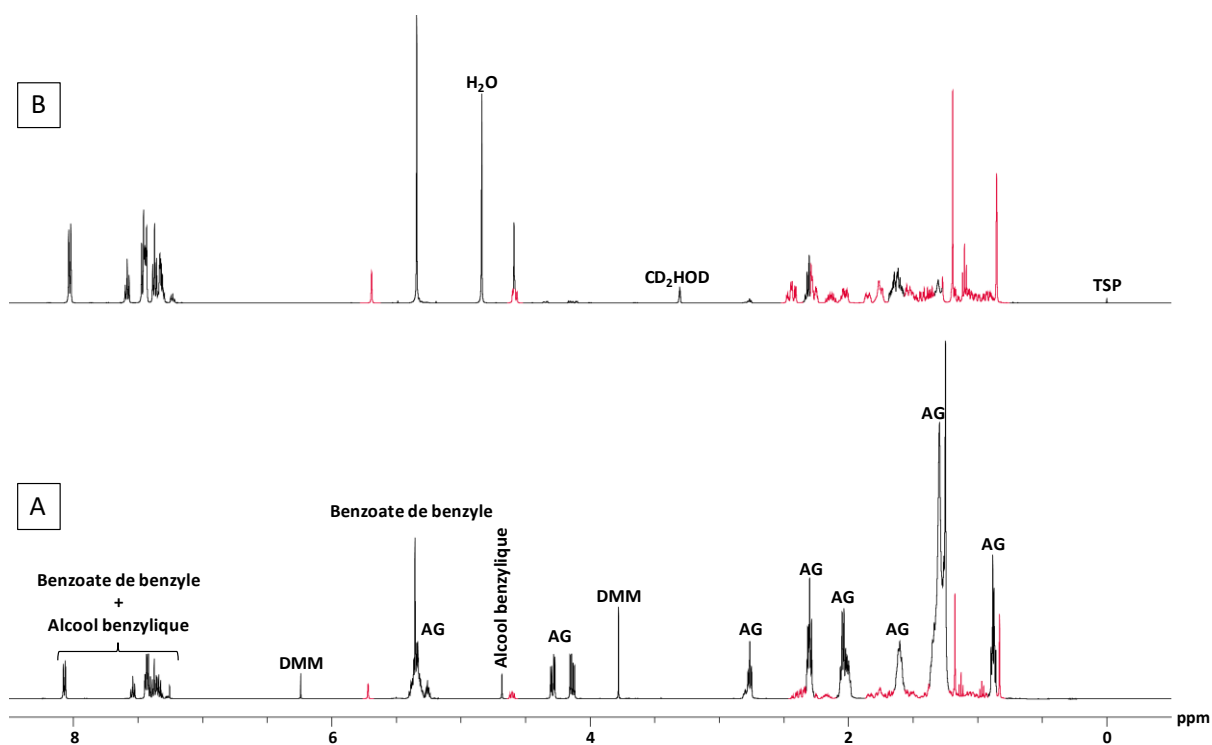


Figure 27 : Spectre RMN 1D, <sup>1</sup>H de la formulation 3, enregistré dans (A) du chloroforme-d et (B) du méthanol-d<sub>4</sub>. TSP : référence interne de déplacement chimique utilisée dans les solvants polaires, DMM : Diméthyl-maléate référence interne de déplacement chimique utilisée dans les solvants apolaires, AG : acide gras.

### 3.3.2.2 Expériences RMN qualitatives

Après avoir choisi le solvant, les 12 formulations ont été analysées de façon qualitative, la méthodologie est explicitée page 133 dans le matériels et méthodes. Tous les excipients annoncés à savoir le corps gras, l'alcool benzylique et le benzoate de benzyle ont bien été retrouvés dans l'ensemble des formulations. Cependant au niveau des actifs alors que chacune des formulations annoncent une composition différente, nous avons pu regrouper les formulations analysées en 3

"familles" sans savoir dans ce premier criblage ce que chacune d'entre elles contenaient, les formulations 1, 8, 11 et 12 forment la première famille. A priori, il semble que ces formulations contiennent simplement 1 actif plus faiblement dosé que dans les autres formulations.

Les formulations 3, 4, 6, 7, 9 et 10 forment la deuxième famille. Ces formulations présentent des spectres avec une zone aliphatique légèrement plus complexe laissant présager la présence de divers esters de stéroïdes, à noter que la formulation 3 que nous détaillerons plus en détail se trouve dans cette famille.

La dernière famille se compose des formulations restantes à savoir les formulations 2 et 5. Et cette fois encore la zone aliphatique diffère par sa complexité de la première famille mais ne correspond pas non plus à celle de la deuxième famille.

Après une première analyse qualitative, nous pouvons faire le constat que quelques formulations annoncent des stéroïdes différents, à savoir des dérivés de testostérone, nandrolone, drostanolone, méthénolone, boldénone et trenbolone (Figure 28). Or, on n'observe dans l'ensemble des formulations qu'un seul signal pour les protons éthylénique (5,70 ppm), excluant d'ores et déjà la présence de drostanolone, méthénolone, boldénone et trenbolone ce qui constitue un premier résultat.

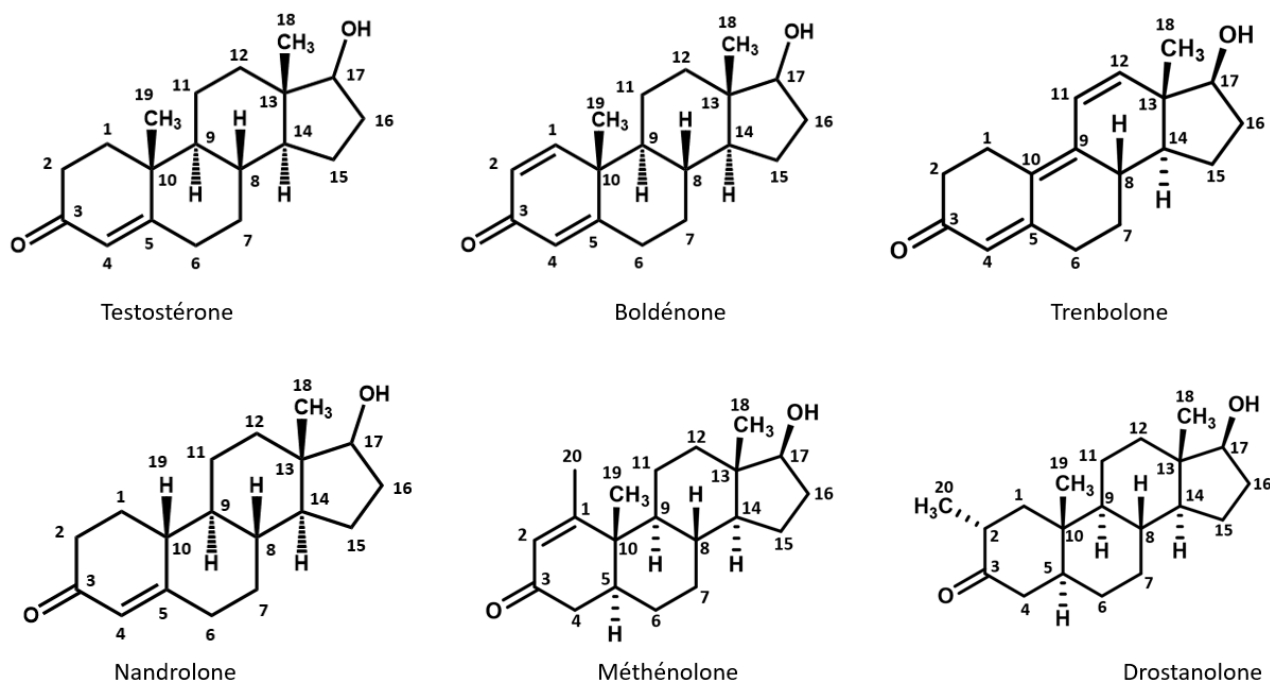
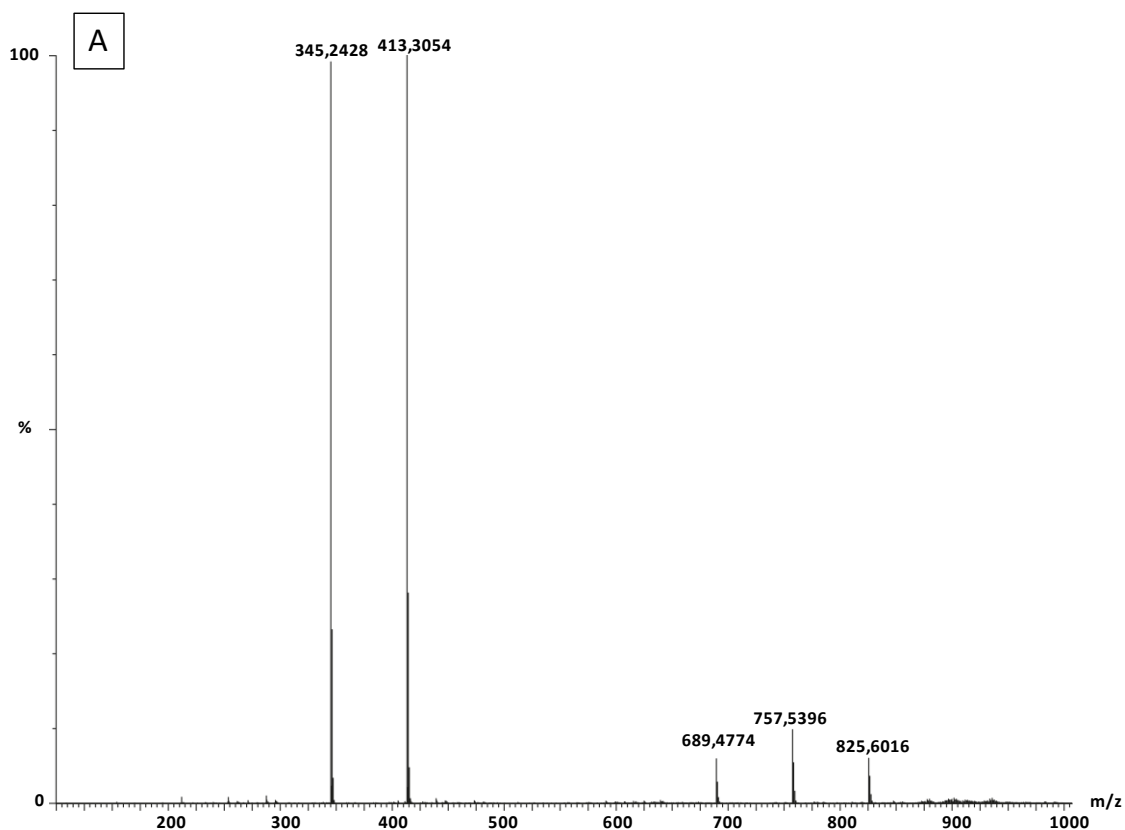


Figure 28 : Structures chimiques des molécules (non estérifiées) annoncées dans les formulations analysées.

### 3.3.2.3 Analyse par spectrométrie de masse

Au vu de la complexité de différencier ces substances entre elles par RMN 1D  $^1\text{H}$ , chacune des formulations a été analysée par spectrométrie de masse haute résolution et en tandem, les paramètres expérimentaux sont explicités dans la partie expérimentale.

Ces analyses ont permis d'affiner la composition des trois « familles » que la RMN 1D  $^1\text{H}$  avait permis de mettre en évidence. En effet, comme montré pour le cas de Super BOLD en Figure 29A), la spectrométrie de masse permet de mettre en évidence la présence de propionate de testostérone ainsi que celle de cypionate de testostérone dont les ions pseudo moléculaires  $[\text{M}+\text{H}]^+$  donnent respectivement des masses de 345,2428 et 413,3054 pour des masses exactes calculées de 344,23515 et 412,29775 soit un écart moyen de l'ordre du ppm. La présence de ces substances a été confirmée par spectrométrie de masse en tandem (Figure 29B et Figure 29C), les fragments observés correspondent à ceux décrits dans la littérature<sup>41</sup> et peuvent s'expliquer par les voies de fragmentation directement décrites sur les spectres ci-dessous. Le premier fragment correspondrait en effet à la perte du groupement propionate dans un cas et cypionate dans l'autre, permettant d'aboutir sur l'ion pseudo moléculaire de la testostérone elle-même. Ce dernier subit ensuite 2 déshydratations puis donne lieu aux 2 ions présentés dans les Figure 29B et Figure 29C.





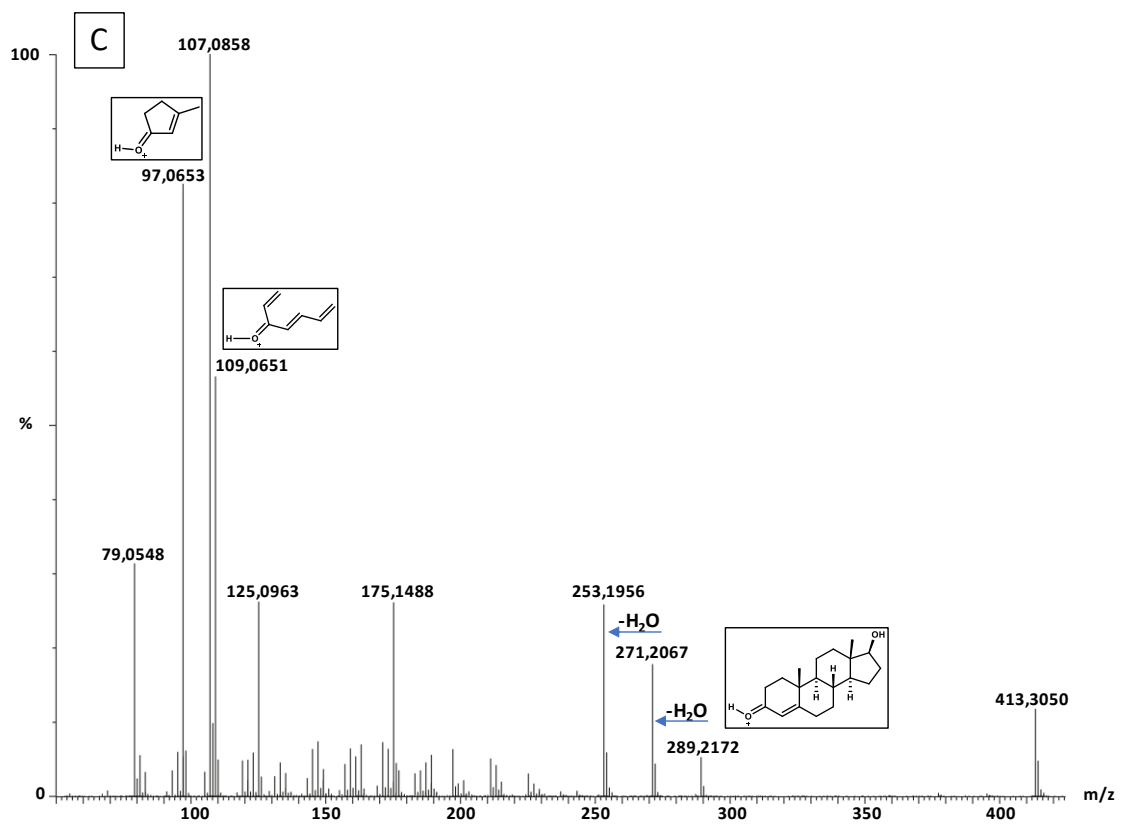
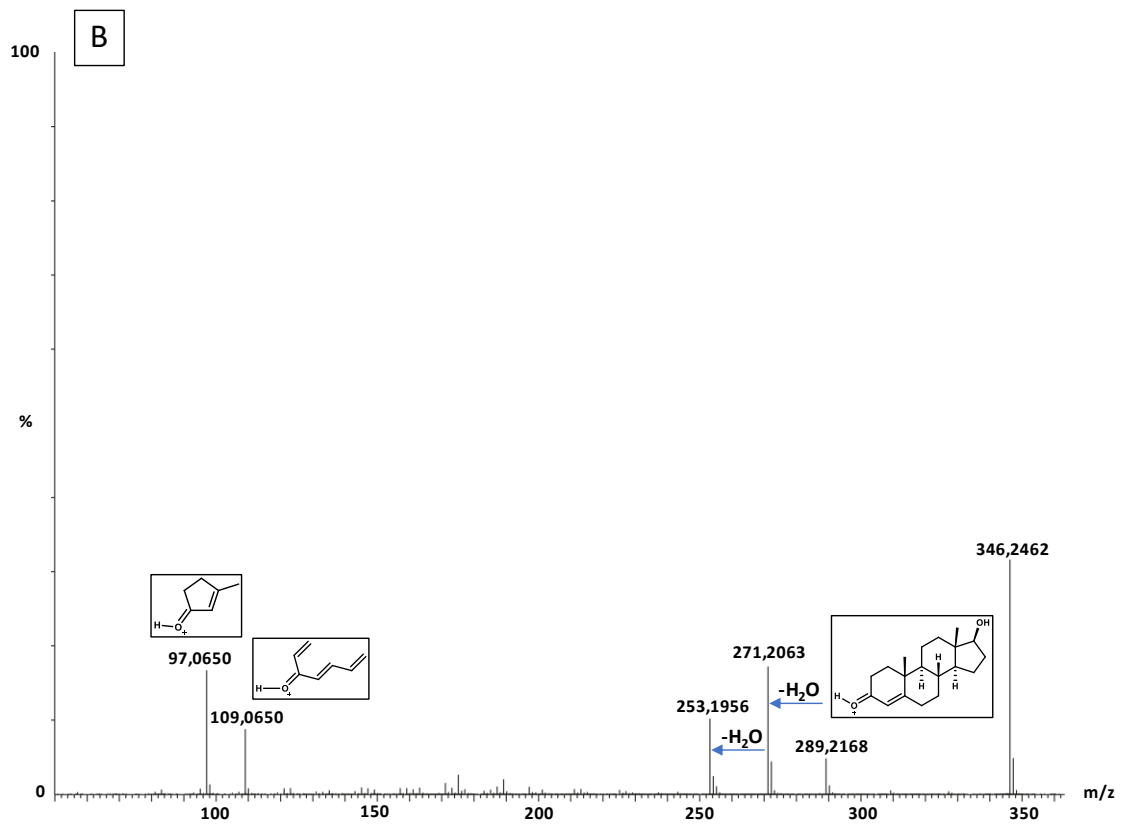


Figure 29 : A) Spectres de masse en electrospray positif (ESI<sup>+</sup>) de la formulation 3, dans du méthanol avec une tension de cône de 30V ; B) Fragmentation du pic 345,2428 correspondant au propionate de testostérone de A) enregistré avec une énergie de collision de 15V ; C) Fragmentation du pic 413,3054 correspondant au cypionate de testostérone de A) enregistré avec une énergie de collision de 15V.

Bien que la spectrométrie de masse ne soit pas quantitative dans les conditions dans lesquelles nous avons travaillé, elle permet de mettre en évidence la présence de cette association propionate et cypionate de testostérone dans les formulations 1, 3, 4, 6, 7, 9 et 10. Ces résultats confortent ceux obtenus par RMN du proton et correspondent à ceux que nous avons appelés « famille 2 » avec une légère différence pour la formulation 1 qui semble d'après la spectrométrie de masse contenir une faible quantité de cypionate de testostérone. La plus grande sensibilité de la spectrométrie de masse peut expliquer cette différence. La SM permet également d'associer les formulations 2 et 5 qui contiennent également du propionate et du cypionate de testostérone, mais aussi une quantité a priori non négligeable d'énanthate de testostérone.

Les espèces étudiées étant très proches, nous pouvons faire l'hypothèse que leurs capacités à s'ioniser soit proches, si c'est bien le cas, la famille précédemment appelée « famille 1 » s'explique par la présence largement majoritaire de propionate de testostérone dans les formulations 11 et 12 et sa présence unique dans la formulation 8.

L'ensemble des stéroïdes détectés en spectrométrie de masse sont représentés en Figure 30 :

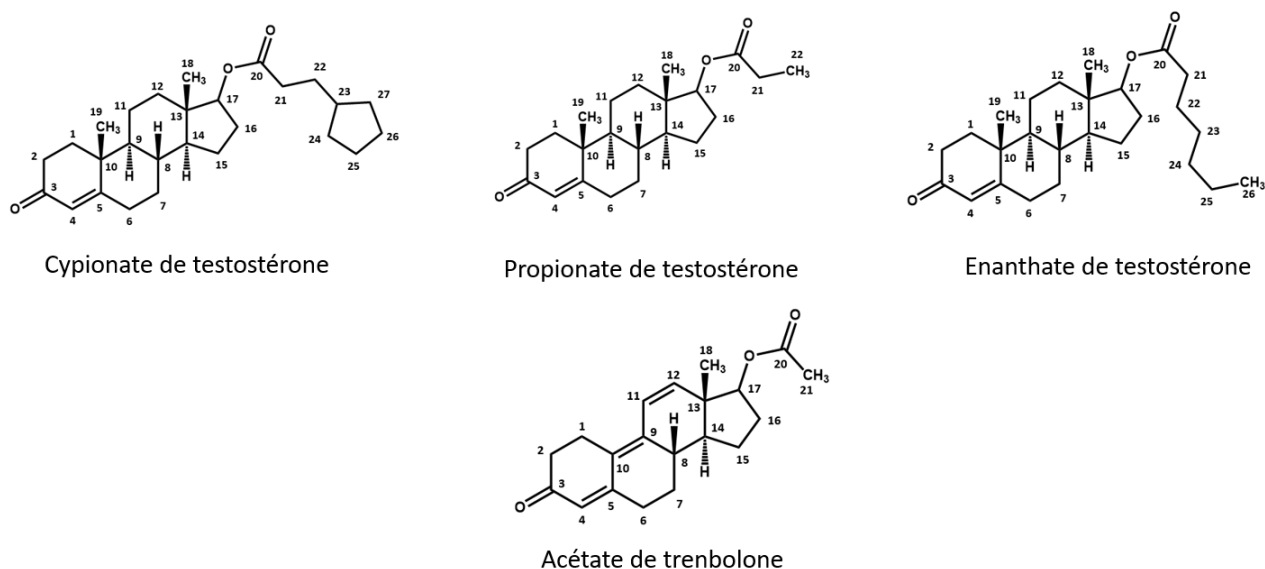


Figure 30 : Structures chimiques des substances détectées par spectrométrie de masse.

### 3.3.3 Analyses finales

#### 3.3.3.1 Attribution

Les résultats préliminaires étant en accord entre la RMN et la SM, nous avons décidé d'étudier la capacité de la RMN pour différencier ces substances. Dans un premier temps, nous avons réexaminé les analyses qualitatives menées dans le méthanol-d<sub>4</sub>, pour conclure quant à la non-conformité des

produits par rapport à leur étiquetage. Dans la Figure 31 le spectre de la formulation 3 : Super Bold (Figure 31A) est comparé à celui du produit annoncé (Figure 31B) et à celui de la testostérone elle-même (Figure 31C). Si dans la zone aliphatique, la présence en faible quantité d'acide gras dans la formulation ne permet pas de conclure, par contre l'analyse de la zone éthylénique allant sur cette figure de 5,50 ppm à 7,50 ppm permet d'écarter la présence d'undécylénate de boldénone dans cette formulation (Figure 31B vs Figure 31A).

D'autre part les esters de testostérone ont des signaux caractéristiques en RMN du proton, en particulier la présence d'un seul et unique signal éthylénique, ici à 5,71 ppm caractéristique du proton 4, associé à la présence de signaux correspondant à des groupements méthyles entre 0,70 et 1,30 ppm. De plus la présence d'un triplet à 1,11 ppm caractéristique du CH<sub>3</sub> terminal en position 23 du propionate de testostérone confirme bien la détection par spectrométrie de masse de ce composé. Pour le cyponate de testostérone au vu de la complexité de la zone aliphatique, aucun signal de permet sa mise en évidence par RMN du proton, étant donné que même les signaux correspondant à son proton éthylénique et à ses méthyles ont exactement les mêmes déplacements chimiques que son homologue propionate.

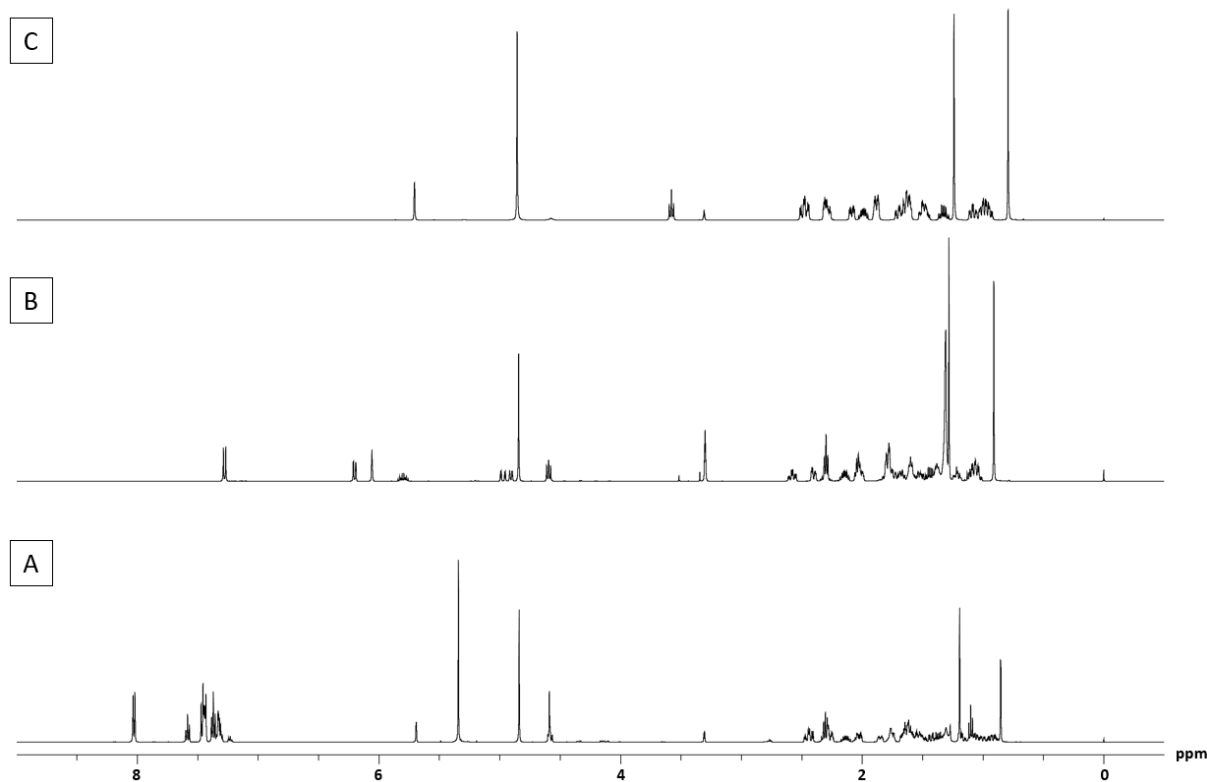


Figure 31 : Spectres RMN 1D <sup>1</sup>H (A) de la formulation 3 super bold (B) de la substance annoncée dans la formulation 3 : boldénone undécylénate et (C) de la testostérone, enregistrés dans du Méthanol-d<sub>4</sub>.

Bien que non montré ici, les problématiques rencontrées dans cette formulation se retrouvent également dans toutes les formulations analysées à l'exception de la formulation 8 ne contenant qu'un seul ester de testostérone.

Au vu de la difficulté à exploiter des spectres protons de tels mélanges, nous avons décidé de réaliser l'attribution complète de ces produits. Pour cela des expériences mono et bidimensionnelles classiques (e.g.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, et  $^{13}\text{C}$  Jmod) ont été réalisées.

A titre d'exemple sont présentées dans le Tableau 6 les attributions respectives des molécules détectées par spectrométrie de masse. Ces attributions mettent en évidence l'impossibilité de séparer distinctement ces molécules en RMN du proton, rendant impossible une quelconque quantification de chaque espèce en l'état. Par contre, la RMN du carbone permet de mettre en évidence le signal d'au moins un carbone caractéristique, qui ne sera ni recouvert par l'un des signaux des carbones de ses homologues structuraux, ni par l'un des signaux des carbones du corps gras (allant de 16,5 à 39,5 ppm dans la zone d'intérêt). Ces signaux sont mis en évidence en rouge dans le tableau d'attribution. En effet la gamme spectrale du carbone étant plus étendue que celle du proton, il est plus aisé d'isoler au moins un des signaux de chacun des esters, différenciant ces molécules.

Tableau 6 : Attribution RMN des substances détectés dans les différentes formulations.

Pos <sup>a</sup>	Group	Testostérone cypionate		Testostérone propionate		Testostérone énanthate		Trenbolone Acétate	
		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	CH2	2.08 & 1.69	38.4	2.09 & 1.69	38.5	2.07 & 1.69	38.8	2.82 & 2.89	26.9
2	CH2	2.48 & 2.31	35.5	2.49 & 2.28	35.6	2.475 & 2.28	35.9	2.44	39.2
3	C=O		204.0		204.0		204.2		203.7
4	CH	5.71	125.9	5.705	126.0	5.70	126.3	5.77	125.6
5	Cq		176.6		176.6		176.8		161.5
6	CH2	2.31 & 2.48	36.4	2.31 & 2.49	36.4	2.31 & 2.475	36.7	2.63	34.2
7	CH2	1.06 & 1.91	34.5	1.06 & 1.91	34.5	1.05 & 1.90	34.8	1.95 & 1.32	29.9
8	CH	1.70	38.3	1.70	38.4	1.70	38.6	2.51	40.5
9	CH	1.01	56.9	1.01	57.0	1.00	57.3		145.6
10	Cq		41.7		41.7		42.0		130.1
11	CH2	1.48 & 1.61	23.4	1.48 & 1.61	23.4	1.47 & 1.61	23.7	<b>6.55</b>	126.4
12	CH2	1.22 & 1.79	39.6	1.22 & 1.79	39.7	1.21 & 1.78	40.0	<b>6.42</b>	145.1
13	Cq		45.4		45.5		45.8		48.0
14	CH	1.12	53.2	1.12	53.3	1.11	53.6	1.57	50.8
15	CH2	1.70 & 1.43	26.1	1.70 & 1.41	26.1	1.69 & 1.41	26.4	1.78 & 1.56	25.8
16	CH2	2.17 & 1.54	30.2	2.17 & 1.54	30.3	2.15 & 1.53	30.6	2.26 & 1.63	30.2
17	CH	4.61	85.6	4.61	85.6	4.61	85.8	4.80	81.7
18	CH3	0.89	14.2	0.88	14.2	0.88	14.5	0.98	16.4
19	CH3	1.25	19.4	1.24	19.4	1.24	19.7		
20	C=O		177.4		178.0		177.5		174.6
21	CH2	2.33	36.4	2.33	30.3	2.31	37.3	2.07	22.6
22	CH2	1.62	34.2	1.11	<b>11.3</b>	1.60	28.2		
23	CH	1.79	<b>42.6</b>			1.31	34.7 & 31.9 & 25.6		
24	CH2	1.79 1.12	35.1 35.1			1.31	34.7 & 31.9 & 25.6		
25	CH2	1.71 & 1.54	27.8			1.31	34.7 & 31.9 & 25.6		
26	CH2	1.71 & 1.54	27.8			0.90	<b>16.4</b>		
27	CH2	1.79 1.12	35.1 35.1						
28									
29									
30									

### 3.3.3.2 Différenciation spectrale par RMN du carbone-13

Dans l'optique de différencier ces molécules par leurs carbones caractéristiques, nous avons décidé de tester sur un mélange de standards la potentielle séparation entre ces composés. La Figure 32 montre la possibilité d'isoler au moins un signal hors de la zone potentiellement affectée par les excipients détectés dans ces formulations. En effet, le propionate de testostérone comme montré dans Tableau 6 sera plus aisément séparable grâce à son carbone en position 22 résonnant à 11,3 ppm, le cypionate sera lui détectable grâce à son carbone 23 à 42,6 ppm et l'énanthate à 16,2 ppm avec son carbone 26.

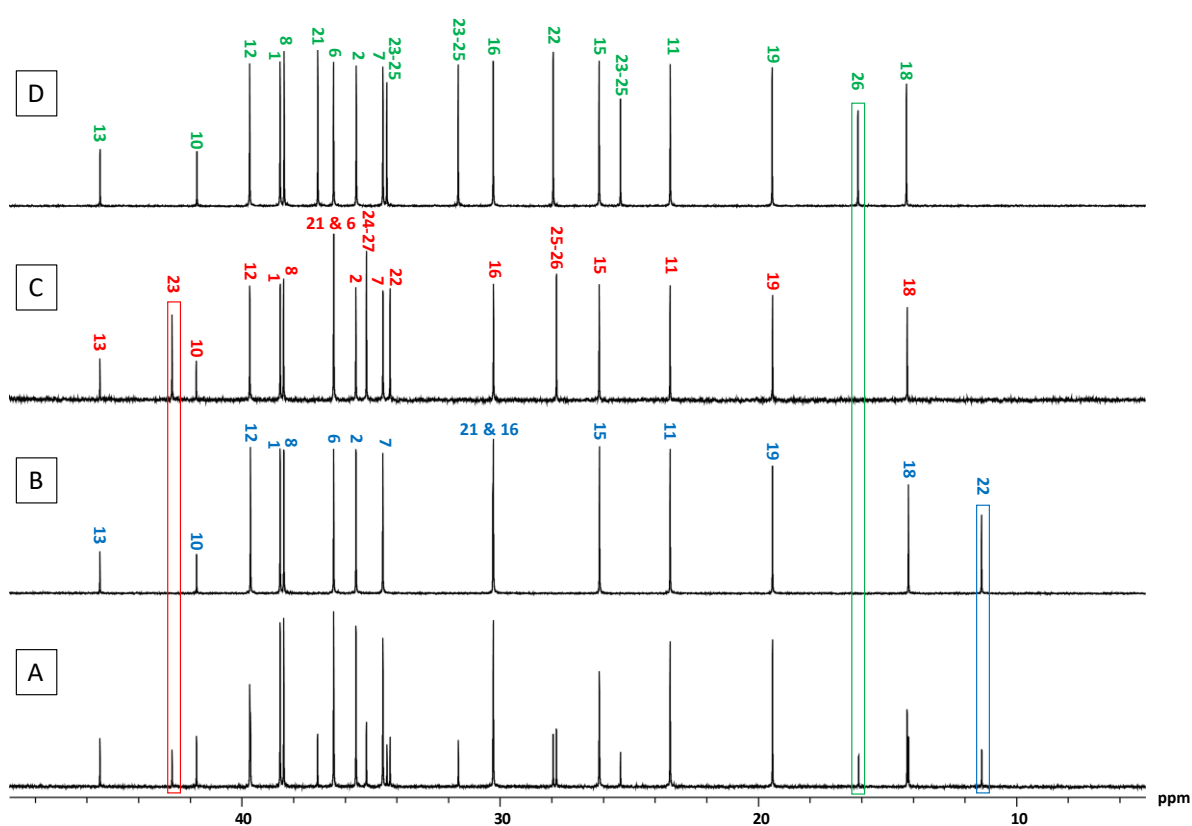


Figure 32 : Spectre RMN 1D  $^{13}\text{C}$  zoomé sur la région de 5 à 50 ppm (A) d'un mélange de standard de propionate, cypionate et énanthate de testostérone ; (B) de propionate de testostérone ; (C) de cypionate de testostérone et (D) d'énanthate de testostérone. Enregistrés dans du méthanol- $d_4$ .

Pour éviter divers effets associés à un mélange de ces composés, nous avons mélangé ces standards et le résultat donné en Figure 32A montre que même une fois en mélange, le signal de chacun des carbones d'intérêt reste observable isolément (signaux encadrés).

A noter que au vu de sa structure différente des autres, l'acétate de trenbolone retrouvé dans les formulations 11 et 12 pourra être quantifié en RMN du proton, il n'a pas nécessité de mise au point d'un protocole de détection ou de quantification en RMN du carbone-13.

### 3.3.3.3 Quantification

Une fois la capacité de différencier par RMN du carbone-13 chacun des esters détectés mise en évidence, nous avons mis en place un protocole de dosage de chacun des stéroïdes en solution. Cependant compte tenu de la faible abondance naturelle du carbone 13 (1,1%) et des temps de relaxation élevés des carbones étudiés, une optimisation expérimentale a été nécessaire, tant au niveau de la préparation des échantillons qu'au niveau des paramètres d'acquisition RMN.

#### 3.3.3.3.1 Mise au point de la préparation d'échantillon

Etant donné que les compositions détectées n'étaient pas du tout en accord avec les compositions attendues, nous n'avions aucune idée si les doses annoncées étaient elles aussi en accord ou pas avec celles annoncées. Pour pallier ce problème, différents tests ont été menés tout d'abord en RMN du proton pour éviter des temps d'acquisitions trop long. Afin d'évaluer la solubilité de nos produits, sachant que les standards sont fortement solubles ( $\approx 100$  mg/ml), différentes pesées sur nos formulations ont été réalisées allant de 50 à 200 mg. Nous avons étudié sur chacune de ces pesées la capacité de solubiliser les actifs en 1, 2, 3 ou 4 extractions avec 1mL de méthanol deutéré sachant que l'huile n'est pas 100% miscible. Il s'est avéré que pour une pesée de 50 mg en 2 extractions, nous étions capables de solubiliser la totalité des actifs présents. Fort de ce résultat, nous avons décidé de réaliser une analyse carbone-13 non quantitative du mélange, et déjà, les temps d'analyses nécessaires étaient très élevés ( $> 4$ h). De fait, sachant que l'extraction est l'étape la plus complexe, nous avons décidé de réaliser 2, 4 et 8 extractions en parallèle de la façon décrite précédemment. C'est-à-dire peser 2 fois, 4 fois ou 8 fois 50 mg qu'on extrait 2 fois consécutivement avec 1 mL de méthanol. Les fractions obtenues seront regroupées, évaporées à sec puis reprises dans 1 mL ou 2 mL de solvant deutéré. Au vu de la quantité de solvant nécessaire, nous avons alors travaillé en solvant non-deutééré puis les solutions ont été évaporées à sec et reprises en solvant deutéré. Finalement il s'est avéré que nous pouvions réaliser jusqu'à 4 extractions reprises dans 1 mL de solvant deutéré ou bien 8 dans 2 mL en continuant d'obtenir une réponse proportionnelle à celle réalisée avec seulement une seule extraction. De fait c'est ce mode d'extraction que nous avons utilisé pour réaliser le dosage en carbone-13. Ce protocole est résumé schématiquement dans la Figure 33.

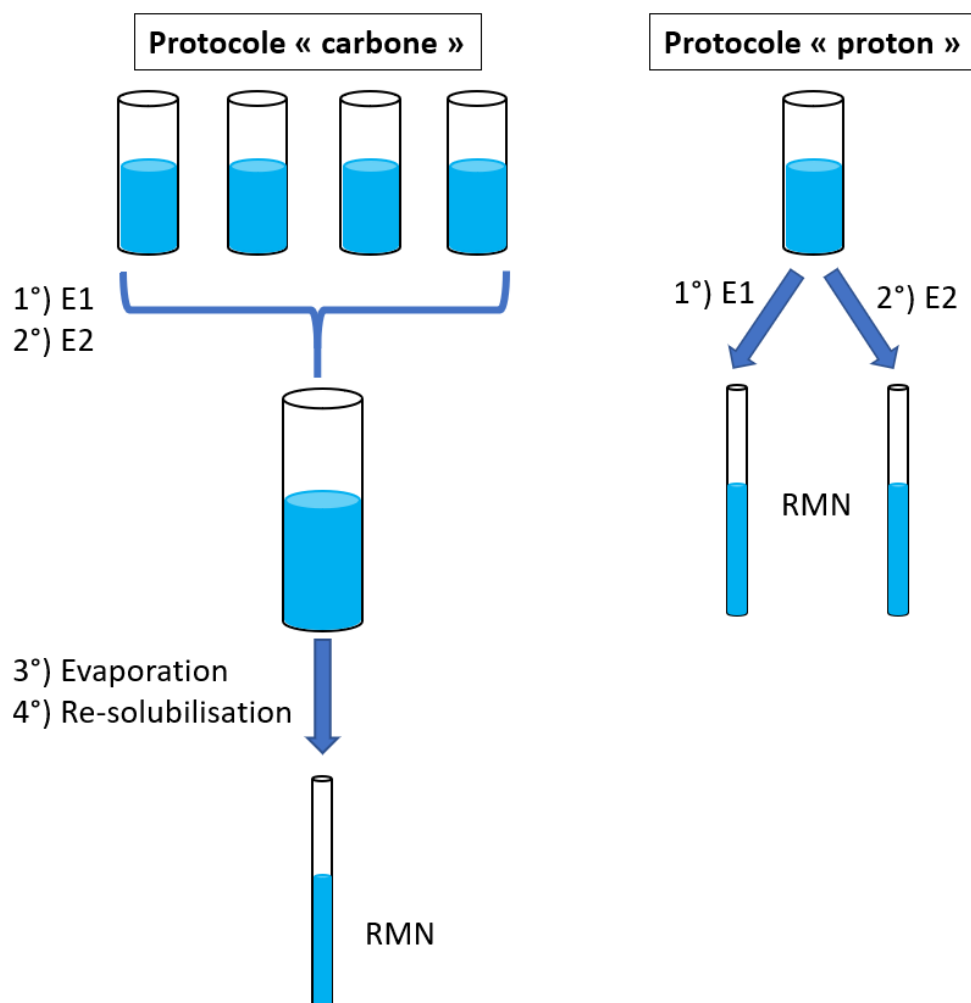


Figure 33 : Schématisation du protocole expérimental de préparation des échantillons, à gauche le protocole utilisé pour la quantification en RMN de carbone-13, à droite celui utilisé pour la quantification proton. E1 = extraction 1, E2 = extraction 2.

### 3.3.3.3.2 Adaptation des paramètres d'acquisition RMN

Une fois le protocole d'extraction mis en place, il a fallu mettre en place une expérience RMN quantitative, pour cela la première étape a été de choisir une référence interne, possédant les caractéristiques adéquates, c'est-à-dire n'interagissant pas avec nos produits, soluble dans le solvant choisi (ici du méthanol) et surtout n'induisant pas de recouvrement sur le spectre 1D  $^{13}\text{C}$ . Pour toutes ces raisons c'est le 1,3,5-trioxane qui a été choisi comme référence.<sup>42</sup> Cette référence de structure parfaitement symétrique donne un seul signal correspondant à 3 carbones équivalents résonnant à 96,3 ppm. Sa concentration dans le mélange a été établie de façon empirique, après un premier essai à une concentration connue, nous avons déterminé une concentration nécessaire d'environ 30 mM.

Dans l'optique de réaliser des manipulations dans des temps d'acquisition raisonnables, nous avons grâce une simple séquence d'inversion récupération mesuré les temps de relaxation des carbones des stéroïdes étudiés ainsi que celui de la référence. Ce dernier était donc le facteur limitant avec un temps



de relaxation d'environ 13,4 s alors que les temps de relaxations des carbones d'intérêts pour les stéroïdes ne dépassent pas 5 s.

Dans l'optique de réduire ces temps de relaxation, nous avons opté pour l'utilisation d'un agent relaxant. Nous avons choisi du Cr(acac)<sub>3</sub> (acétyl acétonate de chrome (III)), du fait de sa solubilité dans les solvant organiques, de son paramagnétisme et car il présentait un bon compromis entre l'élargissement induit par la réduction du temps de relaxation transversale et le gain de temps dû à la diminution de la relaxation longitudinale. Différentes concentrations de Cr(acac)<sub>3</sub> ont été testées allant de 0,5 mg / 700 µL (2 mM) jusqu'à 2,5 mg / 700 µL (10 mM) par pas de 0,5 mg. Il a alors été déterminé que l'ajout de 1,5 mg (6 mM) de Cr(acac)<sub>3</sub> était le meilleur compromis.

L'ajout d'une telle quantité d'agent relaxant a permis de réduire le temps de relaxation de notre signal de référence en solution à ≈ 3,1 s.

Les temps de relaxations mesurés sont résumés dans le Tableau 7.

*Tableau 7 : Récapitulatif des temps de relaxation (en secondes) mesurés, avec ou sans agent relaxant, dans du méthanol-d<sub>4</sub>. Standard : T1 mesurés sur les composés standards. Huiles : T1 de chaque actif mesuré dans les solutions injectables.*

Produit	Carbone	Déplacement chimique (ppm)	T1 (standard)	T1 (standard) + Cr(acac) <sub>3</sub>	T1 (Huile)	T1 (Huile) + Cr(acac) <sub>3</sub>
Trioxane	Équivalents	96,3	13,4	3,3	13,5	3,1
Testostérone Propionate	C22 (CH <sub>3</sub> )	11,3	4,3	1,9	4,2	2,0
Testostérone Cypionate	C23 (CH)	42,6	3,5	1,9	3,5	1,9
Testostérone Enanthate	C26 (CH <sub>3</sub> )	16,4	4,4	2,1	4,7	2,2

Pour l'acquisition des spectres RMN <sup>13</sup>C quantitatif, nous utiliserons une séquence de type zgig30 c'est-à-dire une séquence "inverse gated decoupling" avec le découplage proton réalisé uniquement pendant l'acquisition, afin de ne pas laisser le temps à l'effet NOE (Nuclear Overhauser Effect) de s'installer et de fait d'avoir une réponse uniforme quelle que soit la nature du carbone (primaire, secondaire, tertiaire, ou quaternaire). Pour éviter une durée trop longue pour chaque scan nous utiliserons un pulse de 30° permettant de compenser la perte d'information par le nombre de scans.

Connaissant les temps de relaxations mesurés, nous avons ensuite évalué les délais de relaxation nécessaires pour rendre nos expériences quantitatives. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser un délai total de relaxation ( $D1 + Aq$ ) supérieur à 5 fois le  $T1$  avec une impulsion  $90^\circ$ .

En utilisant la formule : 
$$Q = \frac{(1 - \exp(-\frac{RT}{T1}))}{(1 - (\exp(-\frac{RT}{T1})) * \cos \alpha)}$$

Avec  $RT = D1 + Aq$  ;  $\alpha$  angle de basculement de l'aimantation et  $Q$  le facteur de retour à l'équilibre.

Nous avons mesuré des délais nécessaires de 16,3 s pour un facteur de retour à l'équilibre de 99,81% avec un angle de basculement de l'aimantation de  $30^\circ$ . Il est important que le temps d'acquisition ne soit pas trop court pour ne pas tronquer le FID et donc induire des "wiggles" sur le spectre RMN. Différents temps d'acquisitions ont été évalués allant de 0,8 à 5 s et il s'est avéré qu'un temps d'acquisition de 2,8 s était suffisant pour un angle de basculement de l'aimantation de  $30^\circ$ . Ces conditions aboutissent sur une fenêtre spectrale (SW) de 280 ppm soit 140 036 Hz digitalisés en 196608 points (TD), soit chaque point enregistré en 14,2  $\mu$ s.

Le découplage était également un facteur important à prendre en compte, nous avons comme prérequis d'avoir un pulse homogène dans toute la zone considérée, c'est-à-dire d'environ 10 à 100 ppm. Afin d'éviter la perte d'information nous avons décidé d'évaluer l'influence de la fréquence porteuse. Pour cela une gamme de fréquences de porteuse a été évaluée. La fréquence porteuse retenue est de 59 ppm soit 29508 Hz. Un découplage de 80  $\mu$ s est appliqué à 12,4 dB assurant un découplage efficace sur la zone d'intérêt.

Afin d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant pour quantifier (ici  $\approx 30$ ) les spectres ont été enregistrés en 4 boucles de 218 scans (soit 872 scans) précédés de 8 scans factices (DS). Un temps total d'expérience de 4h est finalement atteint.

### 3.3.3.3.3 Résultats des analyses quantitatives

Une fois le protocole d'extraction et la séquence RMN optimisés, nous avons décidé de vérifier la conformité de nos résultats, pour cela nous avons utilisé la formulation 8, Super Shred ne contenant qu'un seul ester de testostérone et dont les résultats obtenus en RMN du carbone sont directement comparables à ceux de la RMN du proton. Pour cet exemple, une première quantification par RMN du proton menée dans les conditions décrites ci-avant (i.e 50 mg extrait 2 fois) donne une valeur de  $498 \pm 2$  mg. En comparaison de ce protocole, 2 autres protocoles ont été menés, le premier en utilisant le protocole « carbone » sur 2 jeux de pesées que l'on regroupe à la fin et que l'on reprend dans 2 mL de solvant deutéré. Les solutions seront redivisées en deux, l'une d'entre elle sera dosée avec une

quantification proton avec du TSP comme référence interne, et l'autre sera dosée avec le protocole carbone et du 1,3,5-trioxane comme référence interne. Dans le premier cas on obtient une valeur de 468 mg et dans le second 478 mg, soit une erreur de 2% dont on peut considérer qu'elle est dans l'erreur de la méthode.

Dans un second temps en utilisant le protocole « carbone », le même tube sera quantifié en proton en utilisant le 1,3,5-trioxane avant l'ajout de Cr(acac)<sub>3</sub> comme référence interne en RMN du proton puis après ajout de Cr(acac)<sub>3</sub> en RMN du carbone. Les valeurs obtenues sont respectivement 475 et 473 mg soit une erreur négligeable (< 0,5%).

Une remarque importante est néanmoins à souligner ici, après avoir réalisé le protocole « carbone », au moment de la ré-solubilisation il reste une goutte d'huile contenant une quantité variable d'actifs mais dont la quantité maximale n'excède jamais 5% de celle mesurée. Il est donc important de noter que toutes les valeurs données ici en dosage carbone peuvent être sous-estimé jusqu'à 5%.

Une fois le protocole contrôlé, toutes les expériences quantitatives ont été réalisées, tant en RMN du carbone qu'en RMN du proton. Pour la RMN du proton le protocole décrit précédemment, à savoir 2 extractions consécutives sur 50 mg d'huile a été utilisé.

Au vu de la différence importante de rapport signal sur bruit (30 en <sup>13</sup>C pour 250 en <sup>1</sup>H) le processing de spectres a également dû être optimisé. En effet, à cause de l'ajout de Cr(acac)<sub>3</sub> il était important d'appliquer un facteur d'apodisation, ici il a été choisi d'appliquer une multiplication exponentielle avec un facteur de 0,5. Pour éviter toute erreur humaine, l'intégration a elle été automatisée pour intégrer chaque pic d'intérêt sur 20 fois la largeur moyenne à mi-hauteur, soit ici 0,8 Hz \* 20 = 16Hz. De la façon suivante :

Trioxane: 96,353 – 96,226 ppm Cypionate: 42,662 – 42,534 ppm Propionate: 11,358 – 11,230 ppm Enanthate: 16,129 – 16,002 ppm

La ligne de base de base est corrigée de façon globale sur le spectre puis contrôlée sous chaque pic d'intérêt pour éviter d'éventuelles aberrations.

Les résultats finaux sont présentés dans le Tableau 8 :

Tableau 8 : Récapitulatif des produits détectés par SM et RMN et dosés par RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H.

Nom	Composition annoncé	Détection MS	Quantification <sup>13</sup> C (en mg/flacon) <sup>a</sup>	Quantification <sup>1</sup> H (en mg/flacon) <sup>a,b</sup>	Rapport des quantités mesurées par RMN <sup>13</sup> C et RMN <sup>1</sup> H
Super Ace	Acétate de trenbolone 120 mg/1 mL	Propionate de testostérone Cypionate de testostérone (ε)	557 ± 1 NQ	576 ± 8	96,8 %
Super Big	Enanthate de testostérone 150 mg/mL Cypionate de testostérone 150 mg/mL Décanoate de nandrolone 150 mg/mL	Enanthate de testostérone Cypionate de testostérone Propionate de testostérone (ε)	247 ± 7 246 ± 2 NQ	488 ± 10	101,0 %
Super Bold	Undécylénate de boldenone 250 mg/mL	Cypionate de testostérone Propionate de testostérone	643 ± 11 418 ± 22	1155 ± 32	92,0 %
Super Cyp	Cypionate de testostérone 300 mg/mL	Cypionate de testostérone Propionate de testostérone	611 ± 21 412 ± 16	1064 ± 5	96,2 %
Super Deca	Décanoate de nandrolone 300 mg/mL	Enanthate de testostérone Cypionate de testostérone Propionate de testostérone (ε)	581 ± 17 501 ± 16 NQ	1149 ± 14	94,2 %
Super Primo	Méthénolone 120 mg/mL	Cypionate de testostérone Propionate de testostérone	689 ± 37 411 ± 18	1138 ± 2	96,7 %
Super Prop	Propionate de testostérone 120 mg/mL	Cypionate de testostérone Propionate de testostérone	623 ± 27 412 ± 18	1187 ± 1	96,3%
Super Shred	Propionate de testostérone 100 mg/mL Acétate de trenbolone 100 mg/mL Propionate de drostanolone 100 mg/mL	Propionate de testostérone	486 ± 5	498 ± 2	97,6 %
Super Sust	Propionate de testostérone 60 mg/mL Enanthate de testostérone 120 mg/mL Cypionate de testostérone 120 mg/mL	Cypionate de testostérone Propionate de testostérone	710 ± 3 434 ± 12	1140 ± 22	100,4 %
Super Test	Enanthate de testostérone 300 mg/mL	Cypionate de testostérone Propionate de testostérone	686 ± 35 473 ± 25	1209 ± 11	96,0 %
Super Tri007	Enanthate de testostérone 75 mg/mL Acétate de trenbolone 75 mg/mL Hexahydro-benzylcarbonate de trenbolone 75 mg/mL	Propionate de testostérone Cypionate de testostérone Acétate de trenbolone (ε)	341 ± 19 NQ X	351 ± 4	97,0 %
Super Tri008	Enanthate de testostérone 75 mg/mL Acétate de trenbolone 75 mg/mL Hexahydro-benzylcarbonate de trenbolone 75 mg/mL	Propionate de testostérone Acétate de trenbolone (ε)	479 ± 7 X	533 ± 4 X	90,0 %

<sup>a</sup> chaque flacon est annoncé d'une contenance de 10 mL.

<sup>b</sup> les quantifications proton ont été calculées en utilisant un poids moléculaire pondéré, déterminé grâce aux quantifications carbones

.Ce tableau met en évidence la bonne concordance entre les résultats des quantifications par RMN du carbone-13 et RMN du proton. Cela démontre que le protocole de quantification que nous avons proposé en RMN du carbone-13 permet de détecter et quantifier sélectivement les stéroïdes avec un taux de récupération satisfaisant à condition qu'ils soient présents en concentration suffisante. Ce tableau met également en évidence la prépondérance de l'utilisation de propionate et de cypionate de testostérone, au dépendant de l'ensemble des esters de stéroïdes annoncés, sûrement pour des raisons financières.

### 3.3.4 Bilan et Conclusion

Au vu des résultats présentés dans le Tableau 8, aucune des formulations vendues ne contenait les actifs initialement annoncés, mais elles contiennent toutes au moins un stéroïde anabolisant.

Il est évident que le mauvais étiquetage des flacons constitue un danger supplémentaire pour le consommateur qui, même s'il consomme volontairement de tels produits illicites et potentiellement dangereux pour sa santé, s'expose dans ce cas également à des risques de potentiels surdosages principalement dans le cas où il prendrait ces substances sous la forme de cure.

La majorité des articles scientifiques reportés jusqu'alors sont centrés sur le développement de techniques analytiques pour la détection de stéroïdes anabolisants et leurs métabolites dans des matrices biologiques.<sup>43-48</sup> Ces développements se font cette fois encore via des techniques chromatographiques -liquide ou gazeuses- associées à divers modes de détection. Ces développements ne se focalisent plus uniquement sur les substances *in vivo* et la recherche de traces mais également dans les matrices pharmaceutiques/alimentaires comme nous l'avons évoqué précédemment.<sup>26, 28-31, 49-50</sup> Cependant depuis que des études ont montré que les solutions injectables de stéroïdes anabolisants procurent une meilleure biodisponibilité et un effet plus durables, peu d'études se sont consacrées à l'analyse de solutions injectables formulées dans des corps gras. On recense quand même quelques publications ayant analysé un grand nombre de préparations dont certaines formulations injectables,<sup>26, 29, 51-52</sup> alors que d'autres se focalisent uniquement sur l'étude de formulations injectables.<sup>53-54</sup> En accord avec nos résultats ces études préconisent l'utilisation d'alcool pour solubiliser les solutions injectables. Dans la publication de Ribeiro,<sup>32</sup> qui est une des seules publications s'intéressant à la problématique discutée par RMN, les auteurs utilisent du chloroforme permettant une bonne solubilisation de l'ensemble mais ne permettant pas une caractérisation univoque des formulations huileuses. De fait la méthodologie développée ici, bien que présentant des limites liées à l'abondance naturelle du carbone-13 et à une extraction relativement chronophage, semble être une piste intéressante à explorer. L'avantage de la méthode RMN développée est de ne

pas nécessiter de disposer des standards spécifiques, par contre cette approche ne peut pas en l'état actuel rivaliser avec les méthodes de références permettant de détecter et de quantifier ce type de substances en une dizaine de minutes contre 4h dans notre cas. Les gains en sensibilité de la RMN associées aux transferts de polarisations pourraient cependant devenir des outils extrêmement utiles pour ce genre de problématique.

### 3.4 Conclusion sur l'analyse de produits pour sportifs

Ce chapitre a permis de mettre en œuvre et de développer des approches par RMN originales pour l'analyse de compléments alimentaires et de produits dopants. Nous avons évalué les avantages et limites de cette approche RMN qui est à ce jour encore peu exploitée mais qui peut être tout à fait pertinente dans une étape de screening d'échantillons inconnus. Dans la première partie de ce chapitre nous avons vu que la RMN n'a rien à envier aux autres techniques, étant donné qu'elle apporte des informations régulièrement inatteignables par n'importe quelle autre technique analytique dans des temps d'analyses tout à fait pertinent avec des analyses à flux tendu. Dans une seconde partie, nous avons vu que la RMN peut s'adapter pour des problématiques plus complexes au travers de la diversité des analyses qu'elle permet, cependant à l'heure actuelle dans certaines problématiques spécifiques comme celle des solutions injectables, la RMN bien qu'un outil de screening satisfaisant ne peut pas encore concurrencer les méthodes de référence.

## 3.5 Matériels et méthodes

### 3.5.1 Produits chimiques

#### 3.5.1.1 Produits standards

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique et ont été achetés chez des fournisseurs de référence, à savoir Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA), Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, États-Unis) ou Acros organics (New Jersey, USA). Les deux références internes utilisées, le sodium 2,2,3,3-tétradeutéro-3-triméthylsilyl-propionate (TSP) et 1,3,5-trioxane ont été achetées spécifiquement chez Sigma-Aldrich, tout comme l'agent relaxant l'acétyl acétonate de chrome (III) Cr(acac)<sub>3</sub>. Le standard d'oxilofrine n'étant pas disponible commercialement quand le travail a été réalisé, la molécule a été purifiée à partir de la formulation 16. Les conditions de sa purification seront données en section 3.5.5. Les solvants deutérés utilisés (DMSO-d<sub>6</sub>, méthanol-d<sub>4</sub>, acétonitrile-d<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O, chloroforme-d) sont tous annoncés avec un enrichissement isotopique supérieur à 99,8% et proviennent des laboratoires eurisotop. Les solvants non deutérés utilisés, sont tous de qualité HPLC avec une pureté supérieure à 99,8% et proviennent de Sigma Aldrich.

#### 3.5.1.2 Les compléments alimentaires.

Comme indiqué dans la partie introductive de ce chapitre les échantillons proviennent de deux sources principales, une première partie nous a été fournie par les douanes françaises à la suite d'une saisie judiciaire de grande ampleur, l'autre partie provient de différents sites internet choisis de façon aléatoires et listés ci-après pour une collaboration avec le centre anti-dopage de Varsovie en Pologne. La répartition de ces échantillons se présente comme suit dans le Tableau 9. Parmi ces échantillons, dix se présentent sous forme de poudres (5, 7, 11, 16, 17, 19, 20, 23, 26, 28), 23 sous forme de gélules (1-4, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 22, 24, 25, 27, 30, 34, 41, 42, 47, 48, 56-58), 18 sous forme de comprimés (6, 13, 18, 21, 29, 32, 33, 36-39, 43, 45, 46, 49-51, 55) et 7 sont formulés dans une huile (31, 35, 40, 44, 52-54) entièrement miscible dans le méthanol.

Tableau 9 : Provenance des échantillons étudiés.

	Provenance des douanes française	Collaborations avec le Centre anti-dopage de Varsovie
Formulations	5, 13, 21, 29, 31-33, 35-37, 40-48, 50-55	1-4, 6-12, 14-20, 22-28, 30, 34, 38-39, 49, 56-58

Sites internet utilisés pour les achats de certaines formulations :

<https://www.predatornutrition.com/> ; <https://www.strongsupplements.com/> ; <http://www.pro-hormones.co.uk/> ; <https://www.bodypak.pl/pl/> ; <http://unclez.ru/> ; <https://www.bodybuildingwarehouse.co.uk/> ; <https://www.healthmonthly.co.uk/> ; <https://www.amazon.fr>

L'ensemble des formulations injectables proviennent de la saisie judiciaire précédemment évoquée.

## 3.5.2 Expériences RMN

### 3.5.2.1 Préparation des formulations 1 à 58

Pour l'analyse qualitative environ 100 mg de poudre/huile, du contenu de la gélule, ou du comprimé broyé exactement pesés, ont été mélangés avec 1 mL de solvant deutéré. En fonction des cas ou des besoins, différents solvants ont été utilisés, à savoir ici du méthanol-d<sub>4</sub>, un mélange CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20 v/v) et/ou du D<sub>2</sub>O pur. La solution a été placée sous agitation vortex pendant 15 s puis dans un bain à ultrason pendant 5 min. La suspension a ensuite été centrifugée pendant 5 min à 3000 tours/min. 700 µL de la solution surnageante ont été prélevés et mélangés avec 65 µL d'une solution de sodium 2,2,3,3-tétradeutéro-3-(triméthylsilyl) propanoate (TSP : référence interne de déplacement chimique) préparé à 10 mM. La solution résultante est homogénéisée sous vortex puis placée dans un tube RMN 5 mm (Eurisotop, cambridge Isotope laboratories). Le tube RMN est ensuite placé au réfrigérateur (4°C) jusqu'à l'analyse. Pour les solutions ayant fait l'objet d'un ajout de standard, les pH ont été réajustés à l'aide d'une solution de DCl diluée 20 fois (i.e. : 0,6 M) et d'une solution de NaOD elle aussi diluée 20 fois (0,7 M), l'évolution du pH a été suivie à l'aide d'un pH-mètre jusqu'à l'obtention du pH choisi, ici 6,50. A noter qu'ici on résonne en fait en « potentiel deutérium » ou pH<sub>lu</sub>, on approximera qu'à température ambiante  $pH = pD - 0,43 = pH(lu) - 0,43$ .

Pour l'analyse quantitative une quantité variable de 5 à 50 mg (adaptée en fonction de la solubilité de l'actif quantifié) de poudre/huile, du contenu de la gélule, ou du comprimé pilé a été exactement pesée puis dissoute dans 1 ou 2 mL (uniquement pour les formulations 38 et 58) de solvant deutéré. Le solvant choisi pour la quantification dépendant de la solubilité annoncée/observée, une répartition des solvants utilisés par formulation est donnée dans Tableau 10 ci-après, et sera soit du méthanol-d<sub>4</sub>, soit un mélange CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20 v/v), du D<sub>2</sub>O pur ou bien du DMSO-d<sub>6</sub>. Dans chaque cas, la solution obtenue est placée sous vortex 15 s, sous sonication 10 min puis sous agitation magnétique pendant 20 min. La solution obtenue est centrifugée pendant 5 min à 3000 tours/min. 800µL de la solution résultante sont prélevés et 30 µL d'une solution de TSP (ici référence interne de quantification) 5 mM sont ajoutés. La solution ainsi obtenue est homogénéisée sous vortex pendant 15 s et placée en tube RMN. Le tube RMN est ensuite placé au réfrigérateur (4°C) jusqu'à l'analyse.



A noter que les formulations 31, 35, 40, 44, 52, 52, 53 et 54 étaient des formulations huileuses, cependant au vu de leurs complètes miscibilités avec le solvant choisi (méthanol-d<sub>4</sub>), elles ont été analysées en suivant le protocole décrit ci-dessus, à l'exception qu'elles n'ont pas été soumises à l'agitation magnétique.

Tableau 10 : Répartition des formulations étudiées en fonction de leur solvant de quantification.

Solvant de quantification	Méthanol-d <sub>4</sub>	CD <sub>3</sub> CN:D <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O	DMSO-d <sub>6</sub>
Formulation	6, 7, 11-13, 21, 29-31, 34, 35, 37, 39-50, 52-53, 56, 57, 58	5, 32	2, 3, 4, 6-9, 11, 12, 16, 20, 22, 23, 25-28, 42	33, 38, 51, 55, 58

A noter également que les formulations 1, 4, 10, 14, 15, 17, 18, 19, 24, 25, 26 et 36, ne contenant pas d'actifs, ou d'association d'actifs illicites, n'ont pas été quantifiées, et que certaines formulations ont été quantifiées dans 2 solvants différents étant donné la diversité des substances détectées.

### 3.5.2.2 Préparation des solutions injectables

Pour l'analyse qualitative des solutions injectables, 150 mg (soit environ 200 µL) ont été prélevés et repris dans 1 mL de méthanol deutéré, la solution a été mise sous vortex pendant 15 s puis soniquée pendant 5 min. La suspension a été centrifugée pendant 5 min à 3000 tours/min. 700 µL de la solution surnageante ont été prélevés et mélangés avec 65 µL d'une solution de TSP à 10 mM. La solution résultante est homogénéisée sous vortex puis placée dans un tube RMN 5 mm qui est placé au réfrigérateur (4°C) jusqu'à l'analyse.

Pour l'analyse quantitative en RMN du proton, environ 50 mg d'huiles exactement pesés dans un tube à hémolyse ont été extraits une première fois dans 1 mL de Méthanol-d<sub>4</sub>. L'extraction consiste en 15 s de vortex et 10 min de sonication. La solution résultante est centrifugée pendant 5 min à 3000 tours/min. 800 µL de la solution résultante sont prélevés et 100 µL d'une solution de TSP (ici référence interne de quantification) 5 mM sont ajoutés. La solution ainsi obtenue est homogénéisée sous vortex pendant 15 s et placée en tube RMN. La solution résiduelle est à nouveau extraite avec 1 mL de méthanol deutéré et placé en tube exactement comme la première extraction.

La quantité totale de produit sera calculée en tenant compte du protocole de ces deux extractions successives.

Pour l'analyse quantitative en carbone, 4 pesées de 50 mg sont réalisées en parallèles. Dans chacune d'entre elles, on réalise une première extraction avec 1 mL de méthanol non deutéré. L'extraction consiste en 15 s de vortex et 10 min de sonication. La solution résultante est centrifugée pendant 5 min à 3000 tours/min. 800 µL de chacune de ces premières extractions sont prélevés et réunis dans un tube à essai. Les culots résiduels sont ré-extraits exactement de la même manière que précédemment avec 1 mL de méthanol non deutéré. 1 mL de la solution centrifugée sera prélevé et ajouté dans le même tube à essai que précédemment. Finalement les 4 culots résiduels seront réunis et ré-extraits avec le solvant résiduel. Après centrifugation le maximum de la solution surnageante (environ 700 µL) est prélevé et ajouté dans le tube à essai.

La solution contenue dans le tube à essai est ensuite évaporée à sec et repris dans 1 mL de Méthanol- $d_4$ . 900 µL de cette solution sont prélevés et mélangés avec 50 µL d'une solution de 1,3,5-trioxane à 30 mM pour l'analyse RMN.

### 3.5.2.3 Enregistrement des spectres

Les expériences RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance I 500 MHz équipé d'une cryo-sonde TCI (triple résonance inverse) 5 mm ou sur un spectromètre Bruker avance I 400 MHz équipé d'une sonde directe TBO 5 mm (triple broadband observe) utilisée pour la détection proton ou d'une sonde TXO 5 mm spécifique à la détection fluor. Les deux spectromètres étaient équipés d'un passeur d'échantillon automatisé. Les spectres sont enregistrés à 298 K en utilisant le logiciel Topspin, permettant entre autres de contrôler le passeur d'échantillon via le logiciel IconNMR.

Pour l'enregistrement des spectres RMN proton en conditions qualitatives, les paramètres utilisés sont les suivants :

- Temps d'acquisition (AQ) : 2,04 s
- Délai de relaxation (D1) : 1,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : 8012 Hz soit 16 ppm
- Taille du FID (TD) : 32 768
- Nombre d'accumulation (NS) : [16-160] dépend de la concentration de l'échantillon étudié, permettant l'obtention d'un rapport signal sur bruit supérieur à 3.
- Durée d'impulsion (P90) : varie entre 8,25 et 15,1 µs (selon l'échantillon, et le solvant utilisé) permettant un angle de basculement de l'aimantation d'environ 90°.

Le signal du TSP est calibré à 0 ppm et utilisé comme référence interne de déplacement chimique.

Pour les expériences quantitatives, le temps d'acquisition est augmenté à 4,09 s et le délai de relaxation est augmenté de 5,91 à 10,00 s. L'angle de basculement lui, est diminué entre 2,48 et 4,53 µs, correspondant à un angle de basculement de l'aimantation de 30°. Le nombre d'accumulation est

fixé entre 64 et 500 permettant l'obtention d'un rapport signal sur bruit propice à la quantification (i.e. > 10). Les temps de relaxation (T1) sont évalués grâce à une séquence d'inversion récupération faisant varier les délais d'inversion de 0,001 à 40 s en 21 acquisitions, permettant de conclure à un taux de recouvrement supérieur à 97,5 % dans l'ensemble des cas étudiés.

Pour les expériences quantitatives, en plus d'être une référence de déplacement chimique, le TSP est ici utilisé comme référence interne de quantification.

Pour les expériences RMN du fluor réalisées sur les formulations 41, 42, 47 et 48 les paramètres d'acquisitions utilisés sont les suivants :

- Temps d'acquisition (AQ) : 1,15 s
- Délai de relaxation (D1) : 1,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : 56818 Hz soit 151 ppm
- Taille du FID (TD) : 131 072
- Nombre d'accumulation (NS) : 300
- Durée d'impulsion (P90) : 13,6  $\mu$ s.

Dans le cas des expériences en RMN du fluor, le 4,4' bifluorodiphényle est utilisé comme référence de déplacement chimique et calibré à -117,55 ppm.

Pour réaliser l'attribution complète des molécules étudiées, une série d'expériences bi-dimensionnelles ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) et mono dimensionnelle carbone ( $^{13}\text{C}$  J-Mod) ont été réalisées. Les expériences ont été enregistrées avec les paramètres suivants :

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY :

- Délai de relaxation (D1) : 1,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : (F2) \* (F1) = 7000 Hz \* 7000 Hz
- Taille du FID (TD) : (F2) \* (F1) = 512 \* 2048
- Nombre d'accumulation (NS) : [2-8]
- Durée d'impulsion (P90) : 8,25-15,10  $\mu$ s.

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

- Délai de relaxation (D1) : 2,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : (F2) \* (F1) = 30184 Hz \* 7000 Hz
- Taille du FID (TD) : (F2) \* (F1) = 1024 \* 256
- Nombre d'accumulation (NS) : [2-32]
- Durée d'impulsion (P90) : 8,25-15,10  $\mu$ s
- Découplage carbone à l'acquisition via un GARP-4 : pendant 65  $\mu$ s à 11,4 dB
- Valeur de couplage  $^1\text{J}_{\text{H-C}}$  fixée à 145 Hz.

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

- Délai de relaxation (D1) : 2,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : (F2) \* (F1) = 30184 Hz \* 7000 Hz
- Taille du FID (TD) : (F2) \* (F1) = 2048 \* 256
- Nombre d'accumulation (NS) : [4-64]

- Durée d'impulsion (P90) : 8,25-15,10  $\mu$ s.
- Valeur de couplage  $^1J_{H-C}$  fixée à 145 Hz, et CNST-13 fixé à 3 Hz ( $^4J_{H-C}$ ) et/ou 8 Hz ( $^3J_{H-C}$ ).

### $^{13}C$ J-Mod

- Temps d'acquisition (AQ) : 0,9 s
- Délai de relaxation (D1) : 2,5 s
- Fenêtre spectrale (SW) : 30184 Hz soit 16 ppm
- Taille du FID (TD) : 65 536
- Nombre d'accumulation (NS) : 256 ; nombre de boucle (TD0) : [1-64] portant le nombre de scan de 256-16384 scans.
- Durée d'impulsion (P90) : 15,7
- Découplage proton via un WALT16 pendant 80  $\mu$ s à 12,4 dB.

Pour réaliser l'attribution de la formulation 5 une séquence  $^1H$ - $^1H$  NOESY et une séquence  $^1H$ - $^1H$  TOCSY permettant de voir les couplages dipolaires et scalaires longue distances ont été utilisées. Ces expériences ont été enregistrées avec les paramètres suivants :

### $^1H$ - $^1H$ NOESY

- Délai de relaxation (D1) : 2,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : (F2) \* (F1) : 7000 Hz \* 7000 Hz
- Taille du FID (TD) : (F2) \* (F1) : 256 \* 2048
- Nombre d'accumulation (NS) : 32
- Durée d'impulsion (P90) : 11,14  $\mu$ s
- Temps de mélange : 0,15 s

### $^1H$ - $^1H$ TOCSY

- Délai de relaxation (D1) : 3,00 s
- Fenêtre spectrale (SW) : (F2) \* (F1) : 7000 Hz \* 7000 Hz
- Taille du FID (TD) : (F2) \* (F1) : 256 \* 4096
- Nombre d'accumulation (NS) : 16
- Durée d'impulsion (P90) : 11,14  $\mu$ s
- Spin lock : 0,12 s

Pour la quantification en carbone  $^{13}C$ , les paramètres optimisés et explicités dans la partie référente son repris et résumé ici :

### $^{13}C$ zgig30

- Temps d'acquisition (AQ) : 2,80 s
- Délai de relaxation (D1) : 13,50 s
- Fenêtre spectrale (SW) : 35211 Hz soit 280 ppm
- Fréquence de la porteuse : 59 ppm
- Taille du FID (TD) : 196 608
- Nombre d'accumulation (NS) : 218 ; nombre de boucle (TD0) : 4 portant le nombre de scans à 872. Soit 4h00 d'expérience
- Durée d'impulsion (P90) : 15,7  $\mu$ s
- Découplage proton via un WALT-16 pendant 80  $\mu$ s à 12,4 dB.

### 3.5.3 Spectrométrie de masse

Les échantillons sont dissous dans un mélange acétonitrile-H<sub>2</sub>O (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 80:20 v/v) et analysés sur un appareil de marque Waters (Manchester, UK) modèle XEVO G2, en introduction directe. L'injection est réalisée à la vitesse de 0,15 mL/min dans un mélange de solvant acétonitrile : HCOOH<sub>(aq)</sub> 0,1% dans les mêmes proportions que le mélange utilisé pour la dissolution. La mesure a été réalisée avec une source ionisante par électrospray (Electrospray : ESI) permettant une ionisation positive ou négative. Deux analyseurs quadripolaires associés à un analyseur à temps de vol (Q-Tof) permettent l'obtention de résultats en haute résolution (10<sup>-4</sup> uma). Pour ces derniers, une calibration est effectuée au formate de sodium, qui, grâce aux différents clusters de m/z tabulé qu'il forme, permet une calibration multipoints entre m/z=100 et m/z=1200 (environ 100 unités de masse entre chaque point). Les spectres haute résolution sont enregistrés avec une référence interne qui permet d'ajuster l'origine des unités de masse en temps réel grâce à un acide aminé de fragmentation connue et tabulée : la leucine enképhaline ([M + H]<sup>+</sup> : m/z=556,2771).

Pendant toute les analyses les paramètres expérimentaux sont réglés comme suit :

Température de désolvatation : 350°C, débit du gaz de désolvatation : 1100 L.h<sup>-1</sup> tension de cône 10 et/ou 30 V, débit d'air dans le cône pour éviter les agrégats : 50 L.h<sup>-1</sup> température de la source ionisante : 110°C, fenêtre d'observation [100-1200] uma.

Pour l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, la tension de cône est maintenue à 30 V et 3 énergies de collisions différentes sont appliquées dans la chambre de collision, à savoir 15, 25 et 35 V, dans une fenêtre d'observation allant de 50 à 2000 uma.

### 3.5.4 Chromatographie

Pour obtenir le produit pur d'oxilofrine l'échantillon correspondant à la formulation 16 a été purifié dans les conditions génériques explicitées ci-après :

#### 3.5.4.1.1 Mise au point analytique

Pour mettre au point les conditions analytiques 3 gélules de la formulation 16 ont été dissoutes dans 6 mL d'un mélange acétonitrile-H<sub>2</sub>O (80-20 v-v). Nous avons travaillé sur une UPLC Waters Acquity muni d'un double mode de détection PDA MS simple quadripôle (mass spectrometry).

La colonne utilisée est une colonne Acquity BEH (Bridged Ethylene Hybrid) en phase inverse C18, avec une granulométrie de 1,7 µm et des dimensions de (2,1\*100) mm.

Un mélange binaire homogène de solvant MeOH (+0.1% HCOOH) [A] et H<sub>2</sub>O (+0,1 % HCOOH) [B] a été utilisé dans les conditions d'élution suivante avec un volume d'injection de 5 µL et un débit de 0,6 mL/min à une température d'analyse de 40°C.

Temps (min)	% [A] MeOH (+0,1% HCOOH)	% [B] H <sub>2</sub> O (+0,1 % HCOOH)
0	5	95
2	5	95
6	100	0
7,5	100	0
8	5	95

Les analyses ont été menées avec une détection UV à 254 nm et une détection de masse en electrospray positif avec une tension de cône fixée à 20V.

#### 3.5.4.1.2 Conditions de purification

Les conditions de chromatographie préparative ont été adaptées des conditions analytiques. Les analyses ont été menées sur un système d'auto-purification waters à pompe binaire 245 muni d'un collecteur de fraction 2767, équipé cette fois uniquement d'un détecteur UV. La colonne utilisée est une XBridge en phase inverse C18 avec une granulométrie de 5 µm et de dimension (19\*150) mm possédant la même chimie de colonne que la BEH utilisée en analytique. Le même mélange binaire de solvant que précédemment [A] et [B] a été utilisé selon les conditions d'élution présentés ci-après avec un volume d'injection de 1 mL et débit de 20,5 mL/min.

Temps (min)	% [A] MeOH (+0.1% HCOOH)	% [B] H <sub>2</sub> O (+0.1 % HCOOH)
0	5	95
2	5	95
12	100	0
14	100	0
14,5	5	95

Les analyses ont été menées à une température de 40°C avec une détection UV à 254 nm.

## 3.6 Références

1. WADA What is prohibited. <https://www.wada-ama.org/en/content/what-is-prohibited> (consulté le 15/08/2018).
2. Venhuis, B.; Keizers, P.; van Riel, A.; de Kaste, D., A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events. *Drug Test Anal* **2014**, *6* (6), 578-81.
3. Dexaprine XR. <http://www.dexaprine.org/xr> (consulté le 16/08/2018).
4. WikiStéro Dianabol. <https://wikistero.com/dianabol/> (consulté le 16/08/2018).
5. WikiStéro Anadrol. <https://wikistero.com/anadrol/> (consulté le 16/08/2018).
6. Thevis, M.; Makarov, A. A.; Horning, S.; Schänzer, W., Mass spectrometry of stanozolol and its analogues using electrospray ionization and collision-induced dissociation with quadrupole-linear ion trap and linear ion trap-orbitrap hybrid mass analyzers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19* (22), 3369-3378.
7. Guan, F.; Soma, L. R.; Luo, Y.; Uboh, C. E.; Peterman, S., Collision-induced dissociation pathways of anabolic steroids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2006**, *17* (4), 477-489.
8. Hatzieremia, S.; Kostomitsopoulos, N.; Balafas, V.; Tamvakopoulos, C., A liquid chromatographic/tandem mass spectroscopic method for quantification of the cyclic peptide melanotan-II. Plasma and brain tissue concentrations following administration in mice. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21* (15), 2431-8.
9. Zhao, J.; Wang, M.; Avula, B.; Khan, I. A., Detection and quantification of phenethylamines in sports dietary supplements by NMR approach. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *151*, 347-355.
10. Slezak, T.; Francis, P. S.; Anastos, N.; Barnett, N. W., Determination of synephrine in weight-loss products using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta* **2007**, *593* (1), 98-102.
11. Niemann, R. A.; Gay, M. L., Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 5630-5638.
12. Roman, M. C.; Betz, J. M.; Hildreth, J., Determination of synephrine in bitter orange raw materials, extracts, and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **2007**, *90* (1), 68-81.
13. Gay, M. L.; Niemann, R. A.; Musser, S. M., An isotopically labeled internal standard liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements. *Agricultural and food chemistry* **2006**, *54* (2), 286-291.
14. Gatti, R.; Lotti, C., Development and validation of a pre-column reversed phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of primary phenethylamines in dietary supplements and phytoextracts. *J Chromatogr A* **2011**, *1218* (28), 4468-73.
15. Marchei, E.; Pichini, S.; Pacifici, R.; Pellegrini, M.; Zuccaro, P., A rapid and simple procedure for the determination of synephrine in dietary supplements by gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2006**, *41* (4), 1468-72.
16. Avula, B.; Upparapalli, S. K.; Khan, I. A., Enantiomeric Separation of Adrenergic Amines in Citrus Species, Related Genera and Dietary Supplements by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* **2005**, *62* (3-4), 151-157.
17. B. Avula, I. A. K., Separation and Determination of Ephedrine Enantiomers and Synephrine by High Performance Capillary Electrophoresis in Dietary Supplements. *Chromatographia* **2004**, *59*, 71-77.

18. Pawar, R. S.; Grundel, E.; Fardin-Kia, A. R.; Rader, J. I., Determination of selected biogenic amines in *Acacia rigidula* plant materials and dietary supplements using LC-MS/MS methods. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *88*, 457-66.
19. Cohen, P. A.; Avula, B.; Venhuis, B.; Travis, J. C.; Wang, Y. H.; Khan, I. A., Pharmaceutical doses of the banned stimulant oxilofrine found in dietary supplements sold in the USA. *Drug Test Anal* **2017**, *9* (1), 135-142.
20. IFE Oestrogène, ménopause, obésité et cancer du sein. [http://acces.ens-yon.fr/acces/thematiques/sante/epidemiologie/cancersein/risq\\_cancer\\_sein/oestrog\\_menop\\_cancer\\_sein](http://acces.ens-yon.fr/acces/thematiques/sante/epidemiologie/cancersein/risq_cancer_sein/oestrog_menop_cancer_sein) (consulté le 16/08/2018).
21. Topsteroid Stéroïdes oraux. <http://top-steroids-online.com/steroides-oraux/> (consulté le 16/08/2018).
22. Winstrol steroïds. <https://winstrol-steroids.com/le-cycle-ideal-anavar-winstrol-6-conseils-de-professionnels/> (consulté le 16/08/2018).
23. Mohler, M. L.; Bohl, C. E.; Jones, A.; Coss, C. C.; Narayanan, R.; He, Y.; Hwang, D. J.; Dalton, J. T.; Miller, D. D., Nonsteroidal selective androgen receptor modulators (SARMs): dissociating the anabolic and androgenic activities of the androgen receptor for therapeutic benefit. *J Med Chem* **2009**, *52* (12), 3597-617.
24. FDA: FDA warns against using SARMs in body-building products. <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/fdainbrief/ucm583021.htm> (consulté le 16/08/2018).
25. Thevis, M.; Schanzer, W., Detection of SARMs in doping control analysis. *Mol Cell Endocrinol* **2018**, *464*, 34-45.
26. Thevis, M.; Schrader, Y.; Thomas, A.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Schänzer, W., Analysis of Confiscated Black Market Drugs Using Chromatographic and Mass Spectrometric Approaches. *Journal of Analytical Toxicology* **2008**, *32*, 232-240.
27. Odoardi, S.; Castrignano, E.; Martello, S.; Chiarotti, M.; Strano-Rossi, S., Determination of anabolic agents in dietary supplements by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2015**, *32* (5), 635-47.
28. Pellegrini, M.; Rotolo, M. C.; Di Giovannadrea, R.; Pacifici, R.; Pichini, S., A simple toxicological analysis of anabolic steroid preparations from the black market. *Annales de Toxicologie Analytique* **2012**, *24* (2), 67-72.
29. Cho, S. H.; Park, H. J.; Lee, J. H.; Do, J. A.; Heo, S.; Jo, J. H.; Cho, S., Determination of anabolic-androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *111*, 138-46.
30. Van Poucke, C.; Detavernier, C.; Van Cauwenberghe, R.; Van Peteghem, C., Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **2007**, *586* (1-2), 35-42.
31. Abbate, V.; Kicman, A. T.; Evans-Brown, M.; McVeigh, J.; Cowan, D. A.; Wilson, C.; Coles, S. J.; Walker, C. J., Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements - a significant risk to public health. *Drug Test Anal* **2015**, *7* (7), 609-18.
32. Ribeiro, M. V. d. M.; Boralle, N.; Pezza, H. R.; Pezza, L., Authenticity assessment of anabolic androgenic steroids in counterfeit drugs by <sup>1</sup>H NMR. *Analytical Methods* **2018**, *10* (10), 1140-1150.
33. Ribeiro, M. V. M.; Boralle, N.; Felipe, L. G.; Pezza, H. R.; Pezza, L., (<sup>1</sup>H) NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs. *Steroids* **2018**, *138*, 47-56.
34. Fabian, C. J., The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *Int J Clin Pract* **2007**, *61* (12), 2051-63.
35. Richard J., H.; Timothy R., C.; Chris D., M.; Raymond E., M., A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International Journal of Mass Spectrometry* **210**, 371-385.
36. Kellis Jr, J.; Vickery, L., Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* **1984**, *225* (4666), 1032-1034.



37. Ibrahim, A. R.; Abul-Hajj, Y. J., Aromatase inhibition by flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1990**, *37* (2), 257-60.
38. Jeong, H.-J.; Shin, Y. G.; Kim, I.-H.; Pezzuto, J. M., Inhibition of Aromatase Activity by Flavonoids. *Archives of pharmacal Research* **1999**, *22* (3), 309-312.
39. Saarinen, N.; Joshi, S. C.; Ahotupa, M.; Li, X.; Ämmälä, J.; Mäkelä, S.; Santti, R., No evidence for the in vivo activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *Steroid biochemistry & molecular biology* **2001**, *78*, 231-239.
40. EMA Benzyl alcohol and benzoic acid group used as excipients. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2017/10/WC500235920.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500235920.pdf) (consulté le 16/08/2018).
41. Nielen, M. W.; Lasaroms, J. J.; Mulder, P. P.; Van Hende, J.; van Rhijn, J. H.; Groot, M. J., Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2006**, *830* (1), 126-34.
42. Xia, Z.; Akim, L. G.; Argyropoulos, D. S., Quantitative <sup>13</sup>C NMR Analysis of Lignins with Internal Standards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (8), 3573-3578.
43. Mitrevski, B. S.; Wilairat, P.; Marriott, P. J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography improves separation and identification of anabolic agents in doping control. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (1), 127-35.
44. Liu, W.; Zhang, L.; Fan, L.; Lin, Z.; Cai, Y.; Wei, Z.; Chen, G., An improved hollow fiber solvent-stir bar microextraction for the preconcentration of anabolic steroids in biological matrix with determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2012**, *1233*, 1-7.
45. Cuervo, D.; Diaz-Rodriguez, P.; Munoz-Guerra, J., An automated sample preparation for detection of 72 doping-related substances. *Drug Test Anal* **2014**, *6* (6), 516-27.
46. Matysik, S.; Schmitz, G., Determination of steroid hormones in human plasma by GC-triple quadrupole MS. *Steroids* **2015**, *99* (Pt B), 151-4.
47. Fragkaki, A. G.; Angelis, Y. S.; Kioussi, P.; Georgakopoulos, C. G.; Lyris, E., Comparison of sulfo-conjugated and gluco-conjugated urinary metabolites for detection of methenolone misuse in doping control by LC-HRMS, GC-MS and GC-HRMS. *J Mass Spectrom* **2015**, *50* (5), 740-8.
48. Polet, M.; Van Eenoo, P., GC-C-IRMS in routine doping control practice: 3 years of drug testing data, quality control and evolution of the method. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (15), 4397-409.
49. Kohler, M.; Thomas, A.; Geyer, H.; Petrou, M.; Schanzer, W.; Thevis, M., Confiscated black market products and nutritional supplements with non-approved ingredients analyzed in the Cologne Doping Control Laboratory 2009. *Drug Test Anal* **2010**, *2* (11-12), 533-7.
50. Shi, Y. Q.; Yao, J.; Liu, F.; Hu, C. Q.; Yuan, J.; Zhang, Q. M.; Jin, S. H., Establishment of an HPLC identification system for detection of counterfeit steroidal drugs. *J Pharm Biomed Anal* **2008**, *46* (4), 663-9.
51. Doue, M.; Dervilly-Pinel, G.; Pouponneau, K.; Monteau, F.; Le Bizec, B., Direct analysis in real time - high resolution mass spectrometry (DART-HRMS): a high throughput strategy for identification and quantification of anabolic steroid esters. *Drug Test Anal* **2015**, *7* (7), 603-8.
52. Musharraf, S. G.; Gulzar, U., Effective separation and simultaneous analysis of anabolic androgenic steroids (AAS) in their pharmaceutical formulations by a validated TLC-densitometry method. *Chem Cent J* **2012**, *6* (1), 54.
53. Gonzalo-Lumbreras, R.; Garcia-Miguens, M. A.; Izquierdo-Hornillos, R., HPLC method development for testosterone propionate and cypionate in oil-based injectables. *J Pharm Biomed Anal* **2005**, *38* (4), 757-62.
54. Kozlik, P.; Tircova, B., Development of the fast, simple and fully validated high performance liquid chromatographic method with diode array detector for quantification of testosterone esters in an oil-based injectable dosage form. *Steroids* **2016**, *115*, 34-39.

### 3.7 Tableau annexe

Formulation	Nom	Actif annoncé (quantité)	Substances actives détectées	Quantité mesuré <sup>a</sup>
<b>Compléments alimentaires sans actifs annoncés</b>				
1	Activate Xtrem	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	-	-
2	Alpha lean-7	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Oxilofrine DMBA Caféine	35,2 ± 0,1 81,2 ± 0,4 185,6 ± 0,4
3	Animal Cuts	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	L-DOPA 3,4-divanillylTHF	103,1 ± 1,4 8,5 ± 0,5
4	Animal M-Stack	Ecrit en polonais	Caféine	NQ
5	Aucun	Aucun	Melanotan II	3,8 ± 0,3
6	Black Bombs	Caféine Acide chlorogénique Synéphrine Hespéridine Taurine	Caféine N-isopropylloctopamine	207,0 ± 2,0 18,3 ± 0,9
7	Black Bombs (black cherry flavor)	Caféine Acide chlorogénique Synéphrine Hespéridine Taurine	Caféine N-isopropylloctopamine	84,5 ± 7,9 mg/g 6,3 ± 0,2 mg/g
8	Black Widow MW 123	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine N-methyl-PEA N,N-dimethyl-PEA N-methyl-β-methyl-PEA PEA Synéphrine Oxilofrine DMAA = Methylhexanamine	141,3 ± 7,2 20,3 ± 0,9 13,9 ± 0,6 9,7 ± 0,7 38,4 ± 1,7 23,3 ± 2,0 27,4 ± 2,2 43,4 ± 1,7
9	Black Widow	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine N,N-dimethyl-PEA N-methyl-β-methyl-PEA PEA Synéphrine Oxilofrine DMAA	126,7 ± 2,6 3,5 ± 0,3 1,9 ± 0,1 37,9 ± 0,6 21,2 ± 1,0 35,7 ± 0,6 43,4 ± 2,1
10	CLK	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Aucune	-
11	Conquer	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine PEA β-methylPEA N-methyl-β-methyl-PEA N-isopropylloctopamine Oxilofrine Synéphrine	20,4 ± 1,1 mg/g 1,3 ± 0,4 mg/g 5,6 ± 0,05 mg/g 1,0 ± 0,02 mg/g 1,5 ± 0,03 mg/g 4,2 ± 0,2 mg/g 2,2 ± 0,1 mg/g
12	Dexaprine XR	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	N-methyl-PEA N-methyl-β-methyl-PEA Caféine PEA Synéphrine Oxilofrine Isopropylloctopamine	18,0 ± 0,5 13,9 ± 0,2 214,6 ± 10,4 40,1 ± 2,1 22,9 ± 0,3 30,8 ± 2,6 15,1 ± 1,2
13	DIA	Aucun	Stanozolol	4,8 ± 0,4
14	Ecdy Sterones	Ecdystéroïdes naturels	Ecdystéroïdes naturels	-
15	Erase Pro +	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Aucune	-
16	Frenzy	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	DMBA Caféine PEA Créatine Taurine	90,4 ± 7,7 139,0 ± 14,3 126,4 ± 19,4 1785,8 ± 71,6 530,2 ± 44,7
17	Isoactive	Mélange de vitamines	Aucune	-
18	IT (Iron Test)	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Aucune	-
19	Jack3d	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine	NQ

20	Noxpump	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine Oxilofrine PEA β-methyl-PEA N-methyl-β-methyl-PEA Taurine	27,5 ± 0,3 mg/g 4,3 ± 0,2 mg/g 3,2 ± 0,3 mg/g 3,0 ± 0,4 mg/g 0,8 ± 0,1 mg/g 406,1 ± 7,4 mg/g
21	OXY	Aucun	Méthandrostérolone (Boite 1/4)	4,9±0,1 4,4±0,2
			Stanozolol (Boite 2/3)	4,1±0,1 4,4±0,1
22	Phenadrine	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	N-methyl PEA N,N-dimethyl-PEA N-methyl-B-methyl-PEA Caféine PEA DMAA Oxilofrine	38,4 ± 2,1 19,2 ± 1,1 19,2 ± 0,1 156,2 ± 7,6 50,7 ± 2,7 39,3 ± 2,2 36,1 ± 1,6
23	Pre-workout ritual	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine N-acetyl tyrosine β-alanine Choline PEA Higenamine	23,8 ± 1,2 mg/g 47,9 ± 1,9 mg/g 211,8 ± 48,0 mg/g 142,3 ± 13,7 mg/g 3,4 ± 0,2 mg/g 0,52 ± 0,02 mg/g
24	Rhodiola rosea	Extraits de Rhodiola Rosea	Aucune	-
25	Ripped fuel extreme	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine	NQ
26	Shatter SX-7	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine	NQ
27	Stimul8	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine PEA Hordenine Synephrine	97,8 ± 5,8 21,5 ± 1,2 10,2 ± 0,5 3,2 ± 0,2
28	Stimul8 Apple Blast	Mélange propriétaire <sup>b</sup>	Caféine PEA Hordenine Synephrine	65,0 ± 1,5 mg/g 14,3 ± 1,1 mg/g 8,9 ± 0,1 mg/g NQ
<b>Compléments alimentaires avec actifs annoncés</b>				
29	Alphabol	Méthandrostérolone (10 mg)	Méthandrostérolone	9,6 ± 0,4
30	ATD	1,4,6-androstatriène-3,17-dione (25 mg)	1,4,6-androstatriène-3,17-dione	24,7 ± 0,4
31	Boldebolin	Boldénone Undécylénate (250 mg/mL)	Boldénone Undécylénate	214,8 ± 6,1
32 <sup>c</sup>	Clenbutérol	Clenbutérol (40 µg)	Clenbutérol	39 µg ± 2,0 µg
33 <sup>c</sup>	Clomiphène	Clomiphène citrate (50 µg)	Clomiphène citrate	48,9 ± 0,3
34	Epistane	Epistane (20 mg)	Epistane	19,9 ± 0,1
35	Induject 250	Testostérone propionate (30 mg) Testostérone Isocaproate (60 mg) Testostérone Phénylpropionate (60 mg) Testostérone Decanoate (100 mg)	Testostérone propionate Testostérone Isocaproate, Testostérone Phénylpropionate Testostérone Decanoate	29,9 ± 1,1 59,0 ± 3,0 57,6 ± 0,3 95,1 ± 0,3
36	Letrozole	Létrozole (2,5 mg)	Aucune	-
37	Lixus anavar	Oxandrolone (10 mg)	Stanozolol	4,5 ± 0,1
38	M-1-T	Méthyl-1-testostérone (10 mg)	Méthyl-1-testostérone Méthandrostérolone	10,1 ± 0,8 26 ± 0,3 µg
39	Méthandrostérolone	Méthandrostérolone (10 mg)	Méthandrostérolone	10,1 ± 0,8
40	Nandrolone Phénylpropionate	Nandrolone Phénylpropionate (1000 mg)	Nandrolone Phénylpropionate	1053,1 ± 50,8
41	Osta R,X	Ostarine (6,5 mg)	Stanozolol Décanoate de testostérone	1,2 ± 0,1 5,5 ± 0,3
42	Osta Shred	Arimistane (25 mg) Ostarine (12,5 mg)	Arimistane Ostarine	18,5 ± 1,6 12,8 ± 1,0
43 <sup>c</sup>	Oxandrolone	Oxandrolone (10 mg)	Oxandrolone	8,9 ± 0,1
44	Primobolan Depot	Méthénolone énanthate (1000 mg)	Méthénolone énanthate	961,0 ± 19,9
45 <sup>c</sup>	Proviron	Mestérolone (25 mg)	Mestérolone	24,3 ± 0,1
46	Rexobol	Stanozolol	Stanozolol	7,6 ± 0,1 <sup>d</sup>
				9,2 ± 0,3
47	Sarm GW	Cardarine (10 mg)	Cardarine	4,84 ± 0,32
48	Sarm LGD	Ligandrol (4mg)	Ligandrol	1,24 ± 0,1
49	Stymen	DHEA (10 mg)	DHEA	10,1 ± 0,2
50	T3	Liothyronine sodium (25 µg)	Liothyronine sodium	NQ
51 <sup>c</sup>	T4	Levothyroxine sodium (100 µg)	Levothyroxine sodium	99 ± 5 µg
52	TestoCyp	Testostérone cyionate (250 mg)	Testostérone cyionate	238,6 ± 8,1
53	TestoRapide	Testostérone propionate (100 mg)	Testostérone propionate	86,7 ± 3,2

54	Trenbolone enanthate	trenbolone énanthate (2000 mg)	Trenbolone énanthate	1925 ± 28
55 <sup>c</sup>	Zymoplex	Tamoxifène (20 mg)	Tamoxifène	19,7 ± 0,1
56	6-Oxo	4-androstene-3,6,17-trione (75 mg) Indole-3-carbinol (25 mg)	Chrysine	98,3 ± 3,9
57	7-Keto-DHEA	7-Keto-DHEA acetate (50 mg)	7-Keto-DHEA acétate	49,7 ± 1,3
58	11-X	4-androst-3,11,17-trione (100 mg)	4-androst-3,11,17-trione	80,4 ± 3,8

<sup>a</sup> : Les dosages sont donnés en mg/unité de formulation (i.e. mg/gélule, mg/flacon, mg/comprimé), dans le cas où ce n'était pas possible les unités seront indiquées dans le tableau.

<sup>b</sup> : Les mélanges propriétaires annoncent parfois contenir des substances interdites par l'agence anti-dopage sous la forme de plantes ou d'extraits de plantes.

<sup>c</sup> : produits contenant différents numéros de lots avec des résultats identiques. Pour des raisons de clarté, un seul numéro est explicité.

<sup>d</sup> : Dans le cas de rexobol, les 2 échantillons n'étaient pas identiques, cette formulation contenait des impuretés.

NQ = non quantifié, soit à cause d'une trop faible quantité, soit à cause de l'impossibilité d'isoler un signal ou encore dans le cas de la caféine lorsqu'elle était le seul actif détecté.

PEA : phénéthylamine, DHEA : Déhydroépiandrostérone.

NB : Toutes les substances quantifiées ne sont pas forcément considérées comme dopantes, cependant elles ont toutes un effet en lien direct avec les performances physiques.



---

# Partie 2

---



# 1 Contrefaçon de médicaments et RMN à bas-champ

## 1.1 Contrefaçon de médicaments

### 1.1.1 Problématiques et définitions

Le marché global des contrefaçons représenterait selon les estimations les plus récentes, un chiffre d'affaire de 1600 Milliards d'euros toutes catégories confondues (Figure 1).<sup>1</sup> Avec un chiffre d'affaire avoisinant les 200 milliards d'euros par an, le marché des médicaments « contrefaits » serait, selon le FBI, « le délit du 21<sup>ème</sup> siècle » le plaçant au sommet de l'échelle des produits contrefaits.

<b>Global counterfeiting market by sector (€ billions)</b>	
2013 estimates, not all sectors included	
Prescription drugs	188
Electronics	158
Foods	46
Auto parts	42
Toys	32
Clothing and shoes	23
Sporting goods	6
Tobacco	4
Cosmetics	3
Aircraft parts	2
Weapons	2
Alcohol	0.9
Watches	0.9
Diplomas and degrees	0.9
Pesticides	0.7
Money, IDs, and passports	0.3

Figure 1 : Estimation du marché mondial des contrefaçons en 2013. Extrait de la référence 1.

Le terme de contrefaçon précédemment cité entre-guillemets se doit d'être clarifié et harmonisé. Pour la majorité des produits dit contrefaits, le terme contrefaçon englobe les propriétés intellectuelles se référant à la spécialité et/ou la marque attenante. Pour les produits de santé tels que les médicaments, qu'ils soient princeps ou génériques, le terme de contrefaçon se doit d'être bien plus généraliste au vu des menaces potentielles pour la santé humaine. L'organisation mondiale pour la santé (OMS) estime que 10% des médicaments seraient contrefaits<sup>2</sup> et certains pays pourraient même atteindre un taux de contrefaçon avoisinant les 30%. Comme évoqué précédemment des grandes instances de lutte contre le crime organisé, telles qu'INTERPOL ou le FBI, s'unissent pour lutter contre ce qu'elles appellent des réseaux organisés, qui serviraient même parfois à financer des organisations terroristes.<sup>3</sup> Le développement de la contrefaçon des médicaments est d'autant plus perceptible à



cause de la globalisation des marchés, ainsi que par la pénétration possible sur le marché de pays développés, notamment via des pharmacies en ligne.<sup>4-6</sup>

En 1992 l'OMS donne une première définition aux médicaments contrefaits : « *médicaments qui sont délibérément et frauduleusement qualifiés à tort en comparaison du médicament auxquels ils réfèrent (génériques ou spécialités)* ». Ici, le terme contrefait inclus donc tant les médicaments de mauvaise composition chimique, que les médicaments s'appropriant les propriétés intellectuelles d'un autre. Ces médicaments pouvaient donc, comme évoqué dans le chapitre précédent, en fonction des lois nationales adoptées, ne pas être interdits ou ne pas entraîner de sanctions pour leur fabricant/revendeur. En 2010 l'OMS décide donc de détailler cette définition en employant non plus le terme contrefait, mais l'association de terme : fallacieux/faususement étiqueté/falsifié/contrefait (SFFC :spurious/falsely labeled/falsified/counterfeit ) écartant de fait les produits dit sous-standards, faisant référence aux produits ne répondant pas aux spécificités, mais étant fabriqués par des firmes ayant une autorisation de production.<sup>7</sup> Cette définition, étant cette fois plus adaptée à la compréhension pharmacologique a été pourtant considérée comme trop complexe pour la compréhension commune, induisant notamment la confusion entre les termes de falsifié et les notions de propriétés intellectuelles. De fait, le 29 mai 2017, la classification SFFC a été reprise en parlant cette fois uniquement de produits falsifiés et de sous-standards (SF).<sup>8</sup> Cette répartition inclut les produits médicaux comme décrit ci-après (Figure 2)

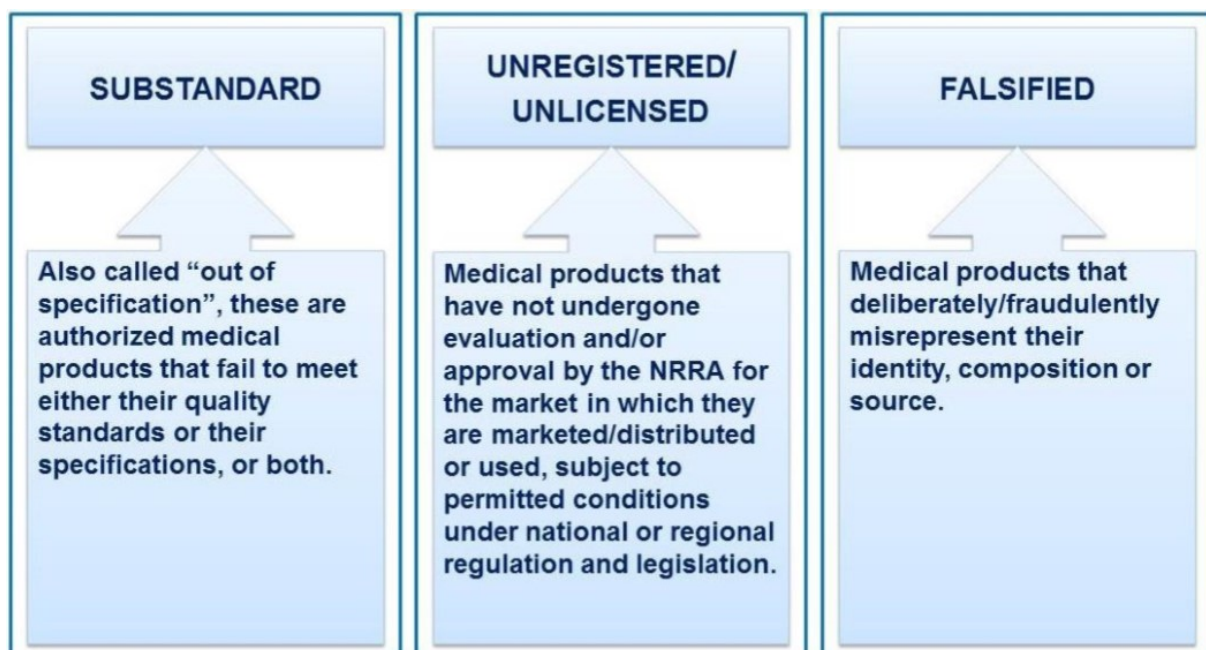


Figure 2 : Répartition des produits médicaux selon la définition de l'OMS. Extrait de la référence 8.

Le terme contrefait conserve alors son sens commun, comme nous l'entendons pour n'importe quel produit autre que des médicaments. A long terme l'OMS espère que le terme falsifié vienne remplacer le terme contrefait, dont l'usage abusif peut induire des confusions juridiques dans le langage courant, permettant ainsi aux compagnies victimes de contrefaçon de se défendre en s'appuyant sur des lois d'ores et déjà établies. La confusion autour du terme de propriété intellectuelle, joue en la défaveur complète des génériqueurs. Les médicaments génériques sont pourtant des marques déposées disposant d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et pouvant à leur tour être « contrefaits ». <sup>7, 9</sup> Ces définitions mettent en péril l'accès à des médecines de première utilité vendues sous la forme de génériques, qui sont déjà, notamment en matière d'importation, victimes des divergences entre les lois nationales. <sup>10</sup> Ces lois, tout comme nous en avons discuté pour les compléments alimentaires, entraînent des confusions qui freinent l'accès à des produits sanitaires de première nécessité. De plus, le côté répressif des lois face à la contrefaçon ne correspond absolument pas au crime, comme nous l'évoquions au-dessus, les sanctions ne sont que proportionnelles au crime de propriété intellectuelle, elles ne tiennent pas compte du risque sanitaire et des problèmes de santé publique qu'induisent ces contrefaçons. Ces difficultés législatives induisent également des problèmes relativement récents concernant les pharmacies en ligne qui fréquemment ne sont pas régulées. En effet, aux Etats-Unis par exemple, on estime qu'un quart de la population y achèterait des médicaments sans prescription. <sup>11</sup> En plus du danger associé à l'auto-médication, certaines études montrent qu'environ 10% des médicaments vendus dans les pharmacies en lignes sans prescription sont de mauvaise qualité.

C'est pour toutes ces raisons que les notions de contrefaçons liées aux médicaments devraient être dissociées des notions de propriétés intellectuelles, afin de rendre la lutte contre ce phénomène plus facile.

### 1.1.2 Les différentes formes de contrefaçon et les médicaments ciblés

Au vu de la définition changeante de contrefaçon donnée par l'OMS, on comprend que le nombre et la variété des contrefaçons existantes sont complexes et difficiles à détecter. Les contrefaçons les plus couramment présentées au grand public sont liées à la propriété intellectuelle, ou aux brevets sous-jacents, elles ne sont pas forcément les plus dangereuses pour la santé et laissent le sentiment au consommateur que seul « l'emballage » n'est pas conforme. <sup>12-13</sup> Ce ne sont pas les seuls problèmes associés à la propriété intellectuelle, on retrouve notamment des cas de fausses documentations, des changements volontaires de dates d'expiration et ou de numéros de lots, sur des produits « re-packagé », <sup>14</sup> permettant l'utilisation de produits de faible qualité et/ou dégradés dans des emballages inspirant la confiance, certains parlent alors d'hybrides contrefaits. <sup>15</sup> En plus des contrefaçons décrites ci-dessus, beaucoup de contrefaçons sont liées à des non-conformités

chimiques. On trouve notamment des médicaments ne contenant pas de principe actif, contenant le mauvais principe actif ou bien encore contenant le bon actif mais sous dosé (Tableau 1). Ce genre de contrefaçon peut également outre l'absence d'effet thérapeutique attendu, induire de sévères problèmes de santé du fait de potentiels risques d'interactions avec un éventuel autre traitement, ou bien, une réponse non désirée à un actif inattendu. Ces mauvaises compositions peuvent engendrer des diagnostics médicaux complexes suite à de potentiels effets indésirables.<sup>16</sup> Des cas de contrefaçons ou *a priori* la santé du consommateur n'est pas mise en cause mais pouvant causer de graves répercussions économiques existent, on parle alors de « très bonnes copies » pour lesquelles le bon actif est présent avec un bon dosage et souvent dans un packaging quasi semblable à l'original.

Tableau 1 : Différents types de contrefaçon de médicaments décrits.

Cible	Type de contrefaçon
Médicament	Pas d'actif
	Mauvais actif
	Bon actif, mal dosé
	Très bonne copie
Principe Actif	Substance périmée
	Hybride contrefait
Emballage	Copie de l'emballage
Documentation	Documents falsifiés

Les contrefaçons bien qu'elles aient tendances à se généraliser sont actuellement, plutôt ciblées sur des médicaments avec une marge bénéficiaire importante, c'est-à-dire des médicaments pour lesquels la demande est grande. Dans les pays en voie de développement, ce sont principalement des médicaments communément appelés « lifesaving = vitaux » : traitement anti-paludique, anti-tuberculeux, anti-VIH etc...<sup>4</sup> qui sont décrits. Au contraire, dans les pays industrialisés ce sont principalement des médicaments appelés « lifestyle = confort » tels que les narcotiques, les traitements pour les dysfonctionnement érectiles ou la perte de poids.<sup>17</sup> Cependant de nos jours, l'augmentation des cas de cancer détectés, nécessitant la prise de traitements extrêmement onéreux, induit un taux de contrefaçon croissant dans ce domaine.<sup>18-20</sup> La nature des médicaments les plus affectés à l'heure actuelle est reporté en Figure 3. Ces données soulignent la prédominance et la gravité de ce phénomène dans le secteur des médicaments anti-infectieux, principalement consommés dans les pays en développement.

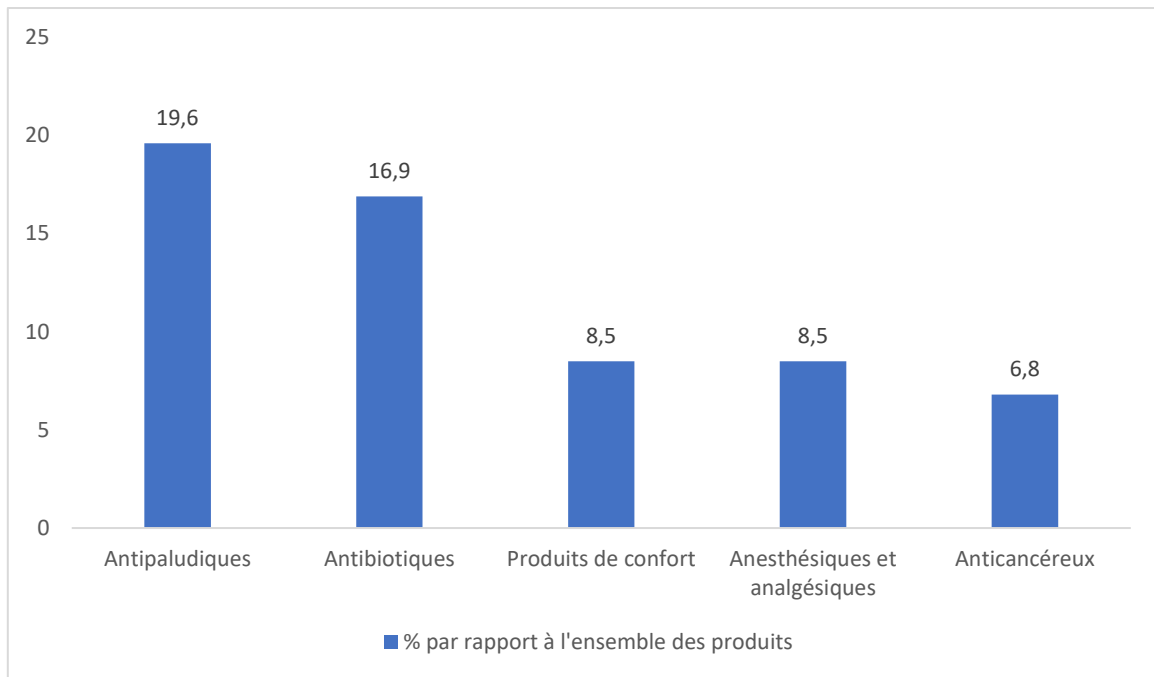


Figure 3 : Répartition des médicaments contrefaits dans le monde mettant en évidence les 5 groupes de médicaments les plus contrefaits. Adapté de la référence 20.

En accord avec les chiffres donnés par l'institut de sécurité pharmaceutique (PSI),<sup>21</sup> qui surveille le marché des médecines contrefaites, depuis 2002 le nombre d'incident reporté portant sur la découverte de médicaments contrefaits, détournés ou volés a régulièrement augmenté (Figure 4).

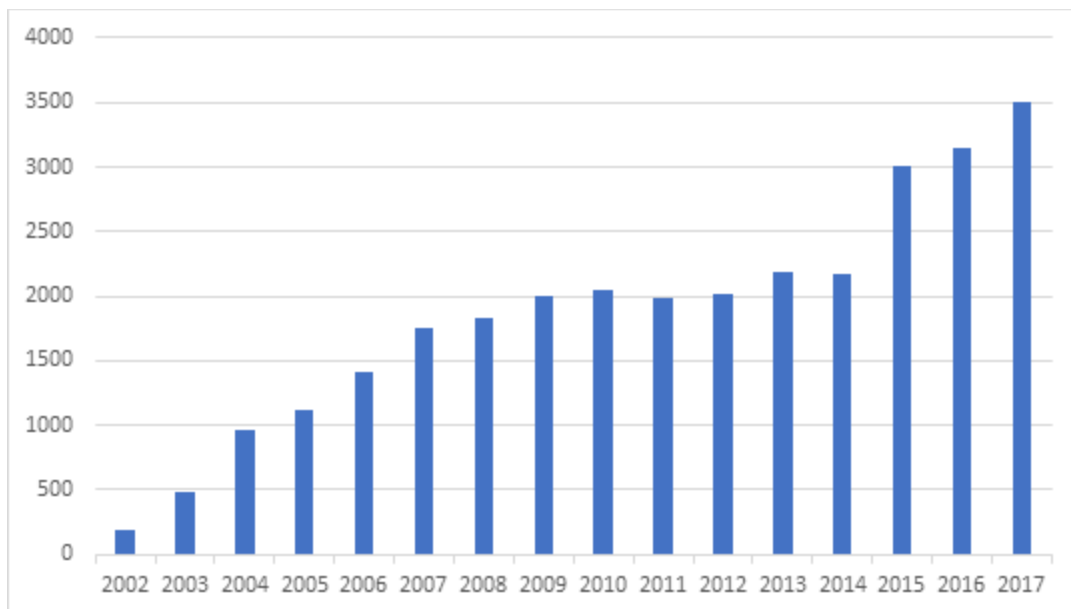


Figure 4 : Nombres d'incidents liés aux médicaments contrefaits et reportés de 2002 à 2017 dans le monde. Adapté de la référence 21.

Ces chiffres mettent bel et bien en évidence un marché florissant qui malgré une période d'accalmie entre les années 2010 et 2014 ne cessent de croître, notamment avec une inflation de 11% de 2016 à 2017. Comme pour les compléments alimentaires, les chiffres publiés ne sont probablement que la partie visible de l'iceberg, étant donné que les données chiffrées des ventes sur internet et sur les marchés parallèles ne sont pas atteignables. Sachant qu'un « incident » correspond à une saisie d'un lot de médicaments, qui seront considérés comme des incidents commerciaux au-delà de 1000 unités saisies et non commerciaux pour les autres, le graphique présenté en Figure 5 donne, à titre d'exemple la répartition des saisies durant l'année 2017, mettant en évidence majoritairement des saisies de grandes ampleurs.

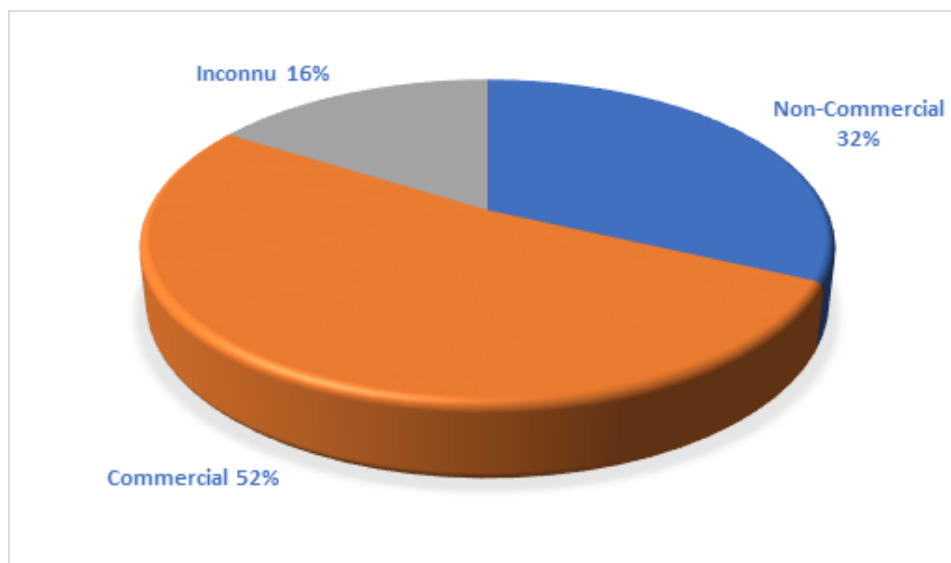


Figure 5 : Saisies de médicaments contrefaits en 2017 dans le monde. Adapté de la référence 21.

L'importance de ce problème se traduit également à l'aide des chiffres résultant de grandes opérations anti-criminelles, notamment menées pour les plus connues par des institutions telles qu'Interpol et ses opérations PANGEA. Ils reportent, à titre d'exemple avec l'opération PANGEA 9 menée en 2016 au travers de 103 pays, la saisie de 12.2 millions de médicaments contrefaits soit un manque à gagner estimé à 53 millions de dollars US conduisant également à la fermeture de 4932 sites internet.<sup>22</sup>

### 1.1.3 Un phénomène mondial

#### 1.1.3.1 Vue d'ensemble du marché mondial

Le marché de la contrefaçon tout comme n'importe quelle industrie rentable se développe au travers de fabricants, grossistes, distributeurs et vendeurs locaux. C'est un marché extrêmement organisé s'affranchissant totalement des frontières et dont la quasi libre circulation, par des voies aériennes ou maritimes souvent en suivant des itinéraires complexes ou inhabituels, entre pays a pour

but évident de perdre les autorités en charge de ce problème. Ce marché très global affecte quasiment le monde entier, très peu de pays sont épargnés. Pourtant d'après Newton et son équipe, il semblait d'après des données publiées en 2010 que seulement 5 à 15% des 191 états membre de l'OMS reportaient des cas de contrefaçon.<sup>4</sup> Pour bien comprendre la contrefaçon de médicaments, il est primordial de différencier les pays fabricants des pays consommateurs. Les plus gros fabricants sont en Asie et Amérique latine (principalement au Brésil, en Argentine, en Inde et en Chine), on trouve aussi un taux de fabrication important en Russie.<sup>23</sup> Les pays consommateurs réunissent les pays fabricants auxquels s'ajoutent principalement l'Afrique sub-saharienne, les pays arabes et les pays des steppes d'Asie centrale.<sup>17</sup> Parmi cela, 5 pôles définis comme des zones de transits jouent des rôles prédominants dans l'échange de ces médicaments contrefaits, c'est le cas du Qatar, de la Turquie, de la Suisse, du Mexique et de la Nouvelle-Zélande (Figure 6).

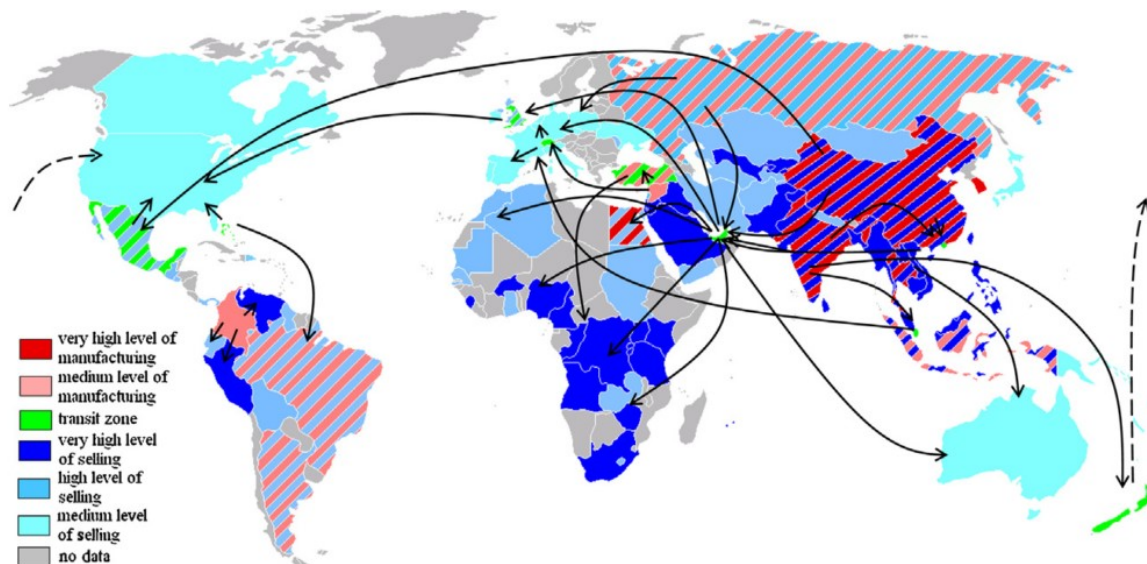


Figure 6 : Répartition mondiale des zones de productions et de distribution des médicaments contrefaits. Extrait de la référence 15.

D'après l'OMS les circuits de distribution sont différents entre les pays mais également au sein d'un même pays, entre les zones rurales et les zones urbaines. Dans les pays en voie de développement, les médicaments sont parfois vendus directement dans la rue, hors des circuits de distributions classiques<sup>24</sup> mais, fait plus problématique, les contrefaçons parviennent parfois à s'infiltrer dans des systèmes de distributions classiques mettant en péril la sécurité d'hôpitaux ou de pharmacies locales et donc des patients.<sup>25</sup>

Il est rare que ce genre de problème arrive dans des pharmacies locales dans des pays développés, bien que ces pays ne soient pas exempt de contrefaçons.<sup>4</sup> Par contre, comme nous l'avons évoqué un peu plus haut, le développement récent de pharmacies en ligne, souvent hors de toute législation, ainsi que le développement de sites internet démultiplient les ventes de médicaments contrefaits,

l'OMS estime même qu'environ 50% des médicaments vendus sur internet seraient contrefaits.<sup>6</sup> A titre d'exemple, on considère qu'aux Etats-Unis entre 19 et 26 millions de personnes achètent désormais des médicaments sur internet.<sup>11</sup> Ces médicaments peuvent alors être vendus au sein de pays industrialisés par des moyens détournés.<sup>26-27</sup> L'attrait d'internet repose sur les mêmes principes que ceux que nous avons évoqués pour les compléments alimentaires, les ventes via internet procurent une toute relative confidentialité, une certaine commodité et surtout dans beaucoup de cas des prix défiant toute concurrence.<sup>28</sup> Un des meilleurs exemples de ce problème est sûrement l'exemple assez récent de la condamnation à 34 millions de dollars d'amende à la pharmacie en ligne « Canada Drug » pour avoir vendu des substances contrefaites au sein des Etats-Unis. Le Canada est la 10<sup>ème</sup> puissance économique mondiale, avec un système de distribution des médicaments *a priori* sûr. Pourtant 85% des produits vendus par des pharmacies en ligne, annoncées comme canadiennes, seraient en fait vendus par des sites implantées physiquement hors du pays.<sup>5</sup> Ce problème a notamment été mis en évidence en 2011 avec le démantèlement d'un réseau illicite d'achat d'avastin, une marque déposée d'un médicament anticancéreux (le bevacizumab) largement distribué aux Etats unis qui provenait en fait d'un réseau international complexe comme illustré en Figure 7 mais qui ne contenait en réalité pas de substances actives.



Figure 7 : Circuit de distribution de l'Avastin. Extrait de la référence 20.

Bien que ces sites soient souvent annoncés comme Nord-Américain, ce ne sont souvent que des sites temporaires dont l'adresse change régulièrement, souvent en réalité hébergés dans les pays fabricants, tels que la Chine ou la Russie.<sup>29</sup> D'après l'OMS 50% des sites internet vendant des médicaments dissimulent leurs adresses physiques.

### 1.1.3.2 Les causes à la source de ce marché

Le phénomène de contrefaçon n'est pas nouveau, en effet en 1783 William Saunders publie dans un pamphlet : « *il existe un certain danger du fait de l'avidité des marchands, que l'écorce quinquina soit falsifiée... situation susceptible d'entacher la réputation du produit* ».

Le marché des produits pharmaceutiques est celui ayant enregistré la plus forte croissance sur les marchés à revenus intermédiaires. Cette demande grandissante associée à la difficulté d'accès à des produits médicaux de qualité, sûrs et efficaces, crée un vide que les produits de qualité inférieure ou falsifiés viennent trop souvent combler.

Nous avons déjà abordé les problématiques liées aux lois et aux sanctions encourues pour la vente de contrefaçon de médicaments, faisant de ce marché illicite un des plus avantageux si l'on considère un ratio bénéfices commerciaux/risques pénal. Il est important de comprendre que la facilité d'accès à des médicaments -qu'ils soient princeps ou génériques- via internet, est un avantage indéniable pour les consommateurs, mais fait aussi grandement l'affaire des revendeurs. En effet, *a contrario* d'autres produits contrefaits tels que les vêtements par exemple pour lesquels le prix est le critère principal forçant l'achat, le prix d'un médicament qui serait largement en dessous du prix du marché jette la suspicion sur sa qualité. De fait, un médicament contrefait ne sera pas forcément vendu à bas coût et le bénéfice fait est important étant donné qu'ils sont souvent vendus au prix des spécialités ou des génériques auxquels ils se réfèrent.<sup>30</sup> Notons que lorsque un produit falsifié est vendu à plus bas prix, il s'avère quand même plus coûteux qu'un médicament -tant pour le patient que les systèmes de santé nationaux- de référence étant donné que son inefficacité force le patient à renouveler le traitement.<sup>31</sup> Comme montré sur la Figure 6, les zones de libres échanges où souvent les législations concernant les médicaments contrefaits sont très faibles et surtout très peu en adéquation avec les autres états, jouent là encore un rôle principal. En plus de la faible législation dans certaines parties du monde, ces fabricants profitent aussi du fait que les médicaments sont des produits avec une valeur ajoutée considérable. En effet, leurs processus d'élaboration coûtent environ 5 à 10 Milliards d'euros en recherche et développement et la vente d'un médicament doit aussi pallier les besoins de l'élaboration du suivant. Un vendeur de médicament falsifié s'affranchit de cette dépense, ainsi que très régulièrement -même lorsque l'on parle de très bonnes copies- des règles d'hygiène et sécurité en vigueur pour la préparation de ce dernier.<sup>32</sup>

Le prix souvent élevé d'un médicament de référence parfois aussi liés aux taxes pour l'importation de spécialités, associés aux problématiques de non-existence de systèmes de santé publique sont autant d'éléments qui poussent les consommateurs à passer par des marchés détournés. Ces marchés peuvent être des achats sur internet ou même encore des ventes de rue, en particulier dans les pays sud asiatique.<sup>33-34</sup> On parle alors de pression sur la chaîne d'approvisionnement.



L'implication d'organisations terroristes ou bien de cartels<sup>35-36</sup> corrompt d'autant plus les circuits de distributions classiques, où souvent, de la matière première est rachetée aux vendeurs de gros avant d'être réimplantée dans les circuits de distributions classiques après avoir régulièrement été re-packagée. De fait, ces médicaments souvent moins sujets à des contrôles quand provenant de distributeurs supposés fiables, tombent facilement dans les mains du patient sapant dans certains cas la confiance qu'ont les consommateurs envers les produits de références.<sup>20, 32, 37</sup>

Toutes les raisons sont bonnes pour ces organisations ou marchands peu scrupuleux pour introduire un produit falsifié sur le marché. Parmi ces raisons on retrouve également des raisons que l'on peut qualifier d'opportunistes. En effet, il est fréquent de détecter un taux important de produits falsifiés sur le marché après qu'une épidémie, ou qu'une maladie rare ait été mise en évidence dans une zone géographique ciblée. Le taux de contrefaçon augmente aussi avec l'instabilité politique et les conflits, créant régulièrement des pénuries, ces dernières étant elles régulièrement comblées par des produits falsifiés.

Bien que comme nous l'évoquions précédemment, beaucoup de contrefaçons soient vendus à des prix très proches de celles des spécialités, la pression financière à tous les niveaux de la chaîne d'approvisionnement privilégie souvent l'accès à des substances contrefaites à la place des substances de références. Parfois même au sein d'une zone, comme en Europe, des produits, vendus à bas prix dans certains pays, sont revendus à des prix plus importants dans d'autres pays européens de façon parfaitement légale car en accord avec le traité de Rome. Ce phénomène implique plus de 140 millions de boîtes de médicaments en Europe par an. Comme déjà évoqué avec l'affaire de l'avastatin, le Royaume-Uni est le pays le plus affecté par ce phénomène avec 70% du marché parallèle y transitant. A titre d'exemple on reporte que 25% des médicaments vendus au Danemark sont issus du marché parallèle. Nous avons vu jusqu'alors des échanges entre 2 ou 3 pays, mais parfois des cas sont reportés impliquant l'échange entre plus de 20 intermédiaires avant d'arriver au patient. Si le problème majeur en Europe est celui des marchés parallèles (Figure 8), aux Etats Unis c'est la réimportation qui pose soucis.<sup>38</sup> Dans un cas comme dans l'autre, ces produits profitent d'une législation inhomogène associée à des moyens techniques de contrôle encore trop faibles pour pouvoir assurer la qualité de ces produits. Ces aspects seront développés dans la partie 1.1.4.3.

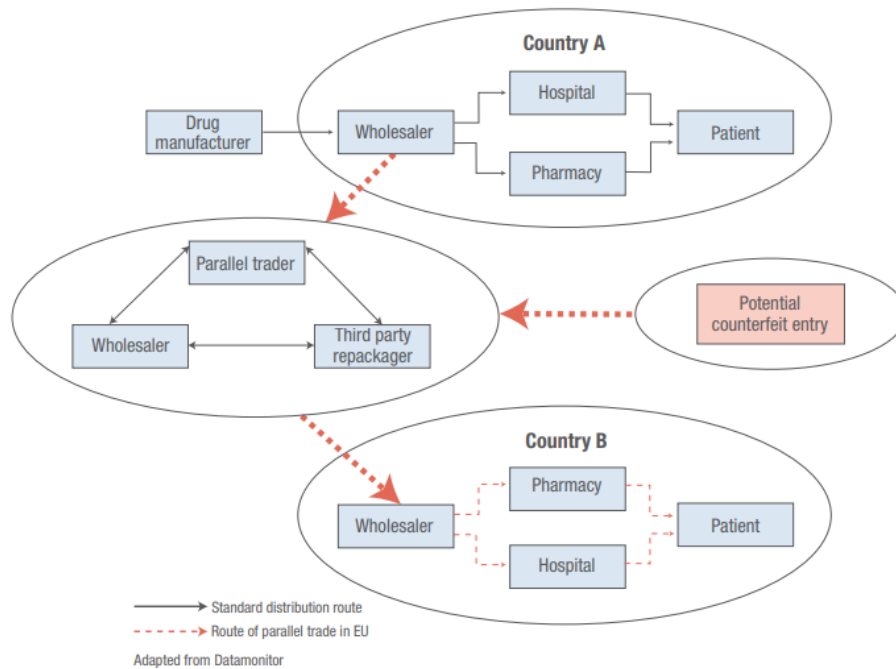


Figure 8 : Introduction des contrefaçons de médicaments dans le marché parallèle en Europe. Extrait de la référence 15.

En résumé, dans un pays ou une zone géographique donnée, des produits médicaux de qualité inférieure seront plus répandus lorsque les critères ci-après seront réunis :

- Accès à des produits sûrs limités.
- Gouvernance du système de santé défaillante.
- Faiblesse des capacités techniques.

### 1.1.3.3 Les répercussions économiques et sanitaires

Peu importe le moyen par lequel une contrefaçon est entrée sur le marché ou est arrivée entre les mains d'un patient, ces produits engendrent des répercussions tant économiques que sanitaires, importantes. Les conditions dans lesquelles ces médicaments sont fabriqués ou stockés par du personnel non formé, peuvent dégrader involontairement la qualité de médicaments qui sont eux, souvent volontairement de mauvaise qualité.<sup>39</sup> Une des principales raisons de risques sanitaires concerne la rupture fréquente de la chaîne du froid, les médicaments peuvent être stockés parfois à même le sol dans des hangars, des véhicules divers, ou autres endroits insolites... la rupture de cette chaîne du froid peut induire de sérieux risques quant à la qualité de l'actif mais également favoriser l'apparition d'impuretés potentiellement toxiques. D'après l'OMS, en 2011 la répartition des médicaments contrefaits était la suivante : 32,1% des médicaments ne contenaient pas d'actifs, 21,4% contenaient le mauvais actif, 20,2% le bon actif mais mal dosé, 15,6% étaient conformes pour les actifs mais re-packagés, et 8,5% avaient un haut niveau d'impureté ou de contaminants.<sup>27</sup>

Les cas d'absence d'actif peuvent potentiellement être fatals, le patient n'étant pas traité. Dans les cas où l'actif n'est pas dosé correctement, il peut entraîner des effets potentiellement néfastes aussi bien

dans les cas de sous-dosages que de sur-dosages. En effet, peuvent apparaître des problèmes d'inefficacité de traitement ou le développement de résistances à de futurs traitements dans certains cas précis.<sup>4</sup> Ainsi, il est clairement établi que la résistance au principal antipaludique, l'artémisinine est d'abord apparue dans une région du monde où entre 2001 et 2009, entre 38 et 90% des médicaments à base d'artémisinine présents sur le marché étaient de qualité inférieure ou falsifiés.<sup>40-42</sup> La présence d'une substance inattendue dans un médicament, peut engendrer des cas d'intoxications si par exemple les posologies étaient différentes de celles prescrites pour la substance initialement attendue. Elles peuvent aussi causer de potentielles interactions médicamenteuses. Les cas de contrefaçons contenant des contaminants sont parfois surprenants mais engendrent aussi des cas d'intoxications lorsque des substances totalement inadaptées à la consommation sont ingérées. Dans la littérature, sont décrits par exemple des cas d'intoxication par de l'anti-gel, du cirage pour chaussure, des produits ménagers et bien d'autres.<sup>43</sup>

Bien que l'on puisse croire que les contrefaçons re-packagées soient moins dangereuses, l'absence fréquente de notices d'utilisation et donc de posologie, pousse à l'auto-médication et peut induire des cas de surdosages.

Si les aspects sanitaires restent un problème majeur, les répercussions économiques sont elles aussi conséquentes. En 2017, Sanofi a publié, en accord avec le bureau européen de la propriété intellectuelle, un rapport montrant que sur le marché européen le marché de médicaments contrefaits induirait chaque année une perte de 4,4% des ventes légales, soit une perte avoisinant 10 milliards d'euros et causant la fermeture de 90 900 emplois.<sup>44</sup> Ce marché induirait également 1,7 milliards de pertes associées aux contributions sociales et aux taxes pour les gouvernements.

Dans le monde, bien que les valeurs soient difficilement accessibles, le centre des médicaments pour l'intérêt public avait émis une estimation que ce marché atteindrait 75 milliards d'euros en 2010. A l'heure actuelle, les estimations quant à ce marché varient entre 150 et 200 milliards d'euros. En 2010 déjà ces estimations correspondaient à une hausse de 90% en 5 ans, cette fois si les estimations les plus récentes référentes à ce marché sont exactes, elles correspondraient à une hausse de 100% en 8 ans. La principale répercussion sociale s'effectue au niveau de l'image qu'ont les patients à propos des industries pharmaceutiques et des médicaments eux-mêmes, induisant une perte de confiance généralisée, à la fois envers les entreprises mais aussi envers les médicaments. Cette possible perte de confiance de la part de certains patients, va dans le sens de la consommation de produits de santé plus « sûrs » comme par exemple les compléments alimentaires comme nous l'avons explicité dans une première partie, mais qui ne sont plus « sûrs » que d'apparence.

## 1.1.4 Limiter ce phénomène

### 1.1.4.1 Accroître la prise de conscience

Bien que la notion de produits de santé falsifiés soit relativement ancienne, le phénomène de contrefaçon des médicaments est quand même un problème relativement récent et comme évoqué précédemment la tendance est globalement à la hausse depuis les années 2002, et n'a vraisemblablement jamais cessé d'augmenter depuis son apparition. C'est en 1985 que l'OMS se réunit pour la première fois pour discuter de ce problème de santé publique.<sup>45</sup> A partir de ce moment-là et au travers de diverses institutions nationales, telles que la FDA aux Etats-Unis, l'agence européenne des médicaments (EMA), ou encore des institutions plus locales telle que la « Medicine and health care » aux Royaume Unis ou le National Agency for Food Drug Administration and Control au Nigéria (NAFDAC)<sup>46</sup>, les gouvernements tentent d'alerter les populations sur l'existence de ce marché illicite, et de fait, d'en limiter la propagation, au travers de ce qu'ils qualifient de cercle vertueux : Prévenir, détecter, intervenir. La prise de conscience globale qu'un tel phénomène existe est de première importance, surtout que dans certains pays une ignorance quasi complète règne. Dans une étude de 2006, Newton<sup>47</sup> reporte le fait qu'à cette période au Laos 63% des vendeurs et 80 à 96% des consommateurs -en fonction des zones (rurales ou urbaines)- étaient inconscients de l'existence de produits de santé de faible qualité. Les agences institutionnelles citées précédemment participent aussi à l'élaboration de sites internet visant à éduquer le consommateur sur les moyens d'acheter de façon sûre.<sup>48</sup> Les interventions de terrain menées par des grandes institutions, comme PANGEA menée par Interpol, ou les saisies douanières, ainsi que leur mises en avant par les médias relatent aussi le fait que la contrefaçon est une branche du crime organisée, ceci participant à la prise de conscience. Cependant outre ces saisies souvent impressionnantes, le marché est globalement imperceptible pour le consommateur non averti.

Lorsque les gouvernements parviennent à mettre la main sur des produits falsifiés, le marché est très loin d'être démantelé, en effet la complexité à définir un médicament contrefait, implique une difficulté à homogénéiser les lois. Pourtant au vu des circuits de distributions et de fabrications transfrontaliers, des lois internationales seraient obligatoires pour lutter contre ce phénomène.<sup>9, 20</sup> L'OMS reporte un système « cloisonné » où la communication entre les services responsables de la qualité des produits médicaux, et ceux responsables des données de pharmacovigilances et des directives thérapeutiques, est souvent inharmonieuse. Ils parlent alors d'une « culture de notifications sous développée » où parmi les obstacles mis en évidence, on peut citer le manque de connaissances, l'absence de système de signalement, une complexité excessive des systèmes de notification, un faible taux de réponse des autorités de réglementation et le manque de retour d'information. Le tout régulièrement amplifié par des questions financières. Des conventions telles

que la convention MEDICRIME tente depuis 2010 d'unifier les procédures législatives et de faciliter la collaboration entre les institutions en charge de la qualité des produits de santé dans le monde. Pourtant alors que beaucoup s'accordent à définir la contrefaçon comme un crime international voire pour les instances les plus sévères comme un crime contre l'humanité,<sup>10</sup> beaucoup pensent que les conventions trop focalisées sur la notion de propriété intellectuelle, ne suffiront pas.

L'accord entre les systèmes judiciaires et les systèmes exécutifs internationaux serait un premier pas important pour lutter contre ce phénomène.<sup>9</sup> Cependant au vu de l'ampleur de ce trafic, une collaboration plus globale, impliquant par exemple les banques, les organismes en charge de la distributions des colis achetés sur internet, ou plus globalement les systèmes postaux, le tout associé à des outils de recherche automatisés, serait nécessaire.

#### 1.1.4.2 Protéger les produits

Dans le cas non idéal mais réaliste où ce marché serait difficile à stopper, les fabricants ainsi que les distributeurs s'accordent à dire que des techniques doivent être mises en place pour faciliter la distinction entre des produits légaux et des produits illégaux. Cependant l'élaboration de tels systèmes de protection est régulièrement chère et influera forcément sur les prix de médicaments au détriment du consommateur. La première étape est certainement de sécuriser les stocks pour éviter les vols de matières premières. Dégardin décrit un système idéal de protection « multicouche » des médicaments via un marquage, soit de l'emballage soit du médicament lui-même comme un système à trois niveaux permettant (i) une authentification facile par le patient, (ii) une traçabilité supplémentaire partielle pour les pharmaciens et hospitaliers et (iii) une traçabilité totale pour le fabricant.<sup>15</sup> Ce modèle a l'avantage d'être difficilement reproductible par des fabricants mal intentionnés, outre le fait qu'il est coûteux à copier.

Aux états Unis depuis 2017 la « drug supply chain security act » demande aux fabricants d'identifier chaque emballage par un numéro d'identification, un numéro de série, un numéro de lot, et une date d'expiration. En Europe, les compagnies qui fabriquent ou vendent des médicaments se doivent avant fin 2019 d'ajouter sur chaque boîte un numéro d'identification unique permettant leur identification si besoin à n'importe quel moment.<sup>49</sup> On parle alors de sérialisation des produits de santé. Parmi ces techniques d'identifications, on reporte également l'insertion de codes-barres 2D, l'insertion de codes numériques standardisés (binaires), ainsi que étiquettes à identification radiofréquence (RFID). Ce genre de technologies permettrait l'identification rapide des produits à l'aide de simples bases de données ou de scanner portables. Pourtant, il est régulièrement évoqué que ce genre de système

facilement détournable ne pourrait éradiquer au maximum qu'entre 35 et 50% de la contrefaçon mondiale.

Des technologies plus récentes visent même à introduire des traceurs colorés non toxiques, dans un premier temps au sein de l'emballage, et, dans un second temps au sein même du médicament. Des systèmes de nano-encryptages existent également.<sup>50</sup> Cependant, il est légitime de s'interroger quant à la possibilité d'insérer ce genre de dispositifs dans toutes les régions du monde, sachant que dans certains pays les pharmaciens ne sont pas autorisés à ouvrir les emballages et donc ne seraient pas capable de conclure quant à la qualité du produit. La charge incomberait donc au patient, qui ne serait pas toujours en mesure d'avoir les dispositifs nécessaires pour l'authentification. Ce genre de développement prometteur est encore en voie de développement mais ne semble pour l'instant pas forcément adapté aux populations visées.

Pour lutter contre les travers d'internet, en Europe depuis juillet 2015, les revendeurs de médicaments se doivent également d'ajouter sur leurs sites un logo avec un lien hypertexte précisant que le site est légal (Figure 9)



Figure 9 : Logo européen prouvant l'intégrité d'un site revendant des produits de santé

#### 1.1.4.3 Le développement des méthodes analytiques

En parallèle de l'avancée technologique au niveau de la protection des produits, et de leurs emballages, les avancées des méthodes analytiques permettent de remonter à des informations extrêmement précises à différents niveaux. Une grande partie de ces techniques analytiques ont été présentées dans la première partie de ce manuscrit et ne seront pas reprises ici, cependant dans le cas de médicaments certaines sont plus adaptés ou plus spécifiques. Au-delà des techniques analytiques souvent lourdes et complexes développées en laboratoire, la tendance actuelle est de proposer des techniques analytiques directement *in situ*. Au travers de la Figure 10 représentant le schéma complet d'une enquête judiciaire, on voit la nécessité d'une complémentarité à 4 niveaux entre les systèmes de protections, d'analyses, d'informations et d'investigations criminelles.

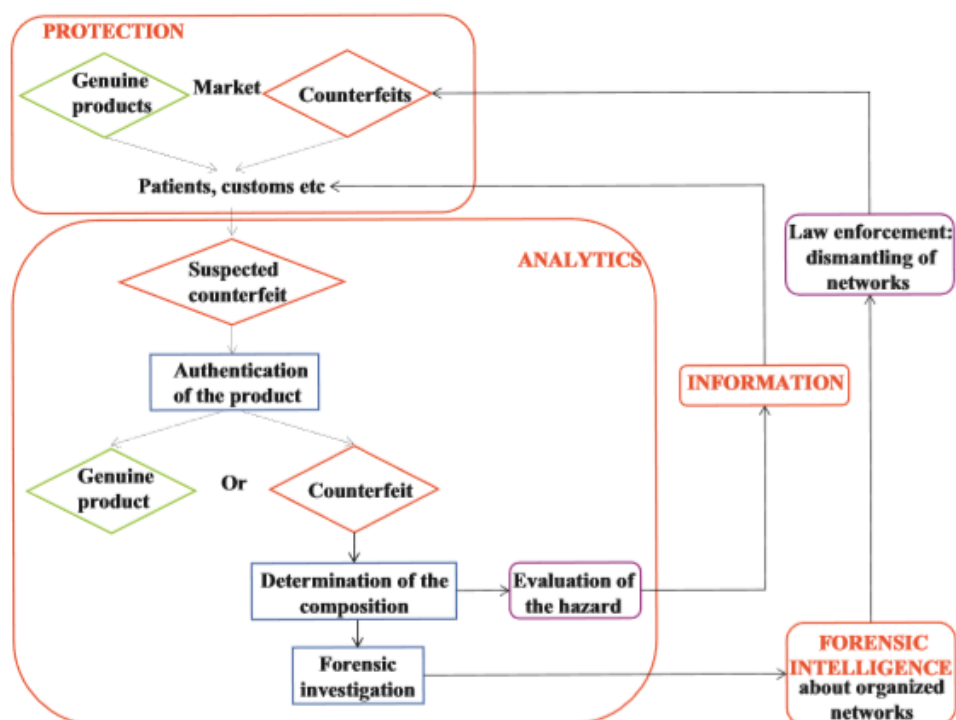


Figure 10 : Stratégies pour lutter contre le marché des médicaments contrefaits. Extrait de la référence 15.

Ce schéma et plus particulièrement la complémentarité directe entre les systèmes d'analyse et ceux d'informations justifient parfaitement la nécessité d'avoir des instrumentations compatibles avec les sites d'utilisation, dans le but d'apporter une réponse en direct aux enquêteurs. Ces techniques n'ont pas pour but de remplacer les techniques utilisées en laboratoire, mais elles doivent permettre à du personnel non scientifique de prendre une décision binaire (conforme/non conforme) en peu de temps quand une simple inspection visuelle n'est pas suffisante. Pour se faire, plusieurs outils existent depuis quelques années, on reporte par exemple l'utilisation du GPHF-Minilab, basé sur 4 étapes triviales d'utilisation (inspection visuelle, désintégration, test colorimétrique, analyse CCM),<sup>51-52</sup> mais également celle d'un outil appelé CD3, basé sur la mesure et la comparaison à un étalon de la fluorescence induite.<sup>53-54</sup>

Outre ces 2 outils très simples d'utilisation, ou encore, d'autres méthodes telles que celles basées sur la mobilité ionique<sup>55</sup> pour des composés organiques ou sur la fluorescence à rayon X pour des composés inorganiques, la majorité des techniques portatives en développement sont basées sur des approches spectroscopiques comme par exemple l'IR ou le NIR.<sup>56-57</sup> Pour ces techniques, l'intérêt principal est la capacité d'analyser les substances au travers même de leurs emballages. Outre cet avantage, les techniques spectroscopiques permettent également d'atteindre des informations comme le polymorphisme, le degré de cristallinité ou encore la porosité des formes solides.<sup>57</sup> Parmi les techniques spectroscopiques, c'est quand même le Raman qui est l'outil le plus reporté pour la

détection directement sur site.<sup>58</sup> Cependant, en plus de la baisse inhérente de sensibilité associée aux techniques portatives, ces approches spectroscopiques ne permettent pas de quantifier et nécessitent le plus souvent des analyses chimométriques complémentaires associées à l'utilisation de bases de données, pouvant engendrer des faux positifs/négatifs.

Concernant les méthodes chromatographiques, prédominantes pour l'analyse de médicament en laboratoire,<sup>59</sup> deux problèmes majeurs émergent pour leur utilisation sur site, le premier est l'extrême difficulté à miniaturiser ce genre d'instrumentation et le second est la nécessité de travailler avec des solvants purs ce qui est parfois difficile dans les laboratoires des pays émergents ou pour les analyses sur site.

Une méthode alternative intéressante dans le domaine des techniques séparatives est l'électrophorèse capillaire. En effet, les développements récents de cette technique, dont le principe repose sur une séparation des espèces ioniques sous l'influence d'un champ électrique, ont permis la « miniaturisation » de l'instrumentation. Cette miniaturisation et la simplicité de mise en œuvre rendent l'électrophorèse capillaire compatible avec des environnements initialement inadéquats. De plus, le développement des modules de détections, permettent de faire de cette technique, un outil portable, efficace pour lutter contre les problématiques de contrefaçon.<sup>60-61</sup>

Comme évoqué dans le premier chapitre, la RMN semblait également être un candidat intéressant à l'étude matrices pharmaceutiques, bien que la portabilité de cette instrumentation soit encore utopique, l'évolution récente des spectromètres à bas champ constitue une avancée significative dans cette voie, et rend de plus en plus compatible leur utilisation dans des environnements de travail initialement inadéquat.

## 1.2 La RMN à bas champ

### 1.2.1 L'intérêt de la RMN à bas champ

Comme nous l'avons discuté dans la première partie, la RMN à haut champ est une technique centrale dans l'analyse pharmaceutique. En effet, les spectromètres RMN basés sur l'utilisation d'aimants supraconducteur extrêmement stables opérant à des champs magnétiques de plus en plus élevés procurent des informations permettant l'élucidation de problématiques de plus en plus complexes. Cependant cette course aux hauts champs magnétiques, nécessite la création d'aimants extrêmement encombrant et onéreux,<sup>62</sup> générant des champs magnétiques de l'ordre de 30 T interdisant leur installation dans des laboratoires quelconques et nécessitant donc l'utilisation d'une pièce dédiée à leur emploi. A titre d'exemple le spectromètre 1 GHz implanté au Centre de Résonance



Magnétique Nucléaire à très haut champ (CRMN) de Lyon a coûté 18 M d'euros dont 11 M d'euros pour le spectromètre lui-même. Le développement récent d'aimants permanents ne nécessitant pas d'entretien cryogénique correspond parfaitement aux attentes de laboratoires où les études menées ne nécessitent pas forcément l'utilisation d'un spectromètre à haut champ. De plus ces aimants ont de nos jours atteint un niveau de perfectionnement suffisant pour produire un champ magnétique  $B_0$  suffisamment stable pour résoudre la dimension en fréquence et suffisamment blindés pour être installés sous une hotte ou bien à proximité de n'importe quel type d'instrumentation. Pour toutes ces raisons, la RMN de paillasse à bas champ, se révèle être bien adaptée aux problématiques abordées dans ce manuscrit,<sup>63-64</sup> ainsi qu'à des problématiques de chimistes de synthèse<sup>63</sup> ou encore d'enseignement.<sup>65</sup>

## 1.2.2 Le développement technologique

### 1.2.2.1 Caractéristiques techniques

Les aimants permanents existent depuis plusieurs décennies, à l'origine ces aimants étaient aussi imposants que les aimants supraconducteurs de nos jours. Ils étaient principalement utilisés pour des mesures de relaxométrie et ne pouvaient être utilisés uniquement que dans un domaine temporel *a contrario* de la RMN conventionnelle aujourd'hui, la RMN à transformée de Fourier. Les différentes tentatives pour réduire la taille de ces aimants n'a conduit qu'à des pertes d'homogénéité et de résolution. L'intérêt récent associé aux efforts menés par les différents fournisseurs dans le développement des techniques portatives et tout particulièrement la RMN a abouti à la création d'aimants permanents permettant l'acquisition de spectres avec une résolution inférieure à la partie par million.<sup>66</sup> A l'heure actuelle, il existe deux arrangements retrouvés pour ces aimants permanents. Le 1<sup>er</sup> consiste en deux pôles magnétiques arrangés de façon parallèle à l'intérieur d'un attelage ferreux. La quantité et le type de matériel magnétique utilisés dans les pôles magnétiques ainsi que l'espacement entre ces pôles détermine le champ magnétique statique  $B_0$  résultant (Figure 11A). L'échantillon viendra se loger dans une bobine radiofréquence (RF) de forme solénoïde de telle sorte que le champ magnétique induit par cette bobine soit perpendiculaire au champ permanent  $B_0$ . L'autre arrangement qui est de nos jours le plus développé dans les RMN dites de paillasse est l'arrangement de type Halbach.<sup>67-68</sup> Dans ce cas, les deux pôles sont remplacés par une série de petits blocs magnétiques polarisés qui sont arrangés de façon circulaire (Figure 11B). La direction de la polarisation de chaque bloc est légèrement recourbée de façon à s'adapter au bloc voisin. Les blocs sont associés les uns aux autres de façon à former un aimant cylindrique, permettant l'insertion d'un tube RMN où le champ magnétique  $B_0$  statique est perpendiculaire au tube. Dans ce cas la bobine RF est directement à l'intérieur de l'aimant générant là encore un champ magnétique induit ( $B_1$ )

perpendiculaire au champ  $B_0$ . Des améliorations notables sur ce dernier design sont reportées ces dernières années, notamment au niveau de la capacité d'homogénéiser le champ magnétique autour de l'échantillon (Shim). La boucle centrale procure le champ magnétique statique quand le déplacement des boucles extérieures suivant l'axe z est utilisé pour shimmer l'échantillon de façon axiale. L'association de ce système de shims mécaniques à des bobines de shims électriques permet l'obtention de champs magnétiques extrêmement stables.<sup>69-70</sup>

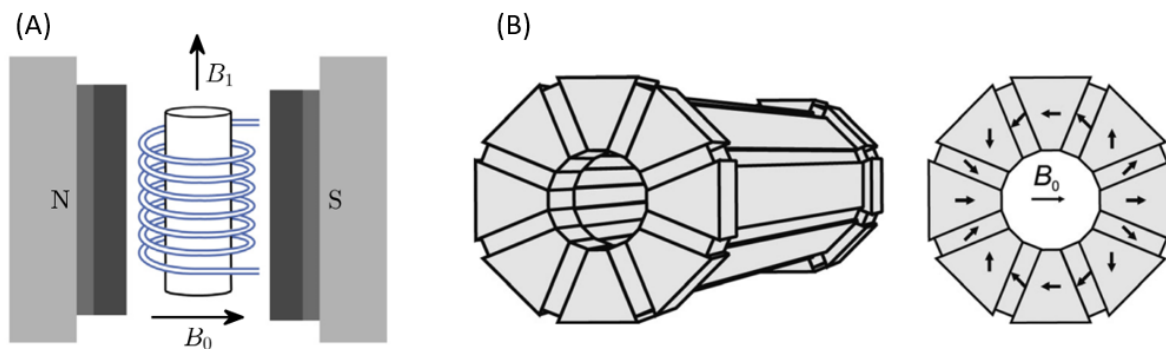


Figure 11 : Configuration des aimants permanents. (A) plaque parallèles,  $B_0$  est suivant l'axe z entre les deux pôles (notés N et S). Les bobines de shims (gris) et celles de gradients (gris foncé) peuvent être ajoutées. L'échantillon est placé dans la bobine radiofréquence (bleu) générant un champ  $B_1$  perpendiculaire à  $B_0$ . (B) Design de type Halbach combinant des blocs magnétiques trapézoïdaux avec des liens rectangulaires. La partie gauche représente seulement la vision en 3D de l'aimant, la partie droite représente l'arrangement nécessaire de chaque bloc pour générer un champ  $B_0$  homogène dans l'aimant. Extrait des références 64 (A) et 66 (B).

Quel que soit l'arrangement choisi, les aimants permanents à bas champ utilisés en transformée de Fourier possèdent des caractéristiques communes, ils génèrent tous un champ homogène entre 1 et 2 T (soit une fréquence de résonance du proton variant entre 43 et 82 MHz). Aucun d'entre eux ne requiert non plus d'entretien cryogénique. Ils partagent par contre tous un défaut, qui est leur thermo-sensibilité. En effet, les fournisseurs procurant le produit le plus stable vis-à-vis de facteurs environnementaux demandent quand même une variation de température maximale de 2°C/h dans la pièce où opère le spectromètre, quand les plus exigeant demandent une variation de l'ordre de 0,5°C/h. Cela vient du fait que ces aimants sont construits avec des alliages thermosensibles. Les 2 alliages les plus retrouvés sont l'association Neodyme-Fer-Bore (NdFeB) et l'association Samarium-Cobalt (SmCo). Bien que ce dernier ait une thermo-sensibilité plus faible, des précautions importantes sont à prendre tant au niveau du fabricant que de l'utilisateur. Ces spectromètres offrent également la capacité de contrôler la stabilité temporelle du champ magnétique au travers d'un système de « lock » interne ou externe.

### 1.2.2.2 Comparaison du marché

A l'heure actuelle il existe 4 fournisseurs Magritek, Nanalysis, Oxford Instrument et Thermo FisherScientific (Figure 12), mettant à disposition des spectromètres. Les solutions les plus innovantes à ce jour sont celles proposées par Magritek qui propose 3 spectromètres de paillasse différents. Bien que les spectromètres des différents fournisseurs possèdent des caractéristiques communes, ils peuvent tout de même être différenciés sur de nombreux points comme l'homogénéité du champ, sa stabilité, les noyaux étudiables, les systèmes de lock, le poids de la machine, la capacité d'utiliser le système en flux ou pas... Ces caractéristiques sont récapitulées et comparées dans les références suivantes.<sup>63, 71</sup>



Figure 12 : Spectromètres de paillasse actuellement disponibles sur le marché. (A) spinsolve de Magritek,<sup>72</sup> (B) NMReady de Nanalysis,<sup>73</sup> (C) Pulsar de Oxford Instrument,<sup>74</sup> (D) PicoSpin de Thermo FisherScientific.<sup>75</sup> Adapté des références 72, 73, 74 et 75.

Grâce aux avancées technologiques et donc à la capacité de ces spectromètres à faire un spectre RMN à transformée de Fourier, la RMN de paillasse permet désormais l'étude de divers noyaux, allant des plus classiques :  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  jusqu'à des noyaux plus inhabituels tels que le  $^7\text{Li}$  ou encore le  $^{11}\text{B}$ .<sup>63</sup> Dernièrement deux études ont été reportées sur l'utilisation d'hyperpolarisation par des parahydrogènes avec échange réversible (SABRE) pour l'étude de noyaux de faible abondance naturelle ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) ou bien pour simplement accroître la sensibilité de détection de noyaux plus conventionnels.<sup>76-78</sup> La capacité de ces spectromètres à sonder différents noyaux, diversifie les applications possibles de la RMN à bas champs, la rendant utilisable dans un grand nombre de domaines de recherche et pour diverses d'applications. De plus, l'étude de noyaux spécifiques tels que

le fluor-19 et le phosphore-31, dont l'importance dans l'industrie pharmaceutique la métabolomique, et la lipidomique n'a plus besoin d'être démontrée, se révèle comme une alternative non négligeable. En effet, leurs propriétés magnétiques sont favorables, ils possèdent un spin de  $\frac{1}{2}$ , une abondance naturelle de 100% et des rapports gyromagnétiques importants de respectivement 94 et 41% en comparaison du proton, ce qui permet l'obtention de spectres avec une plus grande largeur spectrale et donc moins de recouvrements de signaux.<sup>79-80</sup> Sur les versions commercialement disponibles, de nombreuses séquences dites « multi-pulses » sont d'ores et déjà disponibles.<sup>63</sup> Les appareils équipés de sondes multi-canaux ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ...) permettent l'enregistrement de séquences utilisant un transfert de polarisation d'un noyau sensible (généralement le proton) vers un noyau qui l'est moins. C'est principalement le cas des séquences Inensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfert (INEPT), et Distortionless Enhancement by Polarization Transfert (DEPT). De plus les efforts menés par les constructeurs pour protéger ces aimants des facteurs environnementaux procurent à ces aimants une stabilité temporelle remarquable, permettant l'acquisition de corrélogrammes. Ces derniers permettent régulièrement de pallier le recouvrement important obtenu sur un spectre 1D  $^1\text{H}$ . L'expérience J-résolue (J-Res) est certainement la plus représentative de ce phénomène, elle permet en même temps de mesurer précisément les constantes de couplage d'un système tout en conduisant à la reconstitution virtuelle d'un spectre homodécouplé, en réalisant un tilt de  $45^\circ$  sur les multiplets, permettant de s'affranchir des constantes  $J_{\text{HH}}$ . A titre d'exemple cette séquence a déjà été utilisée pour différencier des énantiomères dans un gel de gélatine par RMN à 1T.<sup>81</sup> De nombreuses autres expériences « bi-dimensionnelles » sont disponibles, tant en proton qu'en fluor sur les spectromètres commerciaux, c'est principalement le cas de séquences de corrélations homonucléaires, telle que la COrrrelation SpectroscopY (COSY) et la Total COrrrelation SpectroscopY (TOCSY).

D'autres expériences permettant de cribler les couplages scalaires de distances variables sont également disponibles, cependant la majorité des spectromètres bas-champ (excepté le Magritek opérant à 43 MHz) ne sont pas équipés de bobines de gradients, rendant la sélection de cohérence complexe, lors de l'utilisation des séquences dites inverses, induisant des temps d'acquisitions relativement long. Les séquences directes utilisées telles que l'HETCOR (HETeronuclear Correlation) prennent régulièrement plusieurs heures même sur un composé pur et fortement concentré. L'implémentation de bobines de gradients a notamment permis l'implémentation de séquences inverses telle que l'HSQC permettant l'acquisition de la même information en 30 fois moins de temps. En 2017 Singh et Blümich ont exploité les capacités de ces spectromètres pour faire l'élucidation structurale complète sur de la strychnine utilisée en temps qu'adultérant.<sup>82</sup>

Bien sûr ces nouvelles technologies permettent également la mesure de temps de relaxation, qu'ils soient transversaux à l'aide d'une CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) ou bien longitudinaux à l'aide d'une séquence d'inversion récupération (InvRec).

## 1.2.3 Performances et limites

### 1.2.3.1 Sensibilité et résolution

Ces dernières années le développement rapide des spectromètres de paillasse, ouvre le champ à de nombreuses opportunités. Cependant la diminution en champ induit des réductions intrinsèques des performances analytiques. En effet, la fréquence de précession d'un noyau est directement liée au champ magnétique statique  $B_0$  par la relation  $\nu = \gamma \cdot B_0 / 2\pi$  (avec  $\gamma$ , le rapport gyromagnétique). De fait, l'amplitude du signal RMN décroît quand le champ magnétique décroît. En plus de la perte de sensibilité liée à la baisse du champ magnétique, la diminution de l'étalement en fréquence associée au fait que les valeurs de déplacements chimiques tout comme les valeurs de constantes de couplages sont inchangées en fonction du champ, conduit à des spectres fortement recouverts. En d'autres termes, deux massifs peuvent être clairement séparés à haut champs quand ils ne le seront que très peu à bas champ. Les performances de ces nouveaux aimants conduit cependant à des pics suffisamment fins (< 1Hz de largeur à mi-hauteur) pour permettre la caractérisation de petites molécules, malgré la faible fenêtre spectrale (en Hz) à bas champ.

Ces dernières années, des sensibilités permettant l'obtention d'un rapport signal sur bruit (SNR) de 200 000 sur de l'eau pure en un seul scan, autorisent les utilisateurs à travailler sur des échantillons à des concentrations de l'ordre de quelques milli-molaires.<sup>66</sup> Cette sensibilité reste cependant un point discutable. En effet, bien que ce chiffre apparaisse régulièrement et reflète les performances atteintes par ces instrumentations, la question de stabilité n'était jusqu'à très récemment que très peu discutée mais reste de prime importance. Au vu des applications ciblées, ces spectromètres se doivent de fournir une sensibilité importante pendant une longue période de temps, pourtant jusqu'alors il n'a jamais été décrit précisément l'action de facteurs environnementaux sur cette valeur de sensibilité. En règle générale, les spectromètres bas champs procurent une sensibilité et une résolution suffisante pour conclure quant à la structure d'une substance pharmaceutique même faiblement concentrée. C'est majoritairement vrai lorsqu'on parle de petites molécules, cependant lorsque les poids moléculaires et donc la taille des molécules augmentent la situation se complexifie du fait d'un recouvrement parfois très important des signaux.<sup>83</sup> En plus des problématiques de recouvrement, on rencontre régulièrement des problématiques pour les molécules présentant une longue chaîne aliphatique, ou des motifs répétés (tels que les sucres ou les acides gras) comme explicité en Figure 13. On voit en effet que la caractérisation de petites molécules est totalement réalisable à bas champ et que l'ensemble des protons peuvent être attribués (Figure 13A versus Figure 13A') comme ils le sont

à haut champ. Cependant la faible résolution induite, ne permet pas la différenciation de motif avec des environnements électroniques semblables. (Figure 13B versus Figure 13B').

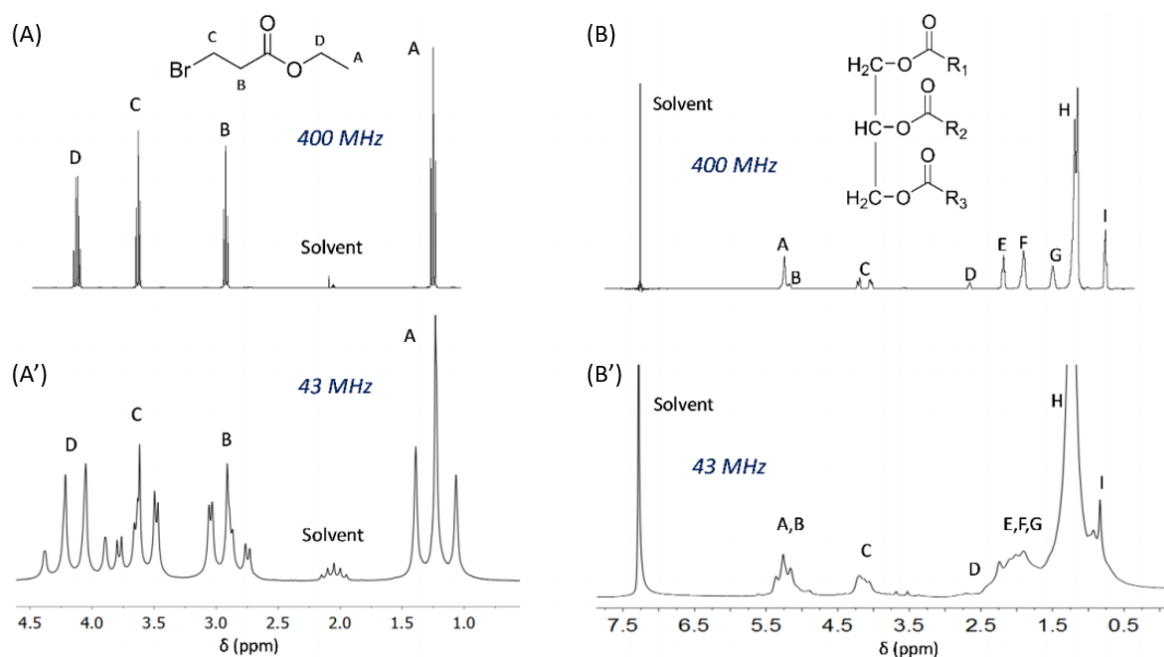


Figure 13 : A & A' Spectres respectivement haut champ (400 MHz) et bas champ (43 MHz) du 3-Bromo-ethylpropionate enregistré en 1 scan dans de l'acétone- $d_6$ . B et B' Spectres respectivement haut champ (400 MHz) et bas champ (43 MHz) d'une l'huile de noisette enregistrée en 1 scan dans du chloroforme non deutéré. Extrait de la référence 83.

Un autre problème intrinsèque à la RMN bas champ est la quasi obligation de travailler sur des fenêtres spectrales très grandes. En effet, la relation permettant de lier le temps d'acquisition à la largeur spectrale :  $AQ = TD/SW$  (ou AQ est le temps d'acquisition, TD est le nombre de points, et SW la largeur spectrale en Hz), montre que pour un même temps d'acquisition et un nombre de point fixe la largeur spectrale, sera différente en fonction du champ utilisé. Ainsi, si par exemple on opère dans un cas à 60 MHz et dans un autre à 500 MHz, que l'on fixe un temps d'acquisition à 1,6 s et que le spectre est enregistré en 32 000 points. A 500 MHz, la largeur spectrale sera donc de 40 ppm, alors qu'à bas champ on travaillera sur 333 ppm. De fait, si l'on veut travailler sur des largeurs spectrales plus restreintes, les temps d'acquisitions devront être considérablement augmentés ou le nombre de point devra être restreint, induisant respectivement l'enregistrement important de bruit ou une faible résolution.

### 1.2.3.2 Les couplages forts

#### 1.2.3.2.1 Éléments de théorie

La RMN telle que je l'ai présentée jusqu'ici s'opère dans l'approximation des couplages faibles. La majorité des problématiques abordées dans le paragraphe précédent, sont d'autant plus accentuées par la présence de couplage fort. En effet, quand la différence de déplacement chimique

( $\Delta\nu$ ) entre deux atomes couplés est du même ordre de grandeur que la constante de couplage qui les lie : soit  $\Delta\nu \approx J$ , des couplages du second ordre (également appelés couplages forts) apparaissent. A bas champ, pour un simple système de spin, comme l'étalement en fréquence diminue avec le champ et que les constantes de couplages sont indépendantes du champ magnétique, il en résulte la présence très répandue de couplages forts. Cela peut être problématique notamment lors de la mise en œuvre d'expériences 2D, du fait de l'apparition d'artéfacts de couplages forts lorsque des impulsions  $180^\circ$  sont appliquées sur des systèmes fortement couplés.<sup>84</sup> Cela vient d'un transfert de cohérence partiel, et malheureusement ces artéfacts ne peuvent être supprimés ni à l'aide d'un cycle de phase adapté ni à l'aide de gradients.

Pour aborder une compréhension globale du phénomène de couplage fort, il est important d'en faire une description théorique, cette approche n'étant pas le cœur du sujet nous en garderons une vision généraliste. Le plus simple est d'étudier un système de 2 protons magnétiquement inéquivalents fortement couplés entre eux, c'est à dire un système AB dans la nomenclature de Pople.

L'hamiltonien décrivant le phénomène de résonance magnétique nucléaire peut s'écrire de la façon suivante :  $\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_J$ , où  $\hat{H}_z$  correspond à l'influence de l'effet Zeeman. C'est-à-dire l'induction par le champ magnétique appliqué de la levée de dégénérescence des états de spin nucléaire sur chacun des atomes.  $\hat{H}_J$  permet quant à lui d'introduire le couplage scalaire entre noyaux magnétiques.

De façon générale  $\hat{H}_z$  et  $\hat{H}_J$  s'expriment ainsi :

$$\hat{H}_z = \sum_i -\gamma B_0(1 - \sigma) \hat{I}_{zi} = \sum_i 2\pi\nu_i \hat{I}_{zi}$$

$$\hat{H}_J = \sum_{i>j} \sum 2\pi J_{ij} \hat{I}_i \hat{I}_j$$

Il convient ensuite de résoudre l'équation de Schrödinger indépendante du temps. On va ici s'épargner des développements fastidieux, mais en pratique, développer cet hamiltonien pour un système AB revient à l'exprimer dans la base de 4 fonctions produits :  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha$ , et  $\beta\beta$  sous forme d'une matrice 4x4. Les états de spins nucléaires et leurs énergies s'obtiennent par diagonalisation de cette matrice. Après avoir divisé par la constante de Planck de façon à obtenir directement des fréquences, elle a pour expression :

$$\begin{array}{c}
 \alpha\alpha \\
 \alpha\beta \\
 \beta\alpha \\
 \beta\beta
 \end{array}
 \begin{bmatrix}
 \alpha\alpha & \alpha\beta & \beta\alpha & \beta\beta \\
 -\frac{\nu_1}{2} - \frac{\nu_2}{2} + \frac{J}{4} & 0 & 0 & 0 \\
 0 & -\frac{\nu_1}{2} + \frac{\nu_2}{2} - \frac{J}{4} & \frac{J}{2} & 0 \\
 0 & \frac{J}{2} & +\frac{\nu_1}{2} - \frac{\nu_2}{2} - \frac{J}{4} & 0 \\
 0 & 0 & 0 & +\frac{\nu_1}{2} + \frac{\nu_2}{2} + \frac{J}{4}
 \end{bmatrix}$$

Dans cette matrice que l'on peut décrire comme diagonale par bloc, nous avons directement accès aux termes d'énergie associés aux états  $\alpha\alpha$  et  $\beta\beta$ .

Il en résulte que les états  $\alpha\beta$  et  $\beta\alpha$  qui ont le même moment magnétique de spin nucléaire total vont se mélanger via les termes  $H_{23}$  et  $H_{32}$ .

Un changement de base approprié permet de rendre la matrice diagonale par la rotation :

$$\Psi_2 = |\alpha\beta\rangle \cos \theta + |\beta\alpha\rangle \sin \theta$$

$$\Psi_3 = |\beta\alpha\rangle \cos \theta - |\alpha\beta\rangle \sin \theta$$

Les coefficients diagonaux dans la nouvelle base  $\alpha\alpha$ ,  $\Psi_2$ ,  $\Psi_3$ ,  $\beta\beta$  donnent donc directement accès aux énergies, puisque  $\hat{H}$  est dorénavant diagonal dans cette base. Les énergies associées aux états  $\Psi_2$  et  $\Psi_3$  sont chacune modifiées même si ces 2 états gardent des moments de spin nucléaire nuls ( $\sum m_i = 0$ ). (Figure 14)

Dans un tel cas l'angle  $\theta$  est appelé le paramètre de couplage fort et est défini par l'équation :

$$\sin 2\theta = \frac{J_{AB}}{D} \quad \text{avec} \quad D = \sqrt{(\nu_A + \nu_B)^2 + J_{AB}^2}$$

En pratique comme le paramètre  $D$  peut se révéler complexe à calculer, on pose que  $\tan 2\theta =$  valeur absolue  $|J/\Delta\nu|$ , où les effets de couplages fort peuvent être appréciable lorsque  $J/\Delta\nu (= \tan 2\theta) > 0.1$ .



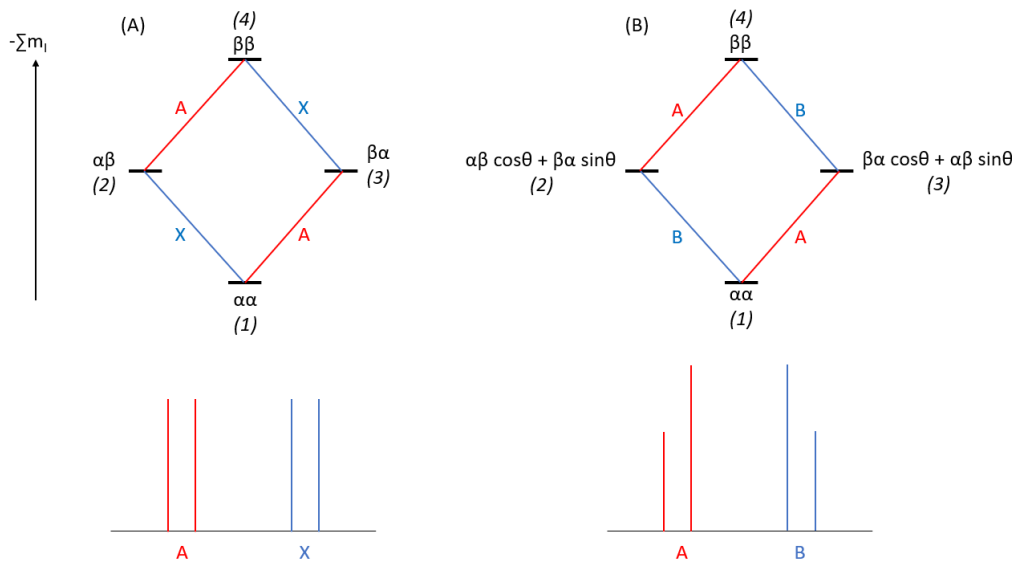


Figure 14 : Schématisation des transitions et des spectres résultants dans un système (A) AX ; (B) AB. Les états de spin sont reportés en fonction de l'opposé du moment magnétique de spin nucléaire total.

Notons que dans le cas d'un couplage faible c'est-à-dire  $\Delta\nu \gg J$ , les expressions des énergies se simplifient.

On veut également avoir accès aux intensités des raies pour comprendre l'effet de toit, dans ce cas on peut faire intervenir un opérateur transition, permettant de calculer le moment de transition et donc la probabilité qu'une transition se fasse, donnant directement accès aux intensités.

En prenant en compte la règle de sélection disant qu'une seule inversion de spin peut se faire à la fois (cf. transition A ou B/X dans la Figure 14) il en résulte 4 transitions possibles pour les couplages forts et les couplages faibles dont les fréquences et les intensités sont données dans le Tableau 2 ci-après. Quand ce nous avons l'habitude d'étudier à haut champs correspond au Tableau 3.

Tableau 2 : Fréquences et Intensités de transitions autorisées dans un système de spin type AB,  $\Sigma = \nu_A + \nu_B$ . (1), (2), (3) et (4) sont associés respectivement aux états de spins 1, 0, 0, -1.

Spin	Transition	Fréquence	Intensité
A	(1) → (3)	$-\frac{1}{2}D - \frac{1}{2}\Sigma - \frac{1}{2}J$	$1 - \sin 2\theta$
A	(2) → (4)	$-\frac{1}{2}D - \frac{1}{2}\Sigma + \frac{1}{2}J$	$1 + \sin 2\theta$
B	(1) → (2)	$+\frac{1}{2}D - \frac{1}{2}\Sigma - \frac{1}{2}J$	$1 + \sin 2\theta$
B	(3) → (4)	$+\frac{1}{2}D - \frac{1}{2}\Sigma + \frac{1}{2}J$	$1 - \sin 2\theta$

Tableau 3 : Fréquences et Intensités des transitions autorisées dans un système de spin type AX,  $\Sigma = \nu_A + \nu_B$ . (1), (2), (3) et (4) sont associés respectivement aux états de spins 1, 0, 0, -1.

Spin	Transition	Fréquence	Intensité
A	(1) → (3)	$\frac{1}{2}\Sigma - \frac{1}{2}J$	1
A	(2) → (4)	$\frac{1}{2}\Sigma + \frac{1}{2}J$	1
X	(1) → (2)	$\frac{1}{2}\Sigma - \frac{1}{2}J$	1
X	(3) → (4)	$\frac{1}{2}\Sigma + \frac{1}{2}J$	1

L'association de l'expression d'une fréquence à une intensité nous permet une description précise du passage d'un système AX vers un système AB. En effet plus le couplage est fort, plus l'effet de toit est grand, c'est-à-dire la différence d'intensité entre les raies centrales et les raies externe est prononcé, comme explicité dans le Tableau 2. Bien que cet effet de toit puisse quand même parfois être utilisé comme une piste à l'identification de couplage entre 2 noyaux, Il peut également rapidement évoluer vers des multiplets dont l'analyse *a priori* est impossible, comme illustré dans la Figure 15. De plus cela peut régulièrement conduire à des attributions erronées. En effet bien que les raies extérieures donnent bien une valeur de constante de couplage mesurable, il n'est pas possible de mesurer directement la fréquence de résonance des noyaux A ou B d'un massif aussi fortement couplé.

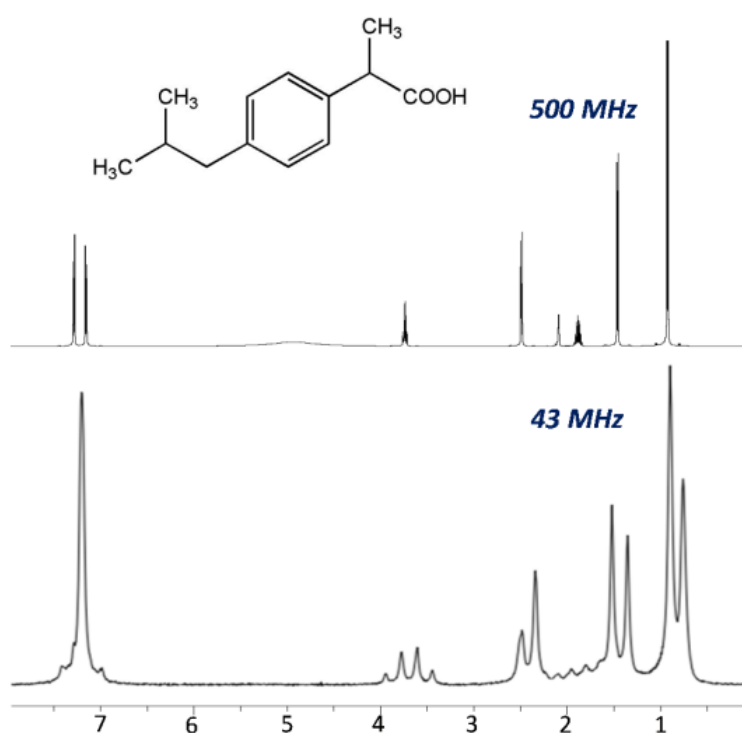


Figure 15 : Spectre RMN 1D <sup>1</sup>H de l'ibuprofène enregistré à 500 MHz (en haut) et à 43 MHz (en bas). L'effet des couplages fort rend inexploitable la zone des protons aromatiques (~7.1 ppm). Extrait de la référence 83.

#### 1.2.3.2.2 Les couplages virtuels

Une autre problématique fréquemment rencontrée à bas champ, est celle des couplages virtuels.<sup>85</sup> Elle peut se résumer par l'apparition de fausses informations de couplages sur des systèmes non couplés, tels que ceux observés dans des systèmes ABX<sub>3</sub> montrés en Figure 16. Le modèle d'un système AB utilisé jusqu'alors ne suffit pas pour décrire ce phénomène étant donné qu'il apparait dans un cas où au moins 3 spins sont impliqués. En effet, quand au moins 2 protons sont fortement couplés alors n'importe quel autre proton couplé à l'un d'entre eux et supposé donner un couplage simple, conduit à un multiplet avec des informations inattendues et parfois non compatibles avec une analyse

directe. Ce phénomène a été très rapidement mis en évidence après les premières utilisations d'un spectromètre RMN.<sup>86</sup> Depuis la présence de ces couplages virtuels donne lieu à de nombreuses complications pour la caractérisation structurale.<sup>87</sup> Les exemples les plus fréquemment rencontrés sont ceux de l'influence d'un système fortement couplé sur un méthyle. En RMN les méthyles donnent souvent lieu à des multiplets simples cependant s'ils sont couplés à un proton déjà impliqué dans un couplage fort, nous observons une complexification de la multiplicité donnant lieu à des signaux difficilement exploitables (Figure 16). On remarque sur cette figure que lorsque  $\Delta\nu \leq J_{AB}$  (10 Hz), le doublet correspondant au méthyle se complexifie grandement de fait de son couplage avec un des protons impliqués dans le couplage fort (AB). Lorsqu'on arrive à la dégénérescence accidentelle ( $\Delta\nu = 0$ ) la multiplicité du système est totalement ininterprétable avec les notions classiquement utilisées. Il est là aussi possible d'écrire un hamiltonien de spin pour un tel système, mais cela va au-delà du travail présenté ici.

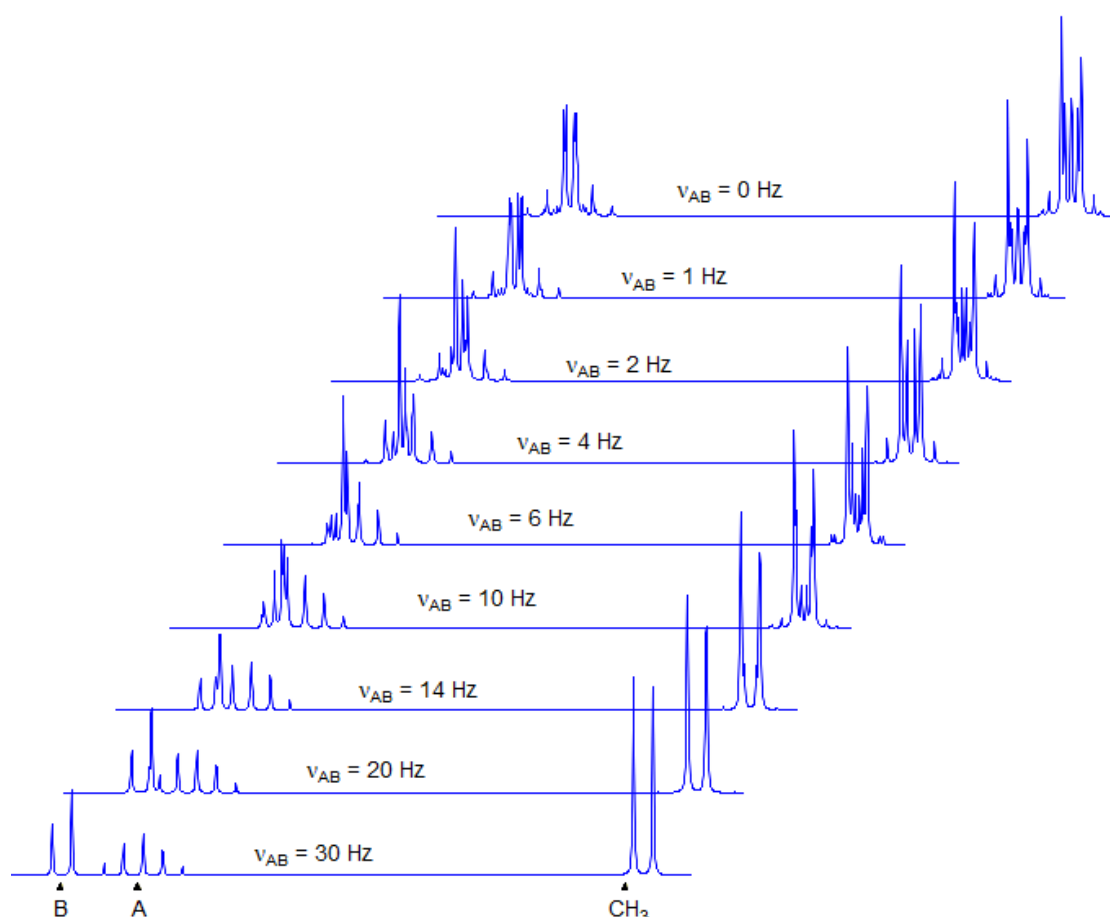


Figure 16 : Couplage virtuel sur un système  $ABX_3$  avec  $X_3 = CH_3$ . Evolution de l'allure du méthyle en fonction de l'écart en fréquence  $\nu_{AB}$  avec  $J_{AB} = 10$  Hz,  $J_{BX} = 7$  Hz et  $J_{AX} = 0$ . Extrait de la référence 85.

## 1.2.4 Les applications de la RMN bas champ

Les champs d'applications de la RMN bas champs sont divers et variés. Dans un premier temps comme nous l'évoquions précédemment les spectromètres à bas champ étaient principalement utilisés pour de la RMN dites de Laplace pour laquelle un champ magnétique parfaitement homogène n'est pas obligatoire et où l'on étudiait principalement des courbes de fits et des décroissances de paramètres tels que les coefficients de diffusion ou bien les temps de relaxation. Cependant depuis le développement d'aimants extrêmement stables, arrivant à produire des champs magnétiques variant de moins de  $2 \cdot 10^{-9}$  T au travers du tube, les champs d'applications se diversifient. Pour imager cette variation extrêmement faible, cela correspondrait à une variation de hauteur maximale de 1 mm sur une route reliant Paris à Francfort (soit environ 600 km).<sup>88</sup> La remarquable homogénéité associée à ces aimants permet de plus leur utilisation dans des domaines tels que les suivis réactionnels et le contrôle qualité.

### 1.2.4.1 Suivi monitoré

Le suivi réactionnel monitoré par des techniques spectroscopiques permet l'obtention d'informations de première utilité pour principalement des chimistes de synthèse mais également pour des bio-chimistes ou des pétrochimistes que ce soit dans le milieu académique ou dans le milieu industriel.<sup>89-90</sup> Ces informations peuvent être en tout genre mais sont principalement des informations quant à la cinétique d'une réaction ou bien des informations utiles à la compréhension d'un mécanisme réactionnel. Peu importe le domaine d'application, la RMN reste une technique possédant une quantité indéniable d'avantages évoqués dans la première partie de ce manuscrit, parmi lesquels sa non-spécificité, son côté non destructeur et sa simplicité de préparation d'échantillon.<sup>91</sup> Outre cela la RMN permet une réponse quantitative inter-espèce, dans diverses matrices. En effet, la RMN permet de lier directement la concentration d'un actif en solution à celle d'une référence grâce à leurs aires respectives, avec la solubilité comme seul pré-requis.<sup>92</sup>

Pour toutes ces raisons, la RMN haut champ a été utilisée dans un large domaine pour le suivi monitoré de réaction.<sup>93-95</sup> Ces études sont parfois menées en tube RMN<sup>95-97</sup> ou bien à l'aide d'un système de capillaire.<sup>91, 94, 98-104</sup> Plus récemment le suivi par RMN en flux a prouvé une efficacité et une utilité indéniable pour les chimistes organiciens.<sup>103, 105-106</sup>

Ces techniques donnant accès à des résultats extrêmement précis et utiles, nécessitent quand même des dispositifs expérimentaux un peu lourd, qui sont lorsque cela est possible volontiers délaissés au profit d'une instrumentation plus adaptée à des applications sur site (ou en laboratoire). Les nouvelles

généralisations de spectromètres de paillasse discutées jusqu'ici remplissent toutes les conditions pour la réalisation d'un suivi réactionnel directement en laboratoire.

#### 1.2.4.2 Travailler sans solvant deutéré

Malgré les avantages que présente la RMN de paillasse face aux problématiques à considérer pour le suivi réactionnel, le problème prépondérant reste l'utilisation de solvants deutérés. En effet, utiliser des solvants deutérés pour faire de la RMN est nécessaire tant pour se locker que pour shimmer facilement l'échantillon. Pourtant il est quasi-inconcevable pour plusieurs raisons d'imaginer le suivi réactionnel en milieu deutéré. La première, triviale, est une raison purement économique mais d'autres aspects plus spécifiques sont à évoquer. En effet, du deutérium même présent en faible quantité peut conduire à un échange avec les protons labiles d'un autre solvant ou pire encore d'un produit d'intérêt, pouvant induire une mauvaise interprétation des résultats tant cinétique que mécanistique. Pour pallier ce problème les constructeurs s'adaptent et certains d'entre eux utilisent à l'heure actuelle des systèmes de lock « externe », permettant l'utilisation de solvants non-deutérés tout en limitant les dérives de champ. Ces efforts technologiques ouvrent grandement le champ d'application possible de ces spectromètres de paillasse.

L'inconvénient de travailler sans solvant deutéré est cependant l'intensité du signal du solvant - dramatiquement intense-. Des signaux aussi intenses sur un spectre RMN rendent son analyse difficile pour 3 raisons principales :

- a) Un recouvrement important dans la zone voisine du pic de solvant.
- b) La saturation du récepteur analogique induit des distorsions de la ligne de base.
- c) La gamme dynamique du récepteur ne permet pas forcément la détection de signaux avec des ordres de grandeurs très différents.

Dans ce contexte, l'implantation de séquences de suppression de solvants prend une importance primordiale, cependant la plupart de ces séquences nécessitent l'utilisation des bobines de gradients, pas encore disponibles sur l'ensemble des spectromètres commerciaux. Gouilleux *et al.*<sup>107</sup> reportent que les séquences de pré-saturations classiques sont moins adaptées pour être employées à bas champ du fait de la difficulté à supprimer le pic du solvant sans impacter les signaux de protons résonnant à des déplacements chimiques proches de celui saturé. Ils montrent alors que l'association d'un bloc WET-180 à un block NOESY semble le plus adapté pour une suppression de solvant efficace sur de tels appareils. Ils notent aussi que pour les réactions en flux les séquences doivent être choisies avec précautions et souvent au cas par cas.

### 1.2.4.3 Différents systèmes monitorés et applications

Il existe différentes façons d'envisager un suivi monitoré de réaction chacun présentant des avantages et des inconvénients, la façon la plus évidente de faire reste de prélever le milieu réactionnel et d'en réaliser le spectre au fur et à mesure que la réaction avance. Cette façon de procéder aussi appelée « at-line » ou « off-line » régulièrement rencontrée en chimie organique, implique d'arrêter la réaction de façon passagère et devient de fait difficilement compatible avec une quelconque automatisation. Une autre façon de procéder, est de réaliser la réaction directement à l'intérieur d'un tube RMN, ce genre d'analyse bien qu'imaginable souffre quand même de deux défauts majeurs. Le premier étant qu'une grande performance tant aux niveaux des réglages que des séquences d'impulsion est nécessaire et le second est le fait que la réaction ne sera pas suivie, pendant le temps nécessaire pour « lancer » l'acquisition RMN. Ce genre d'application est principalement utilisée pour la compréhension de mécanisme.<sup>106</sup> Cependant il ne s'applique qu'à un nombre limité de réactions étant donné que comme nous l'avons discuté ces aimants permanents sont thermosensibles réduisant fortement la quantité d'applications imaginables.

*A contrario* de ces applications en tubes, il se développe de plus en plus de système en ligne (« on-line »), où le système étudié est directement lié au spectromètre par un système de tubulures. Ce montage permet une plus grande amplitude d'utilisation pour le chimiste étant donné qu'il peut travailler sans précaution particulière. Dans ce cas, l'expérimentateur peut donc au besoin et *a contrario* du tube RMN travailler sous atmosphère inerte, sous agitation magnétique et avec des gammes de température variant à sa guise. Dans ce genre de montage en ligne une pompe induit un flux constant entre le milieu réactionnel et le spectromètre RMN, de telle façon qu'après analyse tout retourne dans le milieu réactionnel. Des polymères spéciaux (PEEK = PolyEtherEtherKetone, ou le PTFE = Polytétrafluoroéthylène) inertes, sont communément utilisés pour assurer le transfert. Ce genre de montages procure le grand avantage, en plus d'être en flux continu, de pouvoir contrôler la température au sein même des tuyaux.<sup>108</sup> Un autre avantage de ce système, est qu'il permet un suivi cinétique sans aucune interruption, procurant une grande précision des mesures réalisées.<sup>109</sup> Bien que le suivi cinétique soit précis, il faut tenir compte d'une problématique usuellement plus discutée en chromatographie, qui est celle de la « géométrie du système ». En effet, en fonction de la longueur de tuyaux et du temps d'analyse il y a un écart temporel pouvant induire une erreur variable sur les des mesures.<sup>90, 92, 110</sup> Le débit utilisé devient donc un paramètre primordial à considérer pour la raison précédemment invoquée, mais également pour la qualité des spectres RMN résultants. Comme nous l'avons mentionné précédemment la sensibilité fait partie des problèmes majeurs des spectromètres bas champ. Cependant l'utilisation de système en flux par le biais de tuyaux de diamètres variables maximise le volume sensible et donc permet de travailler sur des faibles quantités à des concentrations

raisonnables. Les caractéristiques de ces systèmes, ont été évaluées à l'aide de simulations et d'expérimentation afin d'évaluer l'impact de paramètres tels que les temps de résidence dans la cellule de mesure et les effets associés au mélange.<sup>111</sup>

Durant la dernière décennie, plusieurs applications ont été décrites. En 2011 Küster et ses associés<sup>70</sup> reportent pour la première fois l'utilisation d'un spectromètre de paillasse (opérant à 0,7 T) pour le suivi monitoré directement sous une hotte. Ils étudient la formation de 2,4,6-triethyl-(1,3,5)-trioxane grâce à la trimérisation du propionaldéhyde catalysé au trichlorure d'indium. Ils justifient la nécessité de travailler sous une hotte du fait la dangerosité des produits de départ et des conditions inertes exigées par la réaction.



Figure 17 : Montage « on-line » pour le suivi réactionnel directement sous une hotte. Extrait de la référence 70.

Leur montage était le suivant (Figure 17), comme décrit dans leur article le mélange réactionnel prélevé directement dans le ballon circule dans les capillaires à l'aide d'une pompe péristaltique, pour entrer par les ouvertures sur le côté du spectromètre et être analysé. Le suivi réactionnel est fait en intégrant le signal décroissant (CHO) de l'aldéhyde de départ laissant place au produit de réaction. Chaque point est mesuré en 80 secondes sur 8 scans. A ce moment-là, les auteurs regrettent la faible sensibilité et l'inhomogénéité du champ délivré par de tels aimants (de design Halbach) nécessitant l'utilisation de produits très fortement concentrés.

L'amélioration impressionnante dans les années suivantes de tels aimants permet à Danieli *et al.* en 2014 d'utiliser un spectromètre opérant cette fois à 1T pour le suivi monitoré d'une réaction de transfert d'hydrogénation à une centaine de milli-molaire.<sup>66</sup> Les profils des courbes cinétiques enregistrés étaient en complet accord avec celles attendues pour une réaction du premier ordre. Dans l'optique d'une automatisation complète, ils reportent un système d'intégration et de correction de ligne de base automatique. Ils reportent également des limites de détection et de quantification impressionnantes sur une analyse en 1 scan de respectivement 3 et 10 mM. Comme principal défaut ils mettent en évidence la difficulté d'utiliser une agitation magnétique si proche d'un aimant. Ils préconisent l'utilisation d'agitateurs mécaniques, ou d'agitateurs par flux d'air. Cette étude met en évidence, la robustesse de ce genre de système pour des applications concrètes à des concentrations plus adaptés que celles présentées précédemment.

Toujours dans le domaine des suivis réactionnels, en 2015 Blümich *et al.*<sup>112</sup> étudient des réactions de trans-estérification pour la production de Biodiesel à 43 MHz, en évaluant entre autre la concentration de méthanol présent dans la phase riche en ester en comparaison de la concentration en méthanol présente dans la phase glycérol. La réaction est suivie par des acquisitions en mono scan toutes les 10 secondes. Après une analyse statistique, le taux de conversion en biodiesel est évalué avec des erreurs annoncées de l'ordre de 1%. En plus d'ouvrir encore plus le champ d'application des réactions monitorées, cette étude montre également la possibilité assez surprenante de réaliser un suivi sur des réactions biphasiques.

Ces nombreuses études mettent en évidence la sensibilité et la robustesse suffisante de tels systèmes pour monitorer des réactions, cependant on est en droit de douter de la capacité de ces spectromètres à suivre des réactions de longues durées, dues aux potentielles dérives de champs entraînés par les facteurs spatiaux et environnementaux qui sont décuplés lors d'une analyse *in situ*. En effet, en laboratoire l'environnement magnétique est souvent défavorable à l'utilisation d'un spectromètre RMN du fait de la présence d'instrumentation métalliques voisine, ainsi que de vibrations mécaniques perturbant la mesure (hotte, agitation magnétique, ultrasons). A ce sujet, une étude de Kreyenschulte met en évidence le suivi monitoré d'une réaction de fermentation sur des lisiers de micro-organismes.<sup>113</sup> Le spectromètre placé directement à proximité du bio-reacteur a permis un suivi réactionnel pendant 23 h avec une acquisition répétée toutes les 15 secondes. Les auteurs montrent alors la robustesse des résultats obtenues en comparaison d'un spectromètre 400 MHz, tant de façons qualitatives que quantitatives, et ceci malgré, aussi bien les potentielles dérives temporelles que celles dues aux nombreux facteurs environnementaux. En effet, les auteurs décrivent un montage très



adapté à l'utilisation d'un spectromètre bas champ mais également très encombré, notamment à cause de la présence de plusieurs pompes (circulation, recyclage de gaz...).

Les publications récentes mettent en évidence la notoriété croissante des systèmes en flux, cependant malgré tous les efforts réalisés pour prouver l'efficacité des spectromètres de paillasse, les problématiques intrinsèques associées à la faible gamme spectrale en Hertz que couvre un tel appareillage limite encore fortement son développement. L'utilisation du carbone-13 semblerait donc être une solution intéressante du fait de l'élargissement de sa gamme spectrale et de son omniprésence, cependant sa faible abondance naturelle (1.1%) rend son utilisation totalement inappropriée pour de l'étude en flux. L'étude de noyaux possédant également une large gamme spectrale mais une abondance naturelle plus importante semble par contre être une solution intéressante pour des analyses ciblées en flux. Maiwald *et al.*<sup>110</sup> reportent par exemple une détection successive du proton puis du fluor pour monitorer une réaction d'estérification par le suivi d'un groupement trifluorométhyl.<sup>110</sup>

Pour toutes les raisons que nous avons montrées jusque-là, les systèmes en flux se démocratisent, permettant l'obtention d'information sur l'avancement d'une réaction, l'activité catalytique ou encore la stabilité.<sup>105</sup> Les informations en direct sur l'avancement ainsi que sur la sélectivité de la réaction permettent de réagir ou d'en adapter les conditions dans l'optique d'une optimisation future. Cronin *et al.*<sup>114</sup> reportent en 2015 l'utilisation d'une plateforme de chimie en flux, associant un réacteur en flux, un spectromètre RMN ainsi qu'un système de contrôle automatisé analysant les données RMN dans le but de s'auto optimiser en s'appuyant sur un algorithme de Nelder-Mead. Cette plateforme a permis l'étude d'une large gamme de réaction allant de la formation d'imine, la fluorination électrophile jusqu'à des réactions de Diels-Alder. Elle a permis le suivi cinétique, la caractérisation structurale ainsi que l'auto-optimisation du débit. Dans l'étude précédente différentes, expériences RMN sont reportées, on note en outre l'utilisation de DEPT <sup>13</sup>C, de 1D fluor, ainsi que différentes expériences 2D. Dans le même domaine, Duchateau et ses collaborateurs reportent la mise au point d'un système permettant le suivi monitoré de l'élaboration du réactif de Grignard, reportant en outre une rapide optimisation des conditions de synthèse.<sup>115</sup>

Récemment Singh démontre même la prévalence de l'utilisation d'un système de suivi monitoré en comparaison d'autres techniques analytiques pour le suivi d'une réaction d'acétalisation.<sup>116</sup> Dans cette étude où il compare le suivi en direct par RMN opérant à 1T à de la RMN haut champ avec de la chromatographie en phase gaz, Singh démontre une précision tout à fait comparable du suivi sans aucune nécessité de stopper la réaction. Il reporte aussi la capacité d'enregistrer un grand nombre de points comme un avantage considérable pour la précision des mesures. Dans ce cas, le suivi cinétique

facilité par le montage, a pu être fait en 1200 points à bas champs alors qu'il a été réalisé en 15 points en chromatographie dans le même laps de temps (Figure 18).

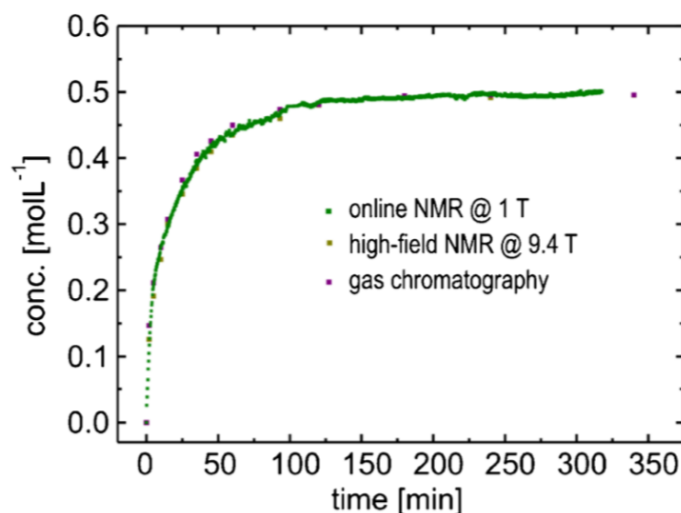


Figure 18 : Comparaison du suivi réactionnel d'une réaction d'acétalisation par RMN bas champ, haut champ et chromatographie en phase gaz. Extrait de la référence 116.

Un dernier exemple un peu plus spécifique reporté par Ley et son équipe met en évidence, dans le cadre de la synthèse de cyclopropanes substitués, la capacité d'éviter à la fois les problèmes de recouvrements ainsi que les problèmes liés à l'utilisation de solvants non deutérés.<sup>117</sup> Dans un premier temps un dispositif d'évaporation associé à un système de changement de solvant entre le système en flux et le spectromètre est mis en place. Grâce à ce système, les données RMN sont enregistrées en solvant deutéré alors que la réaction continue en solvant protoné. Pour pallier le problème de recouvrement, des expériences COSY 2D sont enregistrées en environ 10 minutes permettant de suivre la disparition des produits de départ et d'évaluer la formation des produits attendus, dans des régions très recouvertes où la RMN 1D est insuffisante.

Enfin, en plus des techniques en flux, la RMN a aussi régulièrement été étudiée en tant que mode de détection en étant par exemple associée à de la chromatographie d'exclusion stérique ou bien encore à des techniques de rhéologie.<sup>118-120</sup>

#### 1.2.4.4 Authentification et contrôle qualité

Outre l'apport indéniable de la RMN à bas champ pour le suivi réactionnel, la RMN bas champ se positionne par nature comme un outil de choix, pour le contrôle qualité. En effet, hormis le milieu académique où la RMN s'adapte à des problématiques diverses et variées, elle reste pour le milieu industriel un outil extrêmement puissant pour le contrôle de produit fini. A haut champ, cette technique a fait ses preuves, comme nous l'avions évoqué dans la première partie, pour l'étude de

produits de santé, mais elle est également reportée comme une technique de choix dans le domaine de la chimie des aliments comme rapporté par Viel et ses collaborateurs.<sup>121</sup> Cependant tout le monde s'accorde à dire que la RMN à haut champ n'est pas forcément adaptable aux applications de routine pour des questions tant ergonomiques qu'économiques. Les améliorations précédemment décrites permettent désormais d'imaginer la RMN à bas champs comme une technique compétitive et/ou complémentaire avec les autres techniques de routine, qu'elles soient spectroscopiques (Raman, IR), ou bien chromatographiques (GC, HPLC...).

Guidé par l'idée que les performances de la RMN à haut champs dépassent largement le minimum requis en termes de sensibilité et de résolution pour procéder à un grand nombre d'analyse, beaucoup d'applications dans le domaine du contrôle qualité ont été développées à bas champ. C'est principalement le cas dans l'agroalimentaire, les émulsions, les polymères ou encore le domaine pharmaceutique... (Tableau 4). La question principale dans ces domaines d'applications est : la RMN bas champ a-t-elle la capacité d'atteindre les performances minimales requises ? Et dans le cas contraire, peut-on dans certains cas faire intervenir un traitement statistique pour atteindre ce minimum ? Nous verrons au travers de quelques exemples comment certains groupes de recherche ont su répondre à ces questions en restant dans l'optique du contrôle qualité.

Tableau 4 : Résumé des applications récentes de la RMN bas champ pour l'authentification et le contrôle qualité. \*Stat : analyses statistiques des résultats, UF : méthode d'acquisition Ultra-Rapide.

<b>Matrice étudié</b>	<b>Application</b>	<b>Champ magnétique Appareil</b>	<b>Méthode</b>	<b>Reference</b>
Biocarburant	Contrôle de la production	43 MHz Magritek	1D 1H	122
Huile comestible	Adultération	60 MHz Oxford instrument	1D 1H + stat*	125 126
	Adultération	43 MHz Magritek	1D 1H + 2D COSY UF	124
Café	Authentification	60 MHz Oxford instrument	1D 1H	128
Viande	Adultération	60 MHz Oxford Instrument	1D 1H + stat	127
Caoutchouc	Contrôle de la production	43 MHz Magritek	1D 1H & 13C	123
Pharmaceutique	Adultération	60 MHz Oxford Instrument	1D 1H	129
	Contrôle de la production	43 MHz Magritek	1D 1H & 31P	130

Dans ce domaine, Blümich et ses associés reportent un bon nombre des applications, une d'entre elle décrit la RMN à bas champs comme un outil performant pour le contrôle de la qualité des biocarburants. Par une simple expérience 1D menée à 1T et malgré des taux de recouvrement importants, les chercheurs arrivent à isoler des signaux caractéristiques de chacun des produits impliqués dans leur étude, à savoir ceux du biocarburant d'huile de colza, ceux de l'huile de colza ainsi que ceux du méthanol et du glycérol. Grâce à l'étude de différentes matières premières, ils parviennent en intégrant des signaux suffisamment résolus à estimer le pourcentage des esters de méthyl d'acide gras insaturés pour chacun des échantillons.<sup>122</sup> Bien que les auteurs précisent ne pas avoir pu faire une attribution complète de leurs spectres, l'empreinte spectrale était cependant suffisante pour obtenir des résultats en accord avec ceux obtenus à haut champ. Ils soulignent également dans cette étude la rapidité (2 scans suffisent à l'enregistrement) et la mobilité d'une telle méthode pour le contrôle qualité directement sur les sites de production.

En 2016, Singh et Blümich démontrent également l'efficacité de la RMN à bas champ pour l'étude de caoutchouc, là encore directement sur le site de production.<sup>123</sup> Dans ce cas, ils étudient divers échantillons provenant de solutions huileuse de caoutchouc de styrène-butadiène, de solution polymérisée et d'émulsion de ce même polymère. Ils étudient également des échantillons provenant de différents lots. L'étude est menée dans ce cas également à 43 MHz par l'enregistrement de spectre protons en 10 s et de spectre carbone-13 sans en préciser le temps d'acquisition. Cette approche permet de différencier les caoutchoucs non seulement par la façon dont ils ont été polymérisés mais également à l'intérieur d'un même lot.

L'année suivante, les mêmes collaborateurs décident d'examiner les capacités de la RMN bas champs pour détecter et caractériser des cas d'adultérations par des molécules complexes.<sup>82</sup> Dans ce cas ils étudient différents sels de strychnine. Dans un premier temps ils montrent la capacité de distinguer les différents sels, en se basant uniquement sur les déplacements chimiques au sein de différents solvants. Ils décrivent également malgré son côté extrêmement consommateur de temps (~ 168 heures) la capacité de remonter à une structure complète d'une molécule contenant 22 protons et 6 carbones prochiraux.

Malgré le côté impressionnant de la caractérisation précédemment décrite, la notion de temps nécessaire pour les expériences est totalement irréaliste pour du contrôle qualité. Pour résoudre de telles problématiques, en 2018, Giraudeau et son équipe décrivent des méthodes ultrarapides, utilisables sur des spectromètres bas champs équipés de bobines de gradients.<sup>124</sup> Cette méthode, basée sur l'encodage spatio-temporel permet l'obtention en quelques minutes d'informations

nécessitant usuellement plusieurs heures. Dans cet article où sont étudiées des huiles comestibles, des expériences 1D menées en 2,4 min sont comparées à des expériences COSY ultrarapides dans le même laps de temps. Du fait de la complexité de détecter l'adultération d'une huile par une autre, les auteurs reportent également la nécessité d'utiliser des méthodes chimiométriques pour l'obtention d'une discrimination. (Figure 19)

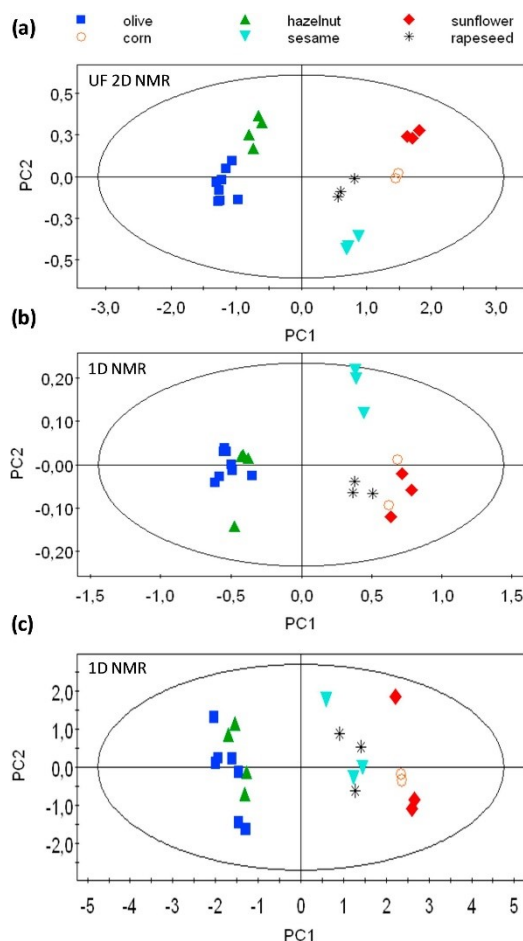


Figure 19 : Analyse statistique par PCA de 23 huiles comestibles. a) : 2D UF b) : 1D avec bucketing variable ; c) : 1D avec bucketing constant. Extrait de la référence 124.

D'autres études récemment reportées démontrent également la difficulté d'analyser, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, des corps gras du fait du recouvrement important associé à la faible dispersion en fréquence. A ce genre d'approche, où l'analyse d'un marqueur spécifique n'est pas réalisable, est préférée une comparaison de l'empreinte spectrale des acides gras prédominants.<sup>125</sup> Ce genre d'approche comme cela avait été fait dans l'étude précédente, est associée à une analyse statistique. Dans une étude Kemsley associée à une analyse 1D en proton à une régression PLS pour détecter l'adultération dans des huiles de noisettes et des huiles d'olives. Ils mettent en évidence un taux d'adultération avéré de 11%.<sup>126</sup> Dans le même domaine, la même équipe de recherche a établi

avec succès une méthode, utilisant la RMN bas champ, pour différencier la viande de bœuf et celle de cheval, en moins de 10 min d'acquisition.<sup>127</sup>

D'autres études menées à 60 MHz dans des mélanges moins complexes, ont permis de contrôler par exemple la qualité et l'authenticité de cafés.<sup>128</sup> Dans ce cas l'étude montre que l'analyse de marqueurs spécifiques, comme par exemple un pic à 3,16 ppm appartenant au 16-Omethylcafestol uniquement retrouvé dans les cafés « robusta » permet la mise en évidence de l'origine des substances impliquées. Les chercheurs ont montré sur des échantillons modèles préparé en laboratoire une limite de détection du café robusta dans le café arabica descendant jusqu'à 10% (de robusta dans arabica), avec un temps d'analyse voisin de 40 min.

Dans l'optique de la détection de substances pharmaceutiques, des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont démontré la possibilité d'étudier des cas d'adultération dans des compléments alimentaires annoncés 100% naturels.<sup>129</sup> Les auteurs annoncent une limite de détection de 0,9 mM en 22,5 min, leur permettant de mettre en évidence une grande partie des adultérations, ils reportent également qu'au vu des quantités de produits détectés les limites intrinsèques quant à la sensibilité de la RMN bas champ ne sont pas un réel problème. Les auteurs démontrent aussi la capacité de quantifier en utilisant un étalon interne par une telle méthode en 45 min. Ils reportent une limite de quantification (LOQ) de 2,4 mM, avec un taux de corrélation > 90% en comparaison des mêmes analyses menées à 500 MHz.

Toujours dans l'optique de la recherche de substance pharmacologique Bogun et Moore, utilisent une double détection proton, phosphore pour la mise en évidence de laboratoire clandestin synthétisant de la métamphétamine à partir de pseudoéphédrine.<sup>130</sup> Les deux chercheurs mettent en évidence la capacité de la RMN <sup>1</sup>H, comme décrit précédemment à différencier les différents sels d'éphédrine et donc de juger la qualité des produits de départ engagés dans la réaction. Pour juger de la qualité de la synthèse finale, les auteurs utilisent la RMN du phosphore pour détecter l'éventuelle présence de d'acide hydrophosphoreux, d'acide phosphoreux et d'acide phosphorique. Cette double détection leurs a permis de différencier la provenance des métamphétamines analysées.

## 1.3 Références

1. Behner, P.; Hecht, M.; Wahl, F. Fighting counterfeit pharmaceuticals: New defenses for an underestimated - and growing - menace. <https://www.strategyand.pwc.com/reports/counterfeit-pharmaceuticals> (consulté le 15/08/2018).
2. WHO Counterfeit drugs kill ! <https://www.gphf.org/images/downloads/impactbrochure.pdf> (consulté le 15/08/2018).
3. INTERPOL Pharmaceutical Crime and Organized Criminal Groups. <https://www.interpol.int/Media/Files/Crime-areas/Pharmaceutical-crime/Pharmaceutical-Crime-and-Organized-Criminal-Groups> (consulté le 16/08/2018).
4. Newton, P. N.; Green, M. D.; Fernandez, F. M., Impact of poor-quality medicines in the 'developing' world. *Trends Pharmacol Sci* **2010**, *31* (3), 99-101.
5. SAFEMEDICINE Canada Drugs Scandal Reveals The Dangers Of Drug Importation. <https://www.safemedicines.org/2018/06/canada-drugs-scandal-reveals-the-dangers-of-drug-importation.html> (consulté le 15/08/2018).
6. Clark, F., Rise in online pharmacies sees counterfeit drugs go global. *The Lancet* **2015**, *386* (10001), 1327-1328.
7. Newton, P. N.; Amin, A. A.; Bird, C.; Passmore, P.; Dukes, G.; Tomson, G.; Simons, B.; Bate, R.; Guerin, P. J.; White, N. J., The primacy of public health considerations in defining poor quality medicines. *PLoS Med* **2011**, *8* (12), e1001139.
8. WHO Working Definitions. [http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/A70\\_23-en1.pdf](http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/A70_23-en1.pdf) (consulté le 15/08/2018).
9. Shepherd, M., Beef up international cooperation on counterfeits. *Nat Med* **2010**, *16* (4), 366.
10. Attaran, A.; Bate, R.; Kendall, M., Why and How to Make an International Crime of Medicine Counterfeiting. *Journal of International Criminal Justice* **2011**, *9* (2), 325-354.
11. Levitt, G. How many people buying from international online pharmacies have a prescription? <https://www.pharmacycheckerblog.com/how-many-people-buying-from-international-online-pharmacies-have-a-prescription> (consulté le 16/08/2018).
12. Kwok, K.; Taylor, L. S., Analysis of the packaging enclosing a counterfeit pharmaceutical tablet using Raman microscopy and two-dimensional correlation spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **2012**, *61*, 176-182.
13. Newton, P. N.; Green, M. D.; Mildenhall, D. C.; Plançon, A.; Nettey, H.; Nyadong, L.; Hostetler, D. M.; Swamidoss, I.; Harris, G. A.; Powell, K.; Timmermans, A. E.; Amin, A. A.; Opuni, S. K.; Barbereau, S.; Faurant, C.; Soong, R. C.; Faure, K.; Thevanayagam, J.; Fernandes, P.; Kaur, H.; Angus, B.; Stepniewska, K.; Guerin, P. J.; Fernández, F. M., Poor quality vital anti-malarials in Africa - an urgent neglected public health priority. *Malaria Journal* **2011**, *10* (352).
14. Rajendrani, M., The hunt for counterfeit medicine. *Analytical Chemistry* **2007**, 2623-2627.
15. Degardin, K.; Roggo, Y.; Margot, P., Understanding and fighting the medicine counterfeit market. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *87*, 167-75.
16. Fernandez, F. M.; Green, M. D.; Newton, P. N., Prevalence and Detection of Counterfeit Pharmaceuticals: A Mini Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2008**, *47* (3), 585-590.
17. EAASM The counterfeiting superhighway. [https://eaasm.eu/cache/downloads/dqqt3sge9hwssgcos440g40/455\\_EAASM\\_counterfeiting%20Report\\_020608\(1\).pdf](https://eaasm.eu/cache/downloads/dqqt3sge9hwssgcos440g40/455_EAASM_counterfeiting%20Report_020608(1).pdf) (consulté le 16/08/2018).
18. Shofuda, K.; Aragane, K.; Igari, Y.; Matsumoto, K.; Ito, K., [Anti-counterfeit activities of pharmaceutical companies in Japan: for patient safety]. *Yakugaku Zasshi* **2014**, *134* (2), 203-11.
19. Venhuis, B. J.; Oostlander, A. E.; Giorgio, D. D.; Mosimann, R.; du Plessis, I., Oncology drugs in the crosshairs of pharmaceutical crime. *The Lancet Oncology* **2018**, *19* (4), e209-e217.
20. WHO Système mondial de surveillance et de suivi de l'OMS pour les produits médicaux de qualité inférieure et falsifiés (GSMS).

[http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/publications/GSMsreport\\_FR.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/publications/GSMsreport_FR.pdf?ua=1) (consulté le 16/08/2018).

21. PSI The Counterfeit Medicines Challenge.

<http://www.psi-inc.org/index.cfm> (consulté le 16/08/2018).

22. INTERPOL Online sale of fake medicines and products targeted in INTERPOL operation.

<https://www.interpol.int/en/News-and-media/News/2016/N2016-076> (consulté le 16/08/2018).

23. Roudaut, M., R., Contrefaçon : un crime invisible. *Cahiers de la sécurité* **2011**, 5, 25-35.

24. Caillet, C.; Sichanh, C.; Assemat, G.; Malet-Martino, M.; Sommet, A.; Bagheri, H.; Sengxeu, N.; Mongkhonmath, N.; Mayxay, M.; Syhakhang, L.; Lapeyre-Mestre, M.; Newton, P. N.; Roussin, A., Role of Medicines of Unknown Identity in Adverse Drug Reaction-Related Hospitalizations in Developing Countries: Evidence from a Cross-Sectional Study in a Teaching Hospital in the Lao People's Democratic Republic. *Drug Saf* **2017**, 40 (9), 809-821.

25. USP Matrix of Drug Quality Reports in USAID-assisted Countries.

[https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/Pnadh099.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnadh099.pdf) (consulté le 23/08/2018).

26. Orizio, G.; Schulz, P.; Domenighini, S.; Caimi, L.; Rosati, C.; Rubinelli, S.; Gelatti, U., Cyberdrugs: a cross-sectional study of online pharmacies characteristics. *Eur J Public Health* **2009**, 19 (4), 375-7.

27. Marv, S. Worldwide Landscape of Counterfeit Drugs.

<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/5bff/f04e5e6dcf32b2280a4bd40771fe18f9d239.pdf> (consulté le 16/08/2018).

28. PFIZER Les faux médicaments représenteraient 10,5 milliards d'euros en Europe.

<http://www.mypharma-editions.com/les-faux-medicaments-representeraient-105-milliards-d-euros-en-europe> (consulté le 16/08/2018).

29. Guarnieri, F.; Prysya, E., Cybercriminalité - contrefaçon: les interactions entre «réel et virtuel». *Cahiers de la sécurité* **2014**, 15, 77-87.

30. Bale, H. Pharmaceutical Counterfeiting: Issues, Trends, Measurement.

<https://www.oecd.org/sti/ind/35650404.pdf> (consulté le 16/08/2018).

31. WHO Does Price Reveal Poor-Quality Drugs ?

<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18807en/s18807en.pdf> (consulté le 16/08/2018).

32. Reynolds, L.; McKee, M., Organised crime and the efforts to combat it: a concern for public health. *Global Health* **2010**, 6, 21.

33. WHO Substandard and falsified medical products.

<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/substandard-and-falsified-medical-products> (consulté le 15/08/2018).

34. Wertheimer, A. I.; Norris, J., Safeguarding against substandard/counterfeit drugs: mitigating a macroeconomic pandemic. *Res Social Adm Pharm* **2009**, 5 (1), 4-16.

35. SAFEMEDICINES Counterfeit Drugs And Terrorism.

<https://www.safemedicines.org/counterfeit-drugs-and-terrorism> (consulté le 15/08/2018).

36. *Oxford University press The Oxford Handbook of Organized Crime*. Oxford, 2014.

37. Hussein, I. A. H.; Chams, S., Counterfeit Drugs: A Threat to Patient's Health. *Human & Health* **2013**, 24, 43-44.

38. Palumbo, F. B.; Mullins, C. D.; Slagle, A. F.; Rizer, J., Policy implications of drug importation. *Clin Ther* **2007**, 29 (12), 2758-67.

39. Erwin A., B.; Joseph P., F. J.; Steve, P., The Health and Economic Effects of Counterfeit Drugs. *American Health & Drug Benefits* **2014**, 7 (4), 216-224.

40. Newton, P.; Proux, S.; Green, M.; Smithuis, F.; Rozendaal, J.; Prakongpan, S.; Chotivanich, K.; Mayxay, M.; Looareesuwan, S.; Farrar, J.; Nosten, F.; White, N. J., Fake artesunate in southeast Asia. *The Lancet* **2001**, 357 (9272), 1948-1950.

41. Newton, P. N.; Fernandez, F. M.; Plancon, A.; Mildenhall, D. C.; Green, M. D.; Ziyong, L.; Christophel, E. M.; Phanouvong, S.; Howells, S.; McIntosh, E.; Laurin, P.; Blum, N.; Hampton, C. Y.; Faure, K.; Nyadong, L.; Soong, C. W.; Santoso, B.; Zhiguang, W.; Newton, J.; Palmer, K., A collaborative epidemiological investigation into the criminal fake artesunate trade in South East Asia. *PLoS Med* **2008**, 5 (2), e32.



42. Sengaloundeth, S.; Green, M. D.; Fernandez, F. M.; Manolin, O.; Phommavong, K.; Insixiengmay, V.; Hampton, C. Y.; Nyadong, L.; Mildenhall, D. C.; Hostetler, D.; Khounsaknalath, L.; Vongsack, L.; Phompida, S.; Vanisaveth, V.; Syhakhang, L.; Newton, P. N., A stratified random survey of the proportion of poor quality oral artesunate sold at medicine outlets in the Lao PDR - implications for therapeutic failure and drug resistance. *Malar J* **2009**, *8*, 172.
43. SAFEMEDICINES 5 Kinds Of Poisons Found In Counterfeit Drugs. <https://www.safemedicines.org/2015/11/poisons.html> (consulté le 15/08/2018).
44. SANOFI Fighting counterfeit medicines. [https://www.sanofi.com/media/Project/One-Sanofi-Web/sanofi-com/common/docs/download-center/Fighting\\_Counterfeit\\_Medicines\\_May\\_2017.pdf](https://www.sanofi.com/media/Project/One-Sanofi-Web/sanofi-com/common/docs/download-center/Fighting_Counterfeit_Medicines_May_2017.pdf) (consulté le 16/08/2018).
45. WHO The rational use of drugs. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17054e/s17054e.pdf> (consulté le 16/08/2018).
46. NAFDAC <http://ww1.nafdacnigeria.org/> (consulté le 16/08/2018).
47. Newton, P. N.; Green, M. D.; Fernández, F. M.; Day, N. P. J.; White, N. J., Counterfeit anti-infective drugs. *The Lancet Infectious Diseases* **2006**, *6* (9), 602-613.
48. FDA How to Buy Medicines Safely From an Online Pharmacy. <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm048396.htm> (consulté le 16/08/2018).
49. Delnaud, V. The fight against counterfeit pharmaceutical products intensifies. <https://www.lexology.com/library/detail.aspx?g=abe81f27-08d6-4f0a-8dbb-b4459a8f9537> (consulté le 16/08/2018).
50. Mullard, A., The anticounterfeiter's technological tool kit. *Nature Medicine* **2010**, *16* (4), 361.
51. Risha, P. G.; Msuya, Z.; Clark, M.; Johnson, K.; Ndomondo-Sigonda, M.; Layloff, T., The use of Minilabs to improve the testing capacity of regulatory authorities in resource limited settings: Tanzanian experience. *Health Policy* **2008**, *87* (2), 217-22.
52. Petersen, A.; Held, N.; Heide, L.; Difam, E. P. N. M. S. G., Surveillance for falsified and substandard medicines in Africa and Asia by local organizations using the low-cost GPHF Minilab. *PLoS One* **2017**, *12* (9), e0184165.
53. Batson, J. S.; Bempong, D. K.; Lukulay, P. H.; Ranieri, N.; Satzger, R. D.; Verbois, L., Assessment of the effectiveness of the CD3+ tool to detect counterfeit and substandard anti-malarials. *Malar J* **2016**, *15*, 119.
54. Ranieri, N.; Taberner, P.; Green, M. D.; Verbois, L.; Herrington, J.; Sampson, E.; Satzger, R. D.; Phonlavong, C.; Thao, K.; Newton, P. N.; Witkowski, M. R., Evaluation of a new handheld instrument for the detection of counterfeit artesunate by visual fluorescence comparison. *Am J Trop Med Hyg* **2014**, *91* (5), 920-4.
55. Mans, D. J.; Callahan, R. J.; Dunn, J. D.; Gryniowicz-Ruzicka, C. M., Rapid-screening detection of acetildenafil, sildenafil and avanafil by ion mobility spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2013**, *75*, 153-7.
56. Wilson, B. K.; Kaur, H.; Allan, E. L.; Lozama, A.; Bell, D., A New Handheld Device for the Detection of Falsified Medicines: Demonstration on Falsified Artemisinin-Based Therapies from the Field. *Am J Trop Med Hyg* **2017**, *96* (5), 1117-1123.
57. Rebiere, H.; Guinot, P.; Chauvey, D.; Brenier, C., Fighting falsified medicines: The analytical approach. *J Pharm Biomed Anal* **2017**, *142*, 286-306.
58. Dégardin, K.; Guillemain, A.; Roggo, Y., Comprehensive Study of a Handheld Raman Spectrometer for the Analysis of Counterfeits of Solid-Dosage Form Medicines. *Journal of Spectroscopy* **2017**, *2017*, 1-13.
59. Koczwara, A.; Dressman, J., Poor-Quality and Counterfeit Drugs: A Systematic Assessment of Prevalence and Risks Based on Data Published From 2007 to 2016. *J Pharm Sci* **2017**, *106* (10), 2921-2929.
60. Saar-Reismaa, P.; Erme, E.; Vaher, M.; Kulp, M.; Kaljurand, M.; Mazina-Sinkar, J., In Situ Determination of Illegal Drugs in Oral Fluid by Portable Capillary Electrophoresis with Deep UV Excited Fluorescence Detection. *Anal Chem* **2018**, *90* (10), 6253-6258.

61. Marini, R. D.; Rozet, E.; Montes, M. L.; Rohrbasser, C.; Roht, S.; Rheme, D.; Bonnabry, P.; Schappler, J.; Veuthey, J. L.; Hubert, P.; Rudaz, S., Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines. *J Pharm Biomed Anal* **2010**, *53* (5), 1278-87.
62. CNRS Le spectromètre le plus puissant au monde.  
<http://www2.cnrs.fr/presse/communiqu/1689.htm> (consulté le 16/08/2018).
63. Singh, K.; Blümich, B., NMR spectroscopy with compact instruments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *83*, 12-26.
64. Mitchell, J.; Gladden, L. F.; Chandrasekera, T. C.; Fordham, E. J., Low-field permanent magnets for industrial process and quality control. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2014**, *76*, 1-60.
65. Riegel, S. D.; Leskowitz, G. M., Benchtop NMR spectrometers in academic teaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *83*, 27-38.
66. Danieli, E.; Perlo, J.; Duchateau, A. L.; Verzijl, G. K.; Litvinov, V. M.; Blumich, B.; Casanova, F., On-line monitoring of chemical reactions by using bench-top nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemphyschem* **2014**, *15* (14), 3060-6.
67. Raich, H.; Blümmler, P., Design and construction of a dipolar Halbach array with a homogeneous field from identical bar magnets: NMR Mandhalas. *Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering* **2004**, *23B* (1), 16-25.
68. Halbach, K., Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material. *Nuclear instruments and methods* **1980**, *169*, 1-10.
69. Danieli, E.; Perlo, J.; Blumich, B.; Casanova, F., Small magnets for portable NMR spectrometers. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49* (24), 4133-5.
70. Kuster, S. K.; Danieli, E.; Blumich, B.; Casanova, F., High-resolution NMR spectroscopy under the fume hood. *Phys Chem Chem Phys* **2011**, *13* (29), 13172-6.
71. Auguste, Benchtop FT-NMR : The Renewal of Nuclear Magnetic Resonance at Low Fields. **2017**.
72. Magritek <http://www.magritek.com/> (consulté le 16/08/2018).
73. Nanalysis <http://www.nanalysis.com/products-overview/> (consulté le 16/08/2018).
74. Oxford instrument. <https://nmr.oxinst.com/products/nmr-spectrometers/pulsar> (consulté le 16/08/2018).
75. ThermoFisher  
<https://www.thermofisher.com/search/results?query=picospin&focusarea=Rechercher> (consulté le 16/08/2018).
76. Glogler, S.; Emondts, M.; Colell, J.; Muller, R.; Blumich, B.; Appelt, S., Selective drug trace detection with low-field NMR. *Analyst* **2011**, *136* (8), 1566-8.
77. Colell, J. F. P.; Emondts, M.; Logan, A. W. J.; Shen, K.; Bae, J.; Shchepin, R. V.; Ortiz, G. X., Jr.; Spanring, P.; Wang, Q.; Malcolmson, S. J.; Chekmenev, E. Y.; Feiters, M. C.; Rutjes, F.; Blumich, B.; Theis, T.; Warren, W. S., Direct Hyperpolarization of Nitrogen-15 in Aqueous Media with Parahydrogen in Reversible Exchange. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (23), 7761-7767.
78. Richardson, P. M.; Parrott, A. J.; Semenova, O.; Nordon, A.; Duckett, S. B.; Halse, M. E., SABRE hyperpolarization enables high-sensitivity (1)H and (13)C benchtop NMR spectroscopy. *Analyst* **2018**, *143* (14), 3442-3450.
79. Harris, R. K.; Becker, E. D.; Cabral de Menezes, S. M.; Goodfellow, R.; Granger, P., NMR nomenclature: nuclear spin properties and conventions for chemical shifts. IUPAC Recommendations 2001. International Union of Pure and Applied Chemistry. Physical Chemistry Division. Commission on Molecular Structure and Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2002**, *40* (7), 489-505.
80. Kruk, J.; Doskocz, M.; Jodlowska, E.; Zacharzewska, A.; Lakomic, J.; Czaja, K.; Kujawski, J., NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Appl Magn Reson* **2017**, *48* (1), 1-21.
81. Koos, M. R.; Danieli, E.; Casanova, F.; Blumich, B.; Luy, B., Differentiation of enantiomers by 2D NMR spectroscopy at 1 T using residual dipolar couplings. *Magn Reson Chem* **2016**, *54* (6), 527-30.
82. Singh, K.; Blumich, B., Desktop NMR for structure elucidation and identification of strychnine adulteration. *Analyst* **2017**, *142* (9), 1459-1470.

83. GOUILLEUX, B. Gradient-based methods on a benchtop spectrometer. New perspectives for low-field NMR spectroscopy.
84. Thrippleton, M. J.; Edden, R. A.; Keeler, J., Suppression of strong coupling artefacts in J-spectra. *J Magn Reson* **2005**, *174* (1), 97-109.
85. Reich, H. J. <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-16-virt-coupl.htm> (consulté le 16/08/2018).
86. Musher, J. I.; Corey, E. J., Virtual long-range spin-spin couplings in NMR. *Tetrahedron* **1961**, *18*, 791-809.
87. Brisson, J. R.; Carver, J. P., Virtual coupling in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of N,N'-diacetyl chitobioside. Application to glycopeptides. *J Biol Chem* **1982**, *257* (19), 11207-9.
88. Blumich, B.; Singh, K., Desktop NMR and Its Applications From Materials Science To Organic Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57* (24), 6996-7010.
89. Workman, J., Jr.; Koch, M.; Lavine, B.; Chrisman, R., Process analytical chemistry. *Anal Chem* **2009**, *81* (12), 4623-43.
90. Meyer, K.; Kern, S.; Zientek, N.; Guthausen, G.; Maiwald, M., Process control with compact NMR. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *83*, 39-52.
91. Maiwald, M.; Fischer, H. H.; Kim, Y. K.; Albert, K.; Hasse, H., Quantitative high-resolution on-line NMR spectroscopy in reaction and process monitoring. *J Magn Reson* **2004**, *166* (2), 135-46.
92. Dalitz, F.; Cudaj, M.; Maiwald, M.; Guthausen, G., Process and reaction monitoring by low-field NMR spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2012**, *60*, 52-70.
93. Weber, H.; Brecker, L., Online NMR for monitoring biocatalysed reactions. *Curr Opin Biotechnol* **2000**, *11* (6), 572-8.
94. Bernstein, M. A.; Stefinovic, M.; Sleigh, C. J., Optimising reaction performance in the pharmaceutical industry by monitoring with NMR. *Magn Reson Chem* **2007**, *45* (7), 564-71.
95. Susanne, F.; Smith, D. S.; Codina, A., Kinetic Understanding Using NMR Reaction Profiling. *Organic Process Research & Development* **2011**, *16* (1), 61-64.
96. Hoyer, T. R.; Eklov, B. M.; Ryba, T. D.; Voloshin, M.; Yao, L. J., No-D NMR (no-deuterium proton NMR) spectroscopy: a simple yet powerful method for analyzing reaction and reagent solutions. *Org Lett* **2004**, *6* (6), 953-6.
97. Clegg, I. M.; Gordon, C. M.; Smith, D. S.; Alzaga, R.; Codina, A., NMR reaction monitoring during the development of an active pharmaceutical ingredient. *Anal. Methods* **2012**, *4* (6), 1498-1506.
98. Khajeh, M.; Bernstein, M. A.; Morris, G. A., A simple flowcell for reaction monitoring by NMR. *Magn Reson Chem* **2010**, *48* (7), 516-22.
99. Foley, D. A.; Doecke, C. W.; Buser, J. Y.; Merritt, J. M.; Murphy, L.; Kissane, M.; Collins, S. G.; Maguire, A. R.; Kaerner, A., ReactNMR and ReactIR as reaction monitoring and mechanistic elucidation tools: the NCS mediated cascade reaction of alpha-thioamides to alpha-thio-beta-chloroacrylamides. *J Org Chem* **2011**, *76* (23), 9630-40.
100. Buser, J. Y.; McFarland, A. D., Reaction characterization by flow NMR: quantitation and monitoring of dissolved H<sub>2</sub> via flow NMR at high pressure. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50* (32), 4234-7.
101. Brächer, A.; Behrens, R.; von Harbou, E.; Hasse, H., Application of a new micro-reactor <sup>1</sup>H NMR probe head for quantitative analysis of fast esterification reactions. *Chemical Engineering Journal* **2016**, *306*, 413-421.
102. Foley, D. A.; Bez, E.; Codina, A.; Colson, K. L.; Fey, M.; Krull, R.; Piroli, D.; Zell, M. T.; Marquez, B. L., NMR flow tube for online NMR reaction monitoring. *Anal Chem* **2014**, *86* (24), 12008-13.
103. Farley, K. A.; Reilly, U.; Anderson, D. P.; Boscoe, B. P.; Bundesmann, M. W.; Foley, D. A.; Lall, M. S.; Li, C.; Reese, M. R.; Yan, J., Utilizing on- and off-line monitoring tools to follow a kinetic resolution step during flow synthesis. *Magn Reson Chem* **2017**, *55* (4), 348-354.
104. Barrios Sosa, A. C.; Williamson, R. T.; Conway, R.; Shankar, A.; Sumpter, R.; Cleary, T., A Safe and Efficient Synthetic Route to a 2,5-Dimethyl-1-aryl-1H-imidazole Intermediate. *Organic Process Research & Development* **2011**, *15* (2), 449-454.

105. Sans, V.; Cronin, L., Towards dial-a-molecule by integrating continuous flow, analytics and self-optimisation. *Chem Soc Rev* **2016**, *45* (8), 2032-43.
106. Gomez, M. V.; de la Hoz, A., NMR reaction monitoring in flow synthesis. *Beilstein J Org Chem* **2017**, *13*, 285-300.
107. Gouilleux, B.; Charrier, B.; Akoka, S.; Giraudeau, P., Gradient-based solvent suppression methods on a benchtop spectrometer. *Magn Reson Chem* **2017**, *55* (2), 91-98.
108. Dalitz, F.; Kreckel, L.; Maiwald, M.; Guthausen, G., Quantitative Medium-Resolution NMR Spectroscopy Under Non-Equilibrium Conditions, Studied on the Example of an Esterification Reaction. *Applied Magnetic Resonance* **2014**, *45* (5), 411-425.
109. Foley, D. A.; Dunn, A. L.; Zell, M. T., Reaction monitoring using online vs tube NMR spectroscopy: seriously different results. *Magn Reson Chem* **2016**, *54* (6), 451-6.
110. Zientek, N.; Laurain, C.; Meyer, K.; Kraume, M.; Guthausen, G.; Maiwald, M., Simultaneous (19)F-(1)H medium resolution NMR spectroscopy for online reaction monitoring. *J Magn Reson* **2014**, *249*, 53-62.
111. Dalitz, F.; Maiwald, M.; Guthausen, G., Considerations on the design of flow cells in by-pass systems for process analytical applications and its influence on the flow profile using NMR and CFD. *Chemical Engineering Science* **2012**, *75*, 318-326.
112. Killner, M. H. M.; Garro Linck, Y.; Danieli, E.; Rohwedder, J. J. R.; Blümich, B., Compact NMR spectroscopy for real-time monitoring of a biodiesel production. *Fuel* **2015**, *139*, 240-247.
113. Kreyenschulte, D.; Paciok, E.; Regestein, L.; Blumich, B.; Buchs, J., Online monitoring of fermentation processes via non-invasive low-field NMR. *Biotechnol Bioeng* **2015**, *112* (9), 1810-21.
114. Sans, V.; Porwol, L.; Dragone, V.; Cronin, L., A self optimizing synthetic organic reactor system using real-time in-line NMR spectroscopy. *Chem Sci* **2015**, *6* (2), 1258-1264.
115. Goldbach, M.; Danieli, E.; Perlo, J.; Kaptein, B.; Litvinov, V. M.; Blümich, B.; Casanova, F.; Duchateau, A. L. L., Preparation of Grignard reagents from magnesium metal under continuous flow conditions and on-line monitoring by NMR spectroscopy. *Tetrahedron Letters* **2016**, *57* (1), 122-125.
116. Singh, K.; Danieli, E.; Blumich, B., Desktop NMR spectroscopy for real-time monitoring of an acetalization reaction in comparison with gas chromatography and NMR at 9.4 T. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409* (30), 7223-7234.
117. Ahmed-Omer, B.; Sliwinski, E.; Cerroti, J. P.; Ley, S. V., Continuous Processing and Efficient in Situ Reaction Monitoring of a Hypervalent Iodine(III) Mediated Cyclopropanation Using Benchtop NMR Spectroscopy. *Organic Process Research & Development* **2016**, *20* (9), 1603-1614.
118. Cudaj, M.; Guthausen, G.; Hofe, T.; Wilhelm, M., SEC-MR-NMR: online coupling of size exclusion chromatography and medium resolution NMR spectroscopy. *Macromol Rapid Commun* **2011**, *32* (8), 665-70.
119. Rantzsch, V.; Wilhelm, M.; Guthausen, G., Hyphenated low-field NMR techniques: combining NMR with NIR, GPC/SEC and rheometry. *Magn Reson Chem* **2016**, *54* (6), 494-501.
120. Rantzsch, V.; Özen, M. B.; Rantzsch, K.-F.; Guthausen, G.; Wilhelm, M., Low-field RheoNMR: Newly developed combination of rheology and time domain (TD)-NMR to correlate mechanical properties with molecular dynamics in polymer melts. 2017.
121. Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S., Liquid state 1H high field NMR in food analysis. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **2012**, *66*, 1-39.
122. Linck, Y. G.; Killner, M. H. M.; Danieli, E.; Blümich, B., Mobile Low-Field 1H NMR Spectroscopy Desktop Analysis of Biodiesel Production. *Applied Magnetic Resonance* **2013**, *44*, 41-53.
123. Singh, K.; Blümich, B., Desktop NMR Spectroscopy for Quality Control of Raw Rubber. *Macromolecular Symposia* **2016**, *365* (1), 191-193.
124. Gouilleux, B.; Marchand, J.; Charrier, B.; Remaud, G. S.; Giraudeau, P., High-throughput authentication of edible oils with benchtop Ultrafast 2D NMR. *Food Chem* **2018**, *244*, 153-158.
125. Cubero-Leon, E.; Peñalver, R.; Maquet, A., Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International* **2014**, *60*, 95-107.
126. Parker, T.; Limer, E.; Watson, A. D.; Defernez, M.; Williamson, D.; Kemsley, E. K., 60 MHz (1)H NMR spectroscopy for the analysis of edible oils. *Trends Analyt Chem* **2014**, *57* (100), 147-158.

127. Jakes, W.; Gerdova, A.; Defernez, M.; Watson, A. D.; McCallum, C.; Limer, E.; Colquhoun, I. J.; Williamson, D. C.; Kemsley, E. K., Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Food Chem* **2015**, *175*, 1-9.
128. Defernez, M.; Wren, E.; Watson, A. D.; Gunning, Y.; Colquhoun, I. J.; Le Gall, G.; Williamson, D.; Kemsley, E. K., Low-field (<sup>1</sup>H) NMR spectroscopy for distinguishing between arabica and robusta ground roast coffees. *Food Chem* **2017**, *216*, 106-13.
129. Pages, G.; Gerdova, A.; Williamson, D.; Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M., Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field (<sup>1</sup>H) NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances. *Anal Chem* **2014**, *86* (23), 11897-904.
130. Bogun, B.; Moore, S., (<sup>1</sup>H and (<sup>31</sup>P) benchtop NMR of liquids and solids used in and/or produced during the manufacture of methamphetamine by the HI reduction of pseudoephedrine/ephedrine. *Forensic Sci Int* **2017**, *278*, 68-77.

## 2 RMN à bas champ pour la détection de contrefaçons de médicaments

Nous venons de voir dans la partie introductive que l'expansion du phénomène de contrefaçon est tel, que la quasi-totalité des classes de médicaments est affectée, les cibles principales demeurent cependant les médicaments pour améliorer le confort de vie dans les pays industrialisés et les médicaments anti-infectieux dans les pays en voie de développement. De nos jours pour stopper la prolifération des formulations non conformes, le défi analytique ne repose plus simplement sur la simple capacité d'une technique à mettre en évidence une substance illicite, inattendue ou sous-standard, il repose sur la capacité de le faire rapidement, n'importe où et à bas prix. Les facilités d'utilisation ainsi que les capacités analytiques des spectromètres RMN de paillasse, décrites dans la partie introductive, en font des outils intéressants à implanter dans des laboratoires de contrôle institutionnels ou dans des laboratoires de pays émergents.

Comme souvent reporté, la perte de sensibilité intrinsèque à cette instrumentation est souvent encore un frein voire un critère rédhibitoire à son utilisation. Cependant, les actifs présents de façon déclarée ou non déclarée dans les formulations pharmaceutiques sont souvent détectés à des concentrations telles, que la sensibilité de la méthode analytique n'est pas réellement un facteur limitant.

A notre connaissance, la capacité d'une telle instrumentation n'a pourtant jamais été évaluée pour l'étude de médicaments suspectés d'être chimiquement contrefaits. Dans ce contexte nous avons étudié dans la publication présentée ci-après deux classes de médicaments potentiellement contrefaits, vendus soit dans des pays en voie de développement : les anti-malariens, soit dans les pays développés : les médicaments à visée érectile. Le choix de ces deux classes de médicaments permet d'appréhender une vision globale des médicaments à risques et de fait, de juger qualitativement l'intérêt de cette approche.

Dans cette étude, nous démontrons la capacité d'utiliser un spectromètre bas champ pour mettre en évidence les différences tant qualitatives que quantitatives entre les médicaments de spécialité et les médicaments contrefaits en réalisant une simple analyse de RMN du proton à bas champ. En comparaison des résultats obtenus à haut champ, nous mettons en évidence que les informations principales permettant de conclure quant à la qualité du produit étudié sont facilement accessibles dans des temps d'analyse très raisonnables. Cependant, il apparaît également dans cette étude préliminaire, que l'analyse plus fine de certaines formulations complexes peut se révéler délicate et nécessiter l'utilisation d'expériences bidimensionnelles plus chronophages.

# Benchtop low-field $^1\text{H}$ Nuclear Magnetic Resonance for detecting falsified medicines

Gaëtan Assemat<sup>a</sup>, Stéphane Balayssac<sup>a</sup>, Anna Gerdova<sup>b‡</sup>, Véronique Gilard<sup>a</sup>, Céline Caillet<sup>c</sup>,  
David Williamson<sup>b</sup>, Myriam Malet-Martino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France*

<sup>b</sup> *Oxford Instruments Industrial Analysis, Tubney Woods, Abingdon, Oxfordshire OX13 5QX, United Kingdom*

<sup>c</sup> *Lao-Oxford-Mahosot Hospital-Wellcome Trust Research Unit (LOMWRU), Vientiane, Lao PDR and Infectious Diseases Data Observatory, Centre for Tropical Medicine & Global Health, University of Oxford, UK*

<sup>‡</sup> Present address: *Magritek UK*

Corresponding author: Myriam Malet-Martino, Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex, France. E-mail address: [martino@chimie.ups-tlse.fr](mailto:martino@chimie.ups-tlse.fr)

## Abstract

Falsified medicines represent a serious threat to public health. Among the different measures to effectively combat this scourge, analytical methods play a key role in their detection and removal from the market before they reach patients. The present study evaluates for the first time the potential of a benchtop low-field (LF) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometer for uncovering drug falsification by focusing on the analysis of fifteen erectile dysfunction and nine antimalarial medicines, the most commonly reported falsified medicines in developed and developing countries respectively. After a simple and rapid sample preparation and  $\approx 5$  min of spectrum recording, LF  $^1\text{H}$  NMR allows to conclude on the quality of the medicine: presence or absence of the expected active pharmaceutical ingredient (API), presence of unexpected API, absence of any API. Some 2D experiments are also described but although conclusive they are hampered by the duration of the experiments. The LF  $^1\text{H}$  NMR assay, based on the internal standard method, is validated by the determination of its accuracy, repeatability, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and by comparison of the data obtained on some medicines after 45 min of spectrum recording to those measured with high-field  $^1\text{H}$  NMR. Because of its saving capabilities (cost, space, user experience), LF  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy might become a routine screening tool in laboratories in charge of detecting falsified medicines.

**Keywords:** low-field NMR; benchtop NMR; quantitative NMR; falsified medicines; antimalarial medicines; erectile dysfunction medicines.

## 1. Introduction

In the literature, there are different terms used to refer to poor-quality medicines, such as counterfeit, substandard, falsified, spurious, degraded, fake, false, forged, falsely-labelled, fraudulent, illicit, illegal, illegitimate [1]. For clarification, the World Health Organization (WHO) recently (May 2017) chose to gather all these denominations under the new and more comprehensive terminology of Substandard and Falsified medical products. Authorized medical products that fail to meet either their quality standards or specifications, or both, are called substandard. Medical products that deliberately/fraudulently misrepresent their identity, composition or source are called falsified [2]. Falsified medicines may thus contain no active pharmaceutical ingredient (API), the wrong API or the wrong amount of the correct API, and pose a serious threat to both individual and public health [3].

Restricted a few years ago to low- and middle-income countries (LMIC), the circulation of falsified medicines has now spread to developed countries and today no country remains spared by this issue. In high-income countries, many illegal Web "pharmacies" exist in the cyberspace, far from regulation and supervision by national authorities and healthcare professionals, which constitutes a gateway to poor-quality medicines. Almost all therapeutic areas are concerned by falsification although the main targets of unscrupulous manufacturers are life-saving medicines in developing areas and rather lifestyle medicines in industrialized countries.

In this study we will focus on two classes of potentially falsified medicines that are mainly sold in developing countries such as antimalarials, or in developed countries such as erectile dysfunction drugs (EDD). Indeed, antimalarials are amongst the most commonly reported substandard and falsified medicines in tropical countries with high prevalence of malaria [3-5]. In developed countries, EDD are the most affected by falsification and are mostly sold through the Internet. A study from Pfizer laboratory in 2012 demonstrated that Internet sites claiming to sell authentic Viagra shipped 77% of the time falsified medications that only contained 30% to 50% of the API stated on the label [6]. Despite all measures taken to tackle the distribution of poor-quality medicines, it seems that high amounts still keep entering the market of both developing and developed countries.

Among all the technical, legislative or repressive tools dedicated to the struggle against drug falsification, analytical methods have a major role to play. The development of analytical techniques is thus necessary to detect falsified medicines and to distinguish them from genuine formulations. Several chromatographic and spectroscopic techniques have already been proposed as tools to detect poor-quality medicines [7-10] but the analytical challenge is to dispose of low-cost, push-button equipment not requiring a high level of qualification that can thus be easily implemented in quality control laboratories [11]. The first emerging spectroscopic methods have been vibrational spectroscopies such as Raman and Near Infrared (NIR) with portable devices that afford a rapid screening for the detection of falsified samples using databases



containing the spectral fingerprint of the reference product [12,13]. Although Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is recognized as an extremely powerful technique for structural elucidation, its use in quality control laboratories is still limited because it remains considered as an expensive, sophisticated and bulky technique reserved for experts only. However, the recent development of low-field (LF) compact NMR spectrometers paved the way to numerous applications in various research fields as for instance process control, chemical reaction monitoring, quality control of various complex matrices and even structural elucidation of a complex molecule [14-19]. In the field of health product analysis, one educational publication described the use of LF  $^1\text{H}$  NMR by undergraduate students to analyze two marketed pain relief drugs containing combinations of acetylsalicylic and ascorbic acids, or acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine, and we previously reported cases of erectile and weight-loss dietary supplements illegally adulterated by API and the application of LF-DOSY to the analysis of a real complex esomeprazole medicine [20-22].

The aim of the present study was to evaluate the capability of LF  $^1\text{H}$  NMR to detect falsified antimalarial and erectile medicines and to quantify the identified API. The LF  $^1\text{H}$  NMR assay was validated by the determination of its accuracy, repeatability, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and by comparison of the data obtained on some medicines to those measured with high-field (HF)  $^1\text{H}$  NMR.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

Fifteen falsified EDD (samples **1-15**) seized by the French customs and nine falsified antimalarial medicines (samples **16-24**) purchased in different countries of Southeast Asia and kindly provided by the LOMWRU (Lao-Oxford-Mahosot Hospital-Wellcome Trust Research Unit, Mahosot Hospital, Vientiane, Lao PDR) (Table 1) were analysed in this study. The following genuine medicines considered as control samples were purchased in French pharmacies: Cialis 20 mg (tadalafil, Lilly), Levitra 20 mg (vardenafil, Bayer), Priligy 30 mg (dapoxetine, Menarini), Sildenafil 100 mg (sildenafil, Pfizer Generics), Spedra 100 mg (avanafil, Menarini), Flagyl 500 mg (metronidazole, Sanofi), Voltarene 100 mg (diclofenac, Novartis), Nautamine (diphenhydramine diacefyllinate 90 mg, Sanofi), Doliprane 1000 mg (paracetamol). The genuine antimalarial medicines (Artesunate 50 mg, Mediplantex, Vietnam; Metakelfin (sulphamethopyrazine 500 mg (= sulfalene) and pyrimethamine 25 mg), Pharmacia Italia) were purchased in Southeast Asia and were also a gift from the LOMWRU. Dipyrone, artemisinin, sildenafil and the internal chemical shift reference for NMR experiments (sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilyl-propionate (TSP)) were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis,

MO, USA). Deuterated solvents ( $\text{CD}_3\text{OD}$  and  $\text{DMSO-d}_6$ ) were obtained from Euriso-Top (91194 Saint Aubin, France).

## 2.2. Preparation of samples for HF and LF $^1\text{H}$ NMR analyses

For the qualitative  $^1\text{H}$  NMR analysis, around 100 mg of the powdered tablet were mixed with 1 mL of  $\text{CD}_3\text{OD}$  under vortex agitation during a few seconds and then sonicated for 10 min. The suspension was centrifuged (5 min, 3000 rpm) and the supernatant analysed. 65  $\mu\text{L}$  of a 10 mM TSP solution were added before the NMR analysis.

For the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and TOCSY two-dimensional (2D) experiments,  $\approx 150$  mg of the powdered tablet were mixed with 1 mL of  $\text{DMSO-d}_6$  under sonication for 10 min and then magnetic stirring for 20 min. After centrifugation (5 min, 3000 rpm), the supernatant was transferred to an NMR tube and a solution of TSP was added. For the 2D J-resolved experiment, 10.70 mg of standard sildenafil were weighed and dissolved in 1 mL of  $\text{DMSO-d}_6$  (i.e. 16 mM).

For the quantitative analysis, around 10 mg exactly weighed of the powdered tablet were mixed with 1 mL of  $\text{CD}_3\text{OD}$  under sonication for 10 min and then magnetic stirring for 20 min. The suspension was centrifuged (5 min, 3000 rpm). 90  $\mu\text{L}$  of a 5 mM solution of TSP were added to 800  $\mu\text{L}$  of supernatant and the solution was transferred to an NMR tube. The quantitative experiments were done in triplicate.

Table 1: Medicines analyzed in this study.

Sample number	Sample name	Batch number Expiration date	Manufacturer	API(s) claimed	API(s) detected
1	Auvitra	42M11/13E 10-2016	Unk <sup>a</sup>	Vardenafil	Vardenafil
2	Avana 100	E-876 12-2015	Sunrise Remedies (India)	Avanafil	Avanafil
3	Cialis	05668 04-2018	Lilly	Tadalafil	Sildenafil
4	Cialis 20 mg	051030 09-2014	Lilly Icos (UK)	Tadalafil	Sildenafil
5	Cialis 20 mg	05668 04-2014	Lilly Icos (UK)	Tadalafil	Sildenafil
6	Cialis tadalafil	NI <sup>a</sup>	Eli Lilly	Tadalafil	Sildenafil
7	Duratia 30	F-156004 11-2016	Fortune Health Care (India)	Dapoxetine	Dapoxetine
8	Erectafil black	ECT2-37 03-2017	Unk <sup>a</sup>	Tadalafil	Tadalafil Diclofenac
9	Higra 120	0302/1 01-2017	Naman Pharma Drugs (India)	Sildenafil citrate	Sildenafil Diclofenac
10	Levitra	BXB8551 11-2017	Unk <sup>a</sup>	Vardenafil	Sildenafil Tadalafil
11	Sildigra Super Power	SP28 08-2016	Unk <sup>a</sup>	Sildenafil citrate Dapoxetine	Sildenafil Dapoxetine
12	Tadacip 20	BT4033 05-2016	Cipla (India)	Tadalafil	Tadalafil
13	Tadaga-20	TD-06 07-2016	Unk <sup>a</sup>	Tadalafil	Tadalafil
14	Vardenafil	NI <sup>a</sup>	Unk <sup>a</sup>	Vardenafil	Sildenafil
15	Viagra 100 mg	0314833021 04-2016	Unk <sup>a</sup>	Sildenafil	Sildenafil
16	Artesunate tablets	Unknown	Guilin Pharmaceutical Co., Ltd	Artesunate	Paracetamol
17	Artesunate tablets	Unknown	Guilin Pharmaceutical Co., Ltd	Artesunate	None

18	Artesunate tablets	Unknown	Guilin Pharmaceutical Co., Ltd	Artesunate	Dipyron
19	Artesunate tablets	980201 02-2001	Guilin	Artesunate	Diphenhydramine
20	Artesunate tablets	011201 12-2004	Guilin Pharmaceutical Works	Artesunate	Artemisinin
21	Artesunate tablets	060207 06-2009	Guilin Pharmaceutical Co., Ltd	Artesunate	None
22	Metakelfin 500 mg	F824A 01-2013	Pharmacia Italia	Sulphamethopyrazine Pyrimethamine	Sulphamethopyrazine Pyrimethamine
23	Metakelfin 500 mg	C827A 02-2011	Pharmacia Italia	Sulphamethopyrazine Pyrimethamine	Pyrimethamine
24	Metakelfin 500 mg	E378A 10-2010	Pharmacia Italia	Sulphamethopyrazine Pyrimethamine	Metronidazole

<sup>a</sup> Unk: unknown because only the blister (or part of the blister) with no indication was received.

## 2.3. NMR analysis

### 2.3.1. LF NMR experiments

Qualitative LF  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired on a Pulsar™ benchtop NMR spectrometer (Oxford Instruments, Abingdon, UK) operating at a frequency of 59.7 MHz for  $^1\text{H}$ . The temperature inside the spectrometer was 310 K. The acquisition was performed by using the SpinFlow 1.2.0.1 software (Oxford Instruments) and the processing was done with MNova 11.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain). For qualitative experiments, free induction decays (FIDs) were recorded with a flip angle of  $90^\circ$  ( $12.5\ \mu\text{s}$ ), a spectral width of 5208.6 Hz (87 ppm), and 8K complex points (acquisition time of 1.57 s). The relaxation delay was set at 1 s, and 128 transients were recorded leading to a total acquisition time of 5.5 min. For data processing, the FIDs were apodized with an exponential filter (line broadening (LB) = 0.3 Hz) and a Whittaker smoother was applied for baseline correction. The number of points was increased to 64K in the Fourier transformed spectra. The signal of TSP set at 0 ppm was used as an internal reference for chemical shift ( $\delta$ ) measurement.

LF  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D COSY experiments were performed with 128 data points in F1 and 2048 points in F2 (acquisition time of 1.64 s) with a spectral width of 1250 Hz in both dimensions, a relaxation delay of 2 s, and 64 scans (total experiment time of 8.4 h). Apodization was applied in both dimensions by a sine-squared function ( $0^\circ$ ) with a first point at 0.5 for F1 and in magnitude mode for F2. A Fourier transform was then applied in both dimensions to obtain a final matrix of  $2048 \times 2048$ . The same acquisition parameters were used for TOCSY experiments with a spin lock of 146 ms (total experiment time of 8.3 h). The raw data were multiplied by a sine-squared function ( $90^\circ$ ) with a first point at 0.5 in F1 and a sine-squared function ( $90^\circ$ ) in F2. Fourier transform was applied in both dimensions with phase sensitive mode in F1. The 2D J-resolved experiment was carried out with 1024 data points, 128 scans, and a filter of 5208 Hz for the acquisition dimension and 128 data points with a filter of 50 Hz for the “coupling constant” dimension (total experiment time of 11.3 h). Prior to Fourier transform and magnitude calculation in F2, the raw data were multiplied by a sine-squared function ( $0^\circ$ ) with a first point at 0.5 in F1 only. The 2D J-resolved spectrum was tilted by  $45^\circ$ . All 2D experiments were symmetrized using the symmetrize toolbox included in the Mnova software and a Whittaker smoother was applied in both dimensions for baseline correction.

For quantitative LF NMR experiments, the acquisition parameters were as follows: flip angle  $30^\circ$  ( $4.2\ \mu\text{s}$ ), spectral width 5000 Hz (84 ppm), 16K data points (acquisition time of 3.28 s), relaxation delay 2 s, and 512 transients. The total recording time was 45 min. The data processing parameters were unchanged. NMR signals of API considered for quantification were H15 and H17 for sildenafil; H15, H17 and H18 for vardenafil; H1 and H8 for tadalafil; H2/H6 for sulphamethopyrazine; H7/H9 and H11 for pyrimethamine (Fig. 1). Their chemical shifts are indicated in bold in Table 2. The amount of compound (mg) per tablet was calculated from the following equation:

$$Q = \frac{A_i}{A_{TSP}} \times \frac{Nb_{TSP}}{Nb_i} \times C_{TSP} \times \frac{V_2}{V_1} \times V_t \times M \times \frac{m_t}{m}$$

with  $A_i$  and  $A_{TSP}$  being the integrated areas of the characteristic NMR signal(s) of the API to be quantified (i) and of the TSP signal respectively,  $Nb_i$  and  $Nb_{TSP}$  the number of protons contributing to the signal of the analyte and of TSP (9 protons),  $C_{TSP}$  the concentration of TSP in the solution analyzed,  $V_1$  the volume of supernatant analyzed (800  $\mu$ L),  $V_2$  the volume of solution analyzed ( $V_1 + V_{TSP}$  (90  $\mu$ L)),  $V_t$  the volume used to dissolve the sample (1 mL),  $M$  the molecular weight of the analyte,  $m_t$  and  $m$  the weights of the tablet and of the sample analyzed. Before quantitative analyses, the longitudinal relaxation times ( $T_1$ ) of sildenafil, sulphamethopyrazine, pyrimethamine and TSP in  $CD_3OD$  were measured by the inversion recovery pulse sequence with 20 inversion delays from 0.001 to 40 s.

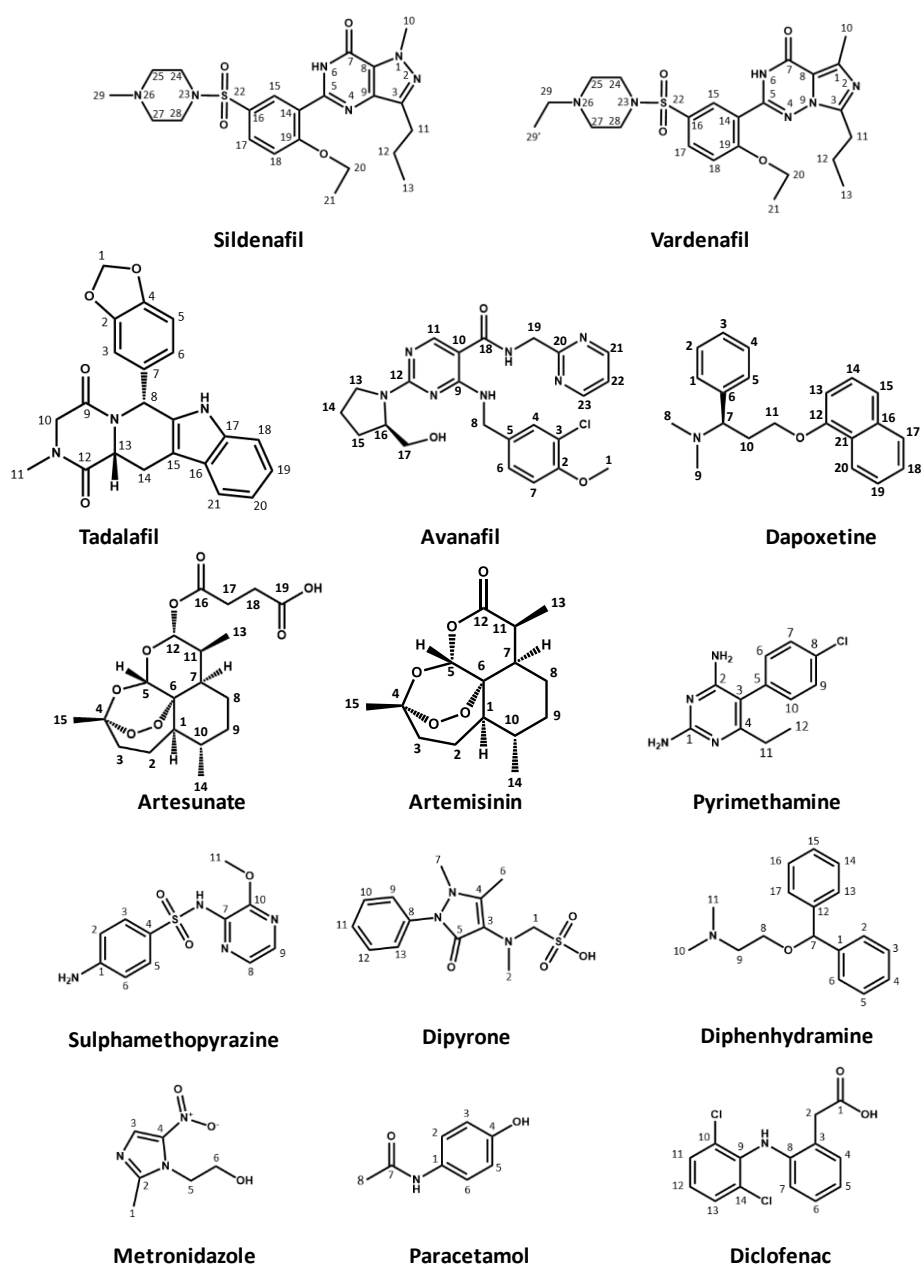


Figure 1: Chemical structures of the active pharmaceutical ingredients detected in this study.

The accuracy of the assay was measured on five different solutions of standard sildenafil of known concentrations ( $\approx 5$  mM) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . The repeatability of the assay was evaluated on a solution of standard sildenafil at 5 mM in  $\text{CD}_3\text{OD}$  recorded 5 times in a row. For LOD and LOQ measurements, solutions of standard sildenafil were prepared in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at concentrations ranging from 0.16 to 4.30 mM. LOD and LOQ were determined on signals for which the signal-to-noise ratios (SNR) were at least 3 and 10 respectively, the SNR being estimated with the SNR peak calculator tool included in the MNova software which calculates the SNR using the ratio  $Y/\text{noise}$  with  $Y$  the intensity of the peak and noise the root-mean-square deviation calculated in a signal-free area of the spectrum.

### 2.3.2. HF NMR experiments

HF  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed on a Bruker Avance 500 spectrometer (Bruker Biospin AG, Fallanden, Switzerland) operating at a frequency of 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and equipped with a 5 mm dual  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  TCI cryo-probe at 298 K. Typical acquisition parameters were as follows: number of scans 16, pulse width 10.0  $\mu\text{s}$  (flip angle  $90^\circ$ ), acquisition time 2.04 s, spectral width 8000 Hz (16 ppm), 32K data points, and relaxation delay 1 s, corresponding to a total recording time of 0.8 min. The data processing was performed with the Topspin software 3.2 with one level of zero-filling and Fourier transformation after multiplying FIDs by an exponential LB function of 0.3 Hz. Baseline was automatically corrected using the *abs* function of the Topspin software. The signal of TSP set at 0 ppm was used as an internal reference for  $\delta$  measurement.

For the quantitative HF  $^1\text{H}$  NMR experiments, the spectra were recorded in fully relaxed conditions with 64K data points, a pulse width shortened to 3.3  $\mu\text{s}$  (flip angle  $\approx 30^\circ$ ), a relaxation delay lengthened to 4.9 s and a number of scans increased to 256, for a total recording time of 11.4 min [23]. The concentrations were measured by comparing the signal areas of convenient protons of targeted compounds with that of TSP. The areas were measured using the Bruker TopSpin software.

Table 2: Low-field (60 MHz) <sup>1</sup>H NMR characteristic signals of the active pharmaceutical ingredients in genuine formulations. Signals used for quantitative experiments are reported in bold. Solvent: CD<sub>3</sub>OD. Data are generally given considering spin systems as weakly coupled.

δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>
<b>Vardenafil</b>			<b>Sildenafil</b>			<b>Avanafil</b>			<b>Tadalafil</b>			<b>Dapoxetine</b>		
<b>8.05</b>	15	app s	<b>8.19</b>	15	d (2.3)	8.73	21,23	d (5.0)	7.78-6.68	3,5,6,18-21	m	8.32-7.00	1-5,14,15,17-20	m
<b>7.90</b>	17	rpdd (2.2)	<b>7.92</b>	17	dd (8.8,2.3)	8.39	11	s	<b>6.19</b>	8	s	6.65	13	app dd (6.4, 2.1)
<b>7.38</b>	18	d (9.3)	7.35	18	d (8.8)	7.50-6.98	4,6,7,22	m	<b>5.85</b>	1	s	4.68-3.44	7,11	m
4.29	20	q (7.1)	4.31	20	q (7.2)				4.37-3.15	10,13,14	m <sup>c</sup>	3.18-2.48	8,9,10	app s
3.50-3.14	24-29	m <sup>c</sup>	4.22	10	s	4.71	19	s	3.04	11	s			
2.97	11	t (7.7)	3.50-3.16	24/28	m <sup>c</sup>	4.61	8	s						
2.57	10	s	2.82	25/27,11	m	3.84	1	s						
1.82	12	sext (7.7)	2.48	29	s	3.79-3.41	13,16,17	m						
1.45	21	t (7.0)	1.82	12	app sext (7.2)	2.04	14,15	m						
1.27	29 <sup>o</sup>	t (7.3) <sup>f</sup>	1.46	21	t (6.9)									
0.97	13	t (7.7)	0.98	13	t (7.2)									

δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>
<b>Artesunate</b>			<b>Artemisinin</b>			<b>Dipyron</b>			<b>Diphenhydramine<sup>g</sup></b>			<b>Paracetamol</b>		
5.75	12	d (9.8)	<b>6.03</b>	5	s	7.42	9-13	app s	7.32	2-6,13-17	app s	7.29	2,6	Part AA' of an AA'BB' system (8.9)
5.50	5	s	3.18	11	m <sup>c</sup>	4.10	1	s	5.49	7	s	6.70	3,5	Part BB' of an AA'BB' system (8.9)
2.78-0.61	1-3,7-11,13,14	m	2.85-0.50	1-3,7-10,13,14	m	3.07	7	s	3.92-3.00	8,9	m	2.07	8	s
2.63	17,18	app s	1.39	15	s	3.01	2	s	2.87	10,11	s			
1.34	15	s <sup>i</sup>				2.37	6	s						

δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>	δ <sup>1</sup> H <sup>a</sup>	N <sup>ob</sup>	M <sup>c</sup> (J) <sup>d</sup>
<b>Sulphamethopyrazine</b>			<b>Pyrimethamine</b>			<b>Metronidazole</b>			<b>Diclofenac</b>		
7.74	3,5	Part AA' of an AA'BB' system (9.0)	7.48	7,9	Part AA' of an AA'BB' system (8.6)	7.92	3	s	7.80-6.60	4-6,11-13	m
7.62	8,9	app s	<b>7.20</b>	6,10	Part BB' of an AA'BB' system (8.6)	4.49	5	t (5.0)	6.36	7	m
<b>6.63</b>	2,6	Part BB' of an AA'BB' system (9.0)	<b>2.25</b>	11	q (7.6)	3.84	6	t (5.0)	3.64	2	s
3.95	11	s	1.04	12	t (7.6)	2.52	1	s			

<sup>a</sup> Chemical shift (ppm).

<sup>b</sup> Position number, see Figure 1 for numbering.

<sup>c</sup> M: Multiplicity; s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; rpdd: right part of a doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; sext: sextuplet; app: apparent.

<sup>d</sup> J: coupling constant (Hz); given only when measurable..

<sup>e</sup> Overlapped with the solvent signal.

<sup>f</sup> Overlapped with the signal of stearate.

<sup>g</sup> Signals of standard diphenhydramine.



### 3. Results

#### 3.1. Qualitative analysis of medicines with LF $^1\text{H}$ NMR

The first part of the study focused on the analysis of fifteen EDD (Table 1). On the basis of our previous HF  $^1\text{H}$  NMR studies on dietary supplements fraudulently adulterated with APIs for erectile dysfunction treatment [23], we first compared the HF and LF  $^1\text{H}$  NMR spectra of a falsified medicine (9) containing an association of two APIs, sildenafil citrate and diclofenac. Fig. 2 illustrates this comparison and shows that the slight difference in the recording temperature (310 K at LF and 298 K at HF) does not affect the chemical shifts of the NMR signals. Decreasing the spectrometer magnetic field from 500 to 60 MHz decreases the SNR per unit time by a factor of 50-80 in our recording and processing conditions. The two spectra seem different because non-singlet signals appear much more spread in the spectrum at LF. Indeed, the frequency dispersion decreases with the magnetic field while the coupling constant is independent of the magnetic field. As a result, the spectroscopic dimension looks much less resolved (1 ppm = 60 Hz at LF whereas 1 ppm = 500 Hz at HF). Thus, the H15 doublet and the H17 doublet of doublet of sildenafil at 8.18 and 7.91 ppm are broadened in the LF spectrum. Likewise, the aromatic signals of diclofenac are obvious at 500 MHz but cannot be as readily observed in the spectrum recorded at 60 MHz. For instance, the signal of H7 at 6.36 ppm appears on the HF spectrum as a clear doublet of doublet with an ortho coupling with H6 ( $^3J = 8.0$  Hz) and a meta coupling with H5 ( $^4J = 1.0$  Hz) whereas its pattern becomes more complex in the LF spectrum, due to second order effects. In the same way, the obvious citrate AB system at HF becomes much more difficult to assign in the LF spectrum due to both strong coupling effects and signals overlapping with those of sildenafil.

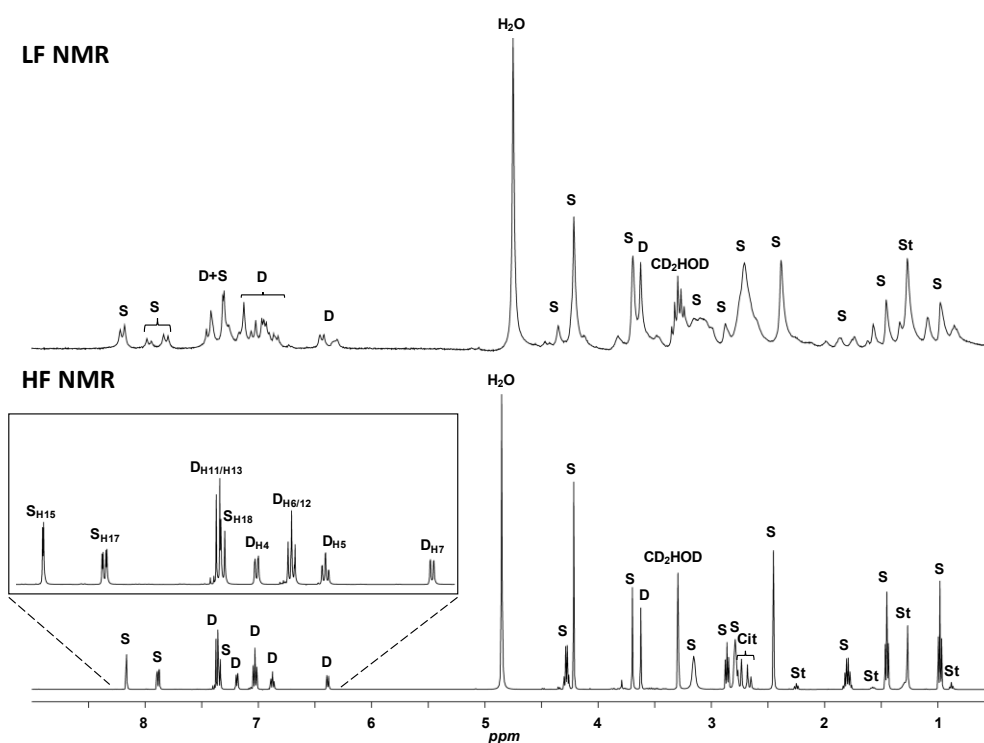


Figure 2: Comparison of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of formulation 9 recorded in  $\text{CD}_3\text{OD}$  on the high-field (500 MHz) and low-field (60 MHz) NMR spectrometers. S: sildenafil; D: diclofenac; St: stearate; Cit: citrate. For proton numbering, see Fig. 1.

Fig. 3 illustrates the LF NMR spectra of three falsified EDD (**3**, **10** and **14**) compared to the spectra of five genuine formulations of sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil and dapoxetine. The LF NMR profiles of the genuine formulations reveal that each API displays a specific spectral pattern that allows their differentiation. Some excipients can also be detected such as stearate thanks to its main resonance at 1.27 ppm in both genuine and falsified medicines, and fumarate (6.73 ppm) in the avanafil genuine formulation. The area between 5.5 and 3.2 ppm is overcrowded in the spectra of the falsified formulations due to the numerous signals of the sugar excipients (sucrose, glucose), which prevent a clear assignment of all the signals. The “aromatic” part of the spectra (8.5-6.0 ppm) is nevertheless sufficient to demonstrate that the APIs detected in the falsified formulations are clearly not the claimed ones. Indeed, formulations **3** and **14** contain sildenafil instead of tadalafil and vardenafil respectively, and formulation **10** contains a mixture of sildenafil and tadalafil instead of expected vardenafil. The LF  $^1\text{H}$  NMR characteristics of APIs found in the present study are reported in Table 2.

Among the fifteen EDD analyzed, eight contain APIs not indicated on the packaging or different from those claimed: four with sildenafil instead of tadalafil (samples **3-6**), one with sildenafil replacing vardenafil (**14**), one with the association sildenafil and tadalafil instead of vardenafil (**10**) and two with diclofenac added to the claimed API tadalafil (**8**) or sildenafil (**9**) (Table 1).

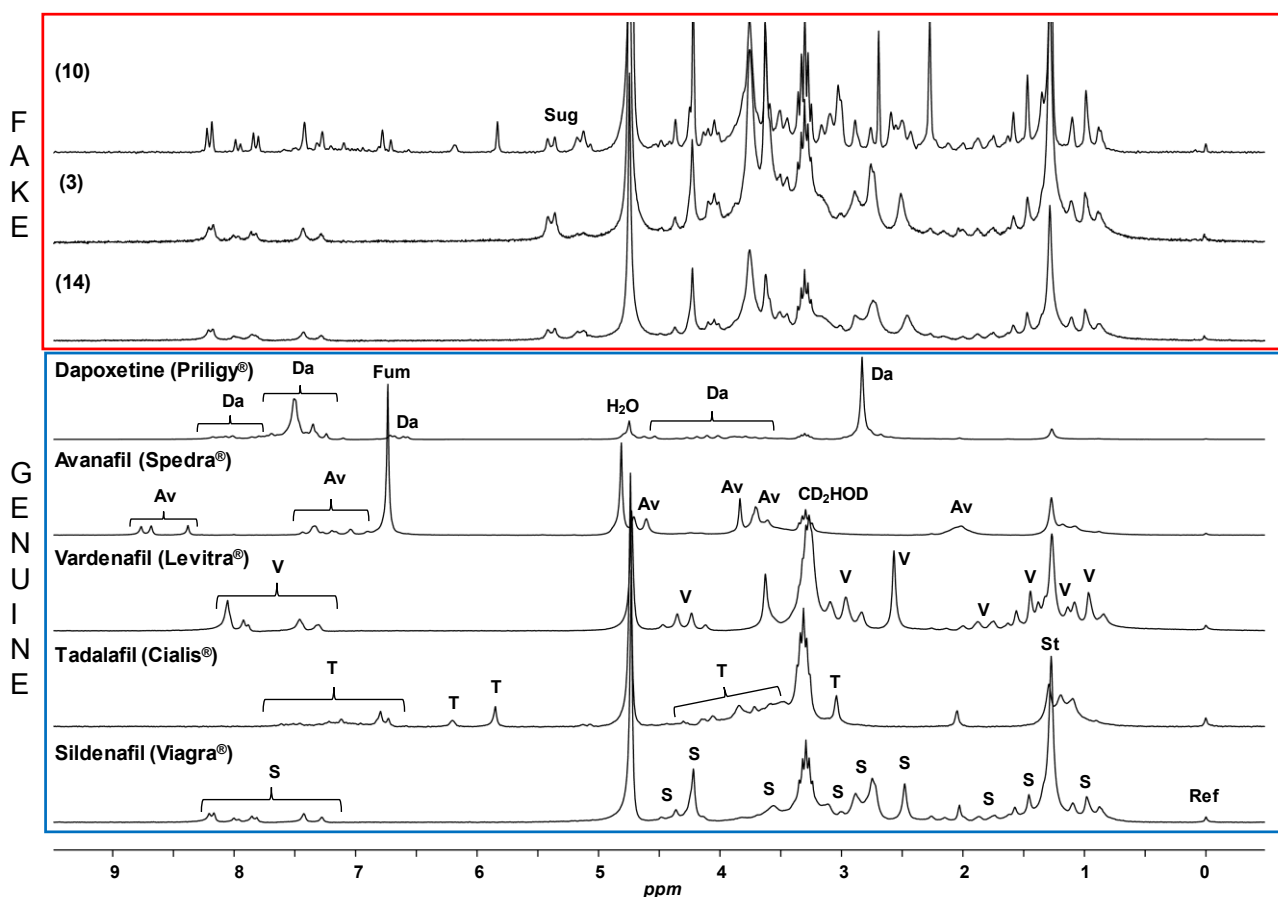


Figure 3: LF (60 MHz)  $^1\text{H}$  NMR spectra of genuine and falsified EDD formulations recorded in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . S: sildenafil; T: tadalafil; V: vardenafil; Av: avanafil; Da: dapoxetine; St: stearate; Fum: fumarate; Sug: sugars; Ref: internal reference (TSP).

To go further into structural characterization, 2D COSY, TOCSY and J-resolved  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed on a genuine formulation of sildenafil or on a solution of standard sildenafil. The COSY spectrum shows the correlations between the signals of protons 17/18, 20/21, 11/12, 12/13 and 24,27/25,28 (Fig. 4a). An additional correlation between H11 and H13, the only one expected for sildenafil, appears in the TOCSY spectrum thus highlighting the spin system H11/H12/H13 (Fig. 4b). The 2D J-resolved  $^1\text{H}$  NMR spectrum allows a better visualization of the signal multiplicity even in regions with overlapped signals. For instance, Fig. 4c highlights the quadruplet for H20 which is hardly observable in the 1D  $^1\text{H}$  spectrum. It also shows that H12 does not lead to a true sextuplet and so that second-order effects appear. Although these 2D experiments are informative, their recording times ( $\approx 8\text{h}$  for the COSY and TOCSY experiments and  $\approx 11\text{h}$  for the J-resolved one) are not compatible with routine analysis. Some recent developments based on spatial encoding and leading to impressive acquisition time reduction would deserve to be investigated in the field of drug analysis [24].

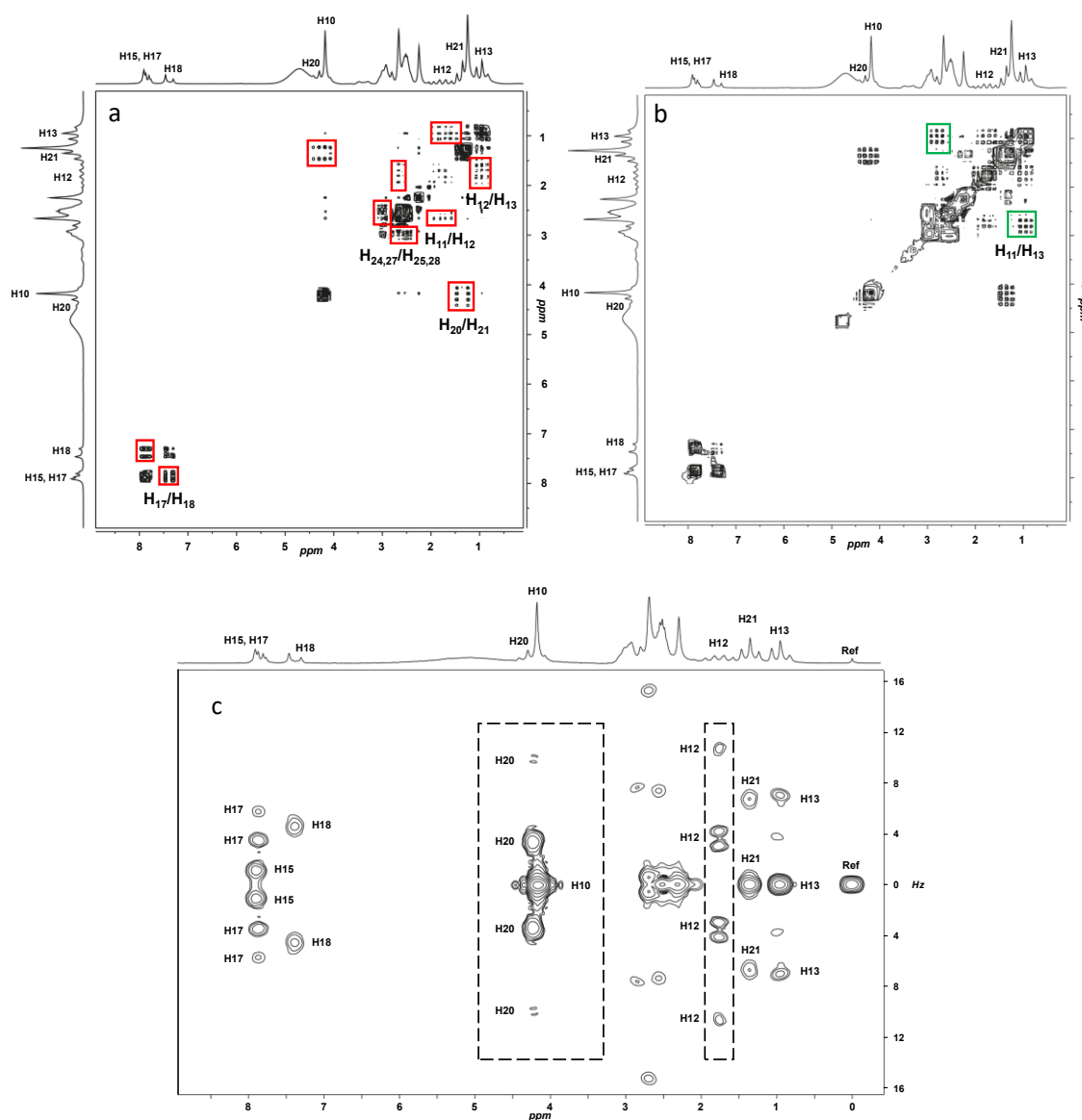


Figure 4: 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (a) and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (b) spectra of a genuine formulation of sildenafil, and 2D J-resolved (c) spectrum of a solution of standard sildenafil recorded in  $\text{DMSO-d}_6$ . Ref: internal reference (TSP). For proton numbering, see Fig. 1.

The second part of the study is dedicated to the analysis of nine oral antimalarial medicines, six claimed to contain artesunate (**16-21**) and three presented as an association of sulphamethopyrazine and pyrimethamine (**22-24**) (Table 1). The comparison of the LF  $^1\text{H}$  NMR spectrum of a genuine formulation of artesunate with those of five falsified medicines clearly reveals that artesunate is replaced by other APIs (Fig. 5). Indeed, the apparent singlet at 2.63 ppm corresponding to H17 and H18 as well as signals at 5.75 and 5.50 ppm from H12 and H5 respectively are undetected in the falsified drugs for which characteristic signals of unexpected APIs are detected. Of the six formulations for which artesunate is the claimed API, two have no API (**17** and **21**) and four a wrong API (paracetamol (**16**), dipyrone (**18**), diphenhydramine (**19**) and artemisinin (**20**)) (Fig. 5, Table 1).

Fig. 6 compares the LF  $^1\text{H}$  NMR spectra of a genuine formulation containing the association of sulphamethopyrazine and pyrimethamine with falsified ones. Formulation **22** seems qualitatively correct as the two API are detected but their amounts are not in accordance with the expected dosages (see §3.2). Formulation **23** only contains one of the two actives (pyrimethamine) while formulation **24** contains metronidazole, an antibiotic used for the treatment of various parasitic and bacterial infections but not for treating malaria.

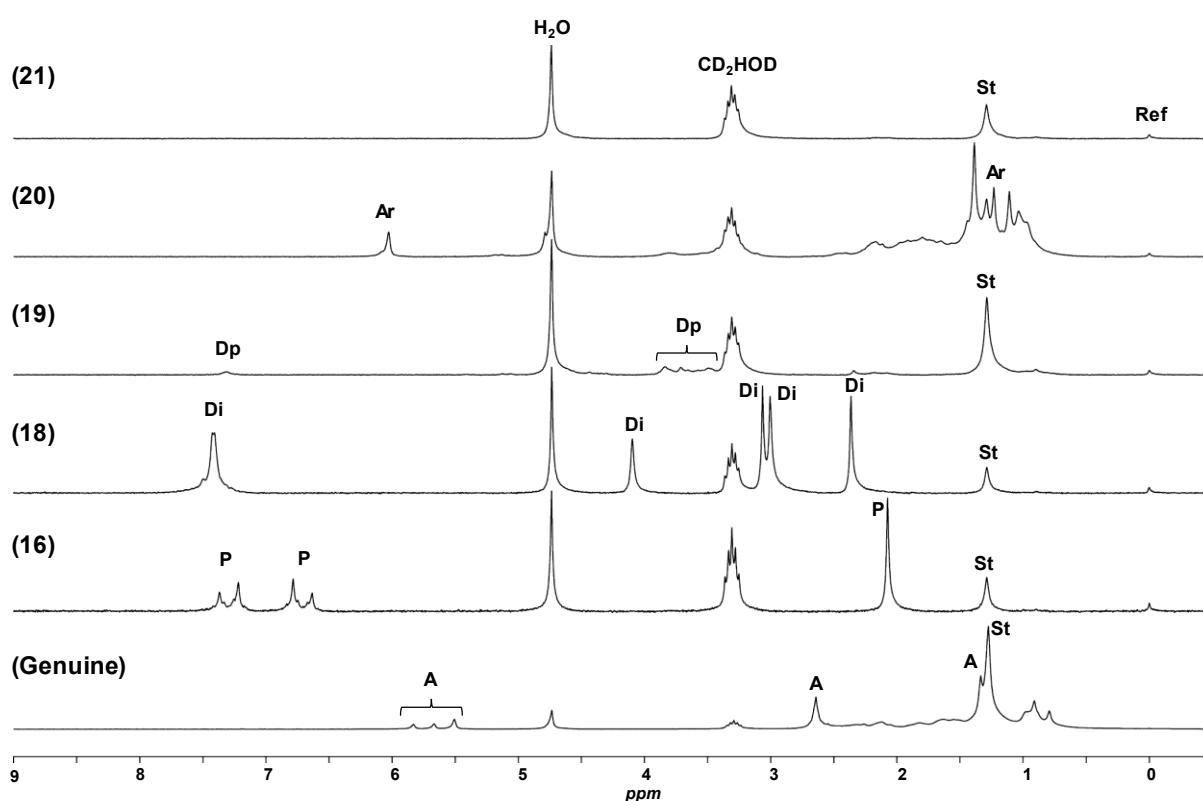


Figure 5: LF (60 MHz)  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded in  $\text{CD}_3\text{OD}$  of genuine and falsified antimalarial medicines advertised as containing artesunate. A: artesunate; Ar: artemisinin; Di: dipyrone; Dp: diphenhydramine; P: paracetamol; St: stearate; Ref: internal reference (TSP).

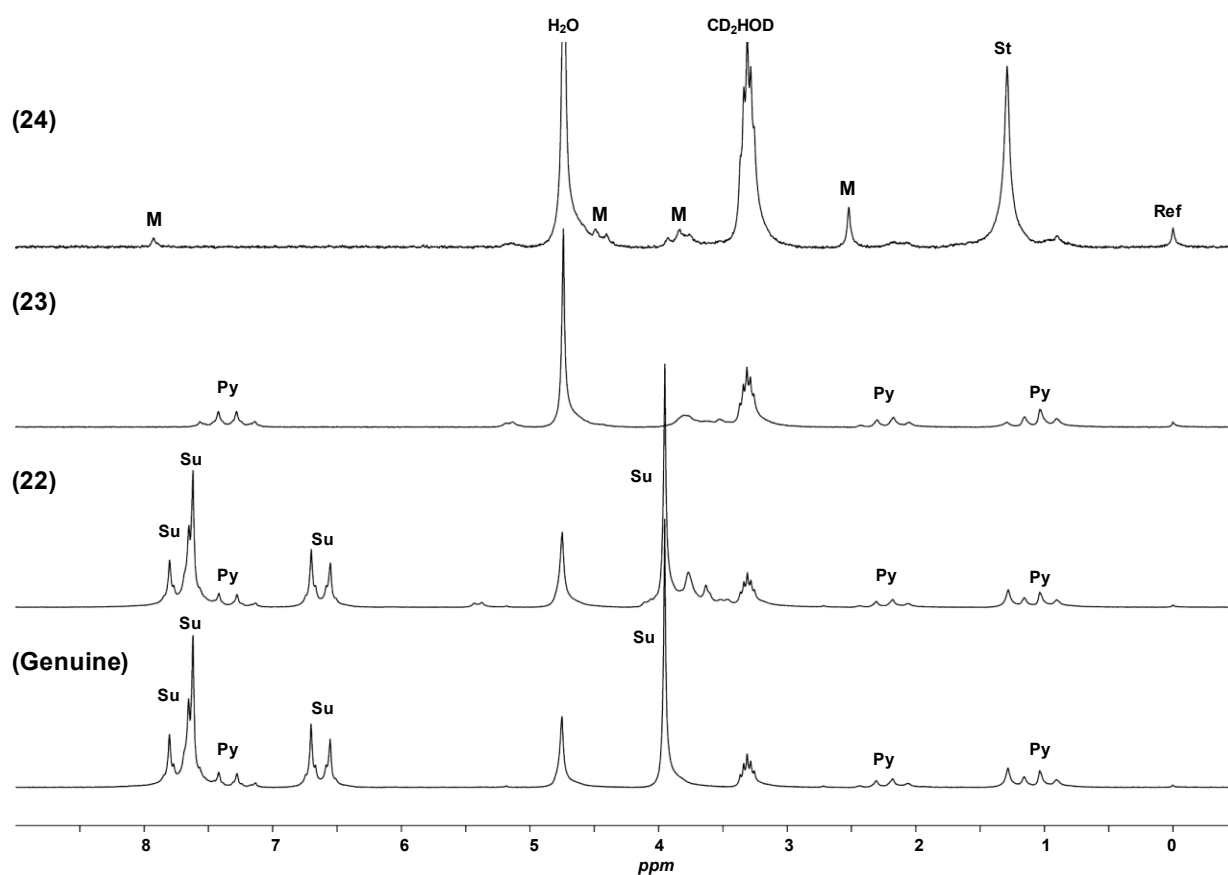


Figure 6: LF (60 MHz)  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded in  $\text{CD}_3\text{OD}$  of genuine and falsified antimalarial medicines advertised as containing the association of sulphamethopyrazine and pyrimethamine. M: metronidazole; Py: pyrimethamine; Su: sulphamethopyrazine; St: stearate; Ref: internal reference (TSP).

### 3.2 Quantitative analysis of medicines with LF $^1\text{H}$ NMR

Prior to the quantitative determination of APIs in some of the medicines analyzed, the longitudinal relaxation times (T1) of sildenafil, sulphamethopyrazine, pyrimethamine and TSP in  $\text{CD}_3\text{OD}$  were measured (see Fig. 1 for chemical structures and numbering). The values obtained were for the protons considered for quantification 2.6 s for H15 and 1.7 s for H17 of sildenafil, 2.7 s for H2/6 and 1.9 s for H11 of sulphamethopyrazine, 2.3 s for H7/9 and 1.1 s for H11 of pyrimethamine. The longest relaxation time was that of TSP and was measured at 3.4 s. All the  $^1\text{H}$  resonances quantified were considered as fully relaxed since more than 96% of the signal intensity of the TSP protons was recovered in the recording conditions used. This was also confirmed by experiments on two genuine formulations (Cialis 20 and Artesunat 50) with a relaxation delay of 15 s which did not lead to a significant change in the signal intensities.

The accuracy of the assay based on the internal standard method was evaluated on five different solutions of standard sildenafil of known concentrations ( $\approx 5$  mM) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  and was found to be  $99.5 \pm 2.7\%$ . It was also estimated by comparing quantitative data obtained from LF and HF experiments carried out on the same sample of the genuine medicines Cialis 20, Levitra 20, Sildenafil 100 and Metakelfin and of the falsified samples 6, 15, 20 and 22. The relationship between the concentrations measured at both NMR fields is very

good as demonstrated by a correlation coefficient  $r$  of 0.9998 and a slope of 0.974 (Fig. 7) as well as differences between HF and LF NMR measurements ranging from -6.4% to +3.2% with a mean value of -1.1%. Moreover, the  $p$ -value of 0.9844 obtained with the Wilcoxon signed-rank test, which is a nonparametric version of the paired  $t$ -test, applied to the two sets of data shows that they are not statistically different. The repeatability of the assay, evaluated on a 5 mM solution of standard sildenafil in  $CD_3OD$  and expressed as percentage of relative standard deviation (RSD), is 1.4%. LOD and LOQ were measured on  $CD_3OD$  solutions of standard sildenafil ranging from 0.16 to 4.30 mM. After 5.5 min of acquisition, LODs were evaluated at 0.2 mM for a  $CH_3$  singlet ( $CH_3$  10), 0.7 mM for the central signal of a triplet ( $CH_3$  13), and 0.8 mM for a doublet (H18). The LOQs measured on the same signals after 45 min of acquisition were 0.3, 0.9 and 2.5 mM, respectively.

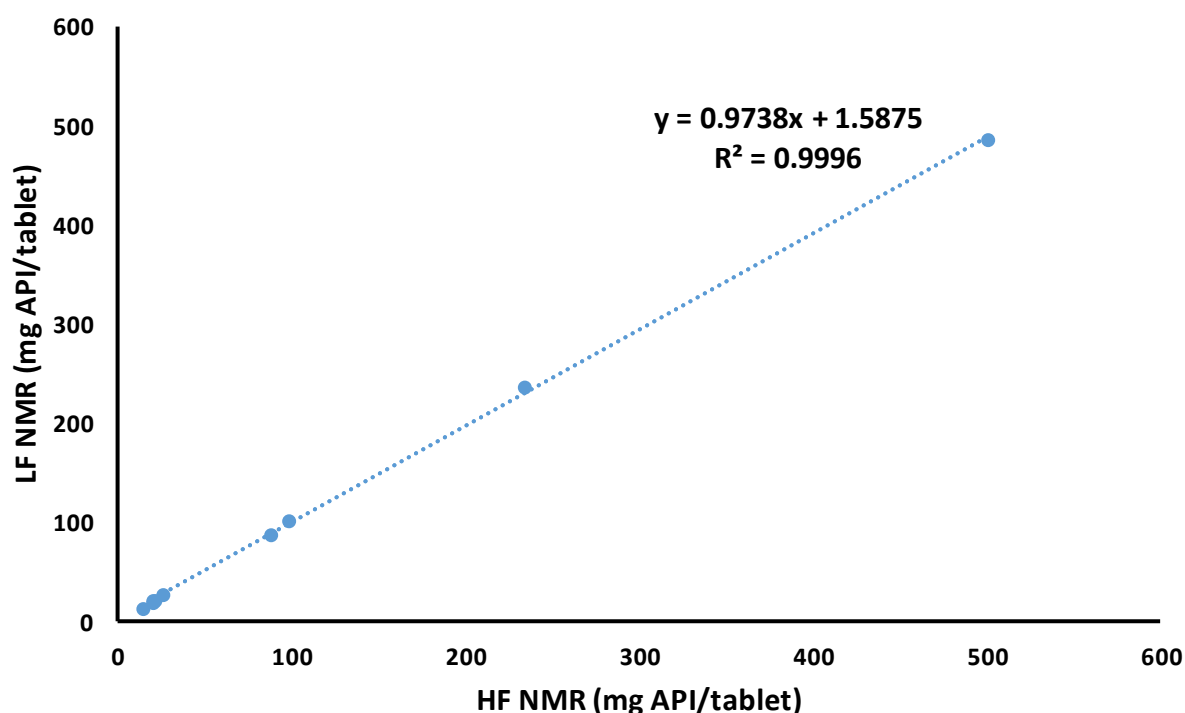


Figure 7: Comparison of APIs amounts measured by HF and LF  $^1H$  NMR in genuine and falsified formulations.

The results obtained for the quantitative analysis of the four genuine medicines and the four falsified formulations cited above are reported in Table 3. Despite the complexity of the LF  $^1H$  NMR spectra, especially for EDD, it was possible to find at least one characteristic signal of each API that can be used for quantification (shown in bold in Table 2). Except for one sample (15), the accuracy of the assay is good with RSD <5%. For genuine samples, the comparison of the amount of API(s) found with the stated dosage shows a good recovery percentage within the acceptable limits of 95-105% required by the usual pharmaceutical guidelines (Pharmacopoeias, ICH). Regarding the falsified medicines and beyond the presence of a wrong API in samples 6 and 20 already highlighted by their qualitative analysis, the very low dose of sildenafil in sample 15, as well as less than half the stated amount of sulphamethopyrazine associated to a higher dose of pyrimethamine in formulation 22, must be noticed. The LF  $^1H$  NMR profiles of these samples (not shown for 15 and illustrated in

Fig. 6 for **22**) do not allow to reveal their wrong dosages. The large difference in amounts of sulphamethopyrazine and pyrimethamine in formulation **22** associated to the fast extraction procedure used for the qualitative analysis with a low volume of solvent (1 mL) to extract a high amount of powder (100 mg) did not lead to a complete extraction of sulphamethopyrazine. These examples stress the interest of performing a quantitative analysis even if the qualitative profile seems correct.

Table 3: Quantitative analyses of genuine and fake formulations.

	Formulation	Stated		Found			Recovery % <sup>a</sup>	
	Name or number	API	Amount mg/tablet	API	Amount mg/tablet	RSD %		
Genuine	Sildenafil	sildenafil	100	sildenafil	100.3 ± 4.7	4.7	100.3	
	Cialis	tadalafil	20	tadalafil	18.9 ± 0.8	4.2	94.5	
	Levitra	varденаfil	20	varденаfil	20.0 ± 0.7	3.5	100.0	
	Metakelfin	sulphamethopyrazine	pyrimethamine	500	pyrimethamine	486 ± 23	4.7	97.1
			pyrimethamine	25	pyrimethamine	26.0 ± 0.3	1.2	104.0
Fake	(6)	tadalafil	50	sildenafil	87.8 ± 4.0	4.6		
	(15)	sildenafil	100	sildenafil	13.2 ± 1.3	9.8		
	(20)	artesunate	50	artemisinin	19.7 ± 0.1	3.0		
	(22)	sulphamethopyrazine	pyrimethamine	500	pyrimethamine	236 ± 7		3.0
			pyrimethamine	25	pyrimethamine	30.2 ± 0.9		0.5

<sup>a</sup> Percentage of API measured with respect to the stated amount.



## 4. Discussion

This study demonstrates that falsified medicines can readily be detected with a benchtop LF NMR spectrometer operating at 60 MHz. After a very simple and rapid sample preparation,  $\approx 5$  min of recording are sufficient to conclude on the quality of the medicine, i.e. presence or absence of the expected API, presence of unexpected API, absence of any API.

The loss in sensitivity inherent to this kind of spectrometers is not a real limitation in the case of falsified medicines as the concentration of the API, correct or not, is usually substantial. If we consider a mean LOD of 0.6 mM and an API molecular weight of  $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , it is possible to detect, in our experimental conditions,  $\approx 0.2$  mg of API in the 100 mg portion of the powdered tablet taken for the qualitative analysis, i.e.  $\approx 0.5$  mg of the API for an average tablet mass of 250 mg. So, even medicines deliberately falsified with low amounts of a correct API in order to pass the “in the field” TruScan or Minilab tests could be detected with LF NMR.

The reduction of the frequency dispersion can lead to congested spectra with numerous signal overlaps, and to second-order couplings that can make difficult the analysis of the spectrum in the context of structural elucidation. So, the best way to overcome these difficulties is to consider the whole spectrum as a spectral signature in which not all signals can be assigned and to resort to more sophisticated techniques (HF NMR and/or mass spectrometry) if an unambiguous structural determination of the API is required. Despite those limitations, LF NMR nevertheless provides enough structural clues for a rapid screening of falsified medicines with a beginning of identification of API(s) present in the formulation at worst. This study also shows that at least one characteristic signal can be used for quantification of the API and that the quantification by the internal standard method can be done on the LF NMR spectrometer in a reasonable period of time (45 min vs 11 min with HF NMR) with a satisfactory accuracy.

Benchtop LF NMR cannot yet compete with portable devices that can be used in the field for screening the quality of medicines, such as the GPHF Minilab, the CD3/CD3+ or the TruScan RM [25] because of its still high purchase cost especially for LMIC ( $\approx 80$  k€ for the spectrometer used in this study), its size and weight, the need of electric supply and some consumables, and its invasive character (in contrast to IR and Raman spectroscopies). However, LF NMR has many assets. It requires minimal sample preparation although in a deuterated solvent (except for equipment that use an external lock such as the Magritek Spinsolve benchtop NMR spectrometer). It gives information on the chemical identity of API(s). It is easily quantitative without resorting to reference substances as TSP can be used for the assay of any API. It is a “push-button” technology with an easy-to-use software that does not require personnel with a high level of qualification (it is used by chemistry students in undergraduate labs [21]).

All these advantages along with the technical improvements already implemented by manufacturers or still in progress (magnetic field gradient coils, automated sample changer, remote control of the

spectrometer) should allow the introduction of benchtop LF NMR in quality control laboratories and governmental agencies (customs, fraud control, medicines regulatory agencies) as a routine screening technology for detecting medicine falsification.

## 5. Conclusion

The present study demonstrates for the first time the potential of a benchtop LF NMR spectrometer for uncovering drug falsification. The preparation of the sample is easy and the qualitative  $^1\text{H}$  NMR spectrum quickly obtained, enabling a rapid and conclusive screening of poor-quality medicines. The LF  $^1\text{H}$  NMR assay, based on the internal standard method, was validated in terms of accuracy, repeatability, and sensitivity and was successfully applied to some medicines either genuine or falsified. With the benchtop format, NMR spectrometers that were rarely used in quality control analysis, especially due to cost constraints, might be part of the analytical arsenal to detect falsified medicines.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Facundo Fernandez, Paul Newton, and Harparkash Kaur for providing antimalarial medicines as well as the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé: ANSM) for financial support (grant AAP-2012-082, convention ANSM/UPS $\text{\textcircled{N}}^{\circ}$ 2012S071).

## References

- [1] R. Liu, S. Lundin, Falsified medicines: literature review, Working Papers in Medical Humanities 2 (2016) 1-25, <http://journals.lub.lu.se/index.php/medhum/index>.
- [2] WHO, <http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/definitions/en/> (accessed 27/09/2018).
- [3] WHO, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/substandard-and-falsified-medical-products> (accessed 27/09/2018).
- [4] G.M. Nayyar, A. Attaran, J.P. Clark, M.J. Culzoni, F.M. Fernandez, J.E. Herrington, M. Kendall, P.N. Newton, J.G. Breman, Responding to the pandemic of falsified medicines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92 (2015) 113-118, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0393>.
- [5] B.D. Glass, Counterfeit drugs and medical devices in developing countries, *Res. Rep. Trop. Med.* 5 (2014) 11-22, <https://doi.org/10.2147/RRTM.S39354>.
- [6] N. Campbell, J.P. Clark, V.J. Stecher, I. Goldstein, Internet-ordered viagra (sildenafil citrate) is rarely genuine, *J. Sex Med.* 9 (2012) 2943-2951, <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2012.02877.x>.
- [7] R. Martino, M. Malet-Martino, V. Gilard, S. Balayssac, Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 77-92, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3748-y>.
- [8] L. Höllein, E. Kaale, Y.H. Mwalwisi, M.H. Schulze, U. Holzgrabe, Routine quality control of medicines in developing countries: Analytical challenges, regulatory infrastructures and the prevalence of counterfeit medicines in Tanzania, *Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 60-70, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.009>.

- [9] D. Custers, P. Courselle, S. Apers, E. Deconinck, Chemometrical analysis of fingerprints for the detection of counterfeit and falsified medicines, *Rev. Anal. Chem.* 35 (2016) 145-168, <https://doi.org/10.1515/revac-2016-0013>.
- [10] H. Rebiere, P. Guinot, D. Chauvey, C. Brenier, Fighting falsified medicines: the analytical approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142 (2017) 286-306, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.010>.
- [11] L. Roth, A. Nalim, B. Turesson, L. Krech, Global landscape assessment of screening technologies for medicine quality assurance: stakeholder perceptions and practices from ten countries, *Global. Health* 14 (2018) 43, <https://doi.org/10.1186/s12992-018-0360-y>.
- [12] M. Hajjou, Y.Y. Qin, S. Bradby, D. Bempong, P. Lukulay, Assessment of the performance of a handheld Raman device for potential use as a screening tool in evaluating medicines quality, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74 (2013) 47-55, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.09.016>.
- [13] B.K. Wilson, H. Kaur, E.L. Allan, A. Lozama, D. Bell, A new handheld device for the detection of falsified medicines: demonstration on falsified artemisinin-based therapies from the field, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96 (2017) 1117-1123, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0904>.
- [14] B. Gouilleux, B. Charrier, E. Danieli, J.N. Dumez, S. Akoka, F.X. Felpin, M. Rodriguez-Zubiri, P. Giraudeau, Real-time reaction monitoring by ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer, *Analyst* 140 (2015) 7854-7858, <https://doi.org/10.1039/C5AN01998B>.
- [15] K. Singh, B. Blümich, NMR spectroscopy with compact instruments, *Trends Anal. Chem.* 83 (2016) 12-26, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.014>.
- [16] K. Meyer, S. Kern, N. Zientek, G. Guthausen, M. Maiwald, Process control with compact NMR, *Trends Anal. Chem.* 83 (2016) 39-52, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.016>.
- [17] K. Singh, B. Blümich, Desktop NMR for structure elucidation and identification of strychnine adulteration, *Analyst* 142 (2017) 1459-1470, <https://doi.org/10.1039/C7AN00020K>.
- [18] B. Blümich, Beyond compact NMR, *Micropor. Mesopor. Mat.* 269 (2018) 3-6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.04.039>
- [19] B. Blümich, K. Singh, Desktop NMR and its applications from materials science to organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Edit.* 57 (2018) 6996-7010, <https://doi.org/10.1002/anie.201707084>
- [20] A. Zivkovic, J.J. Bandolik, A.J. Skerhut, C. Coesfeld, M. Prascovic, L. Zivkovic, H. Stark, Quantitative analysis of multicomponent mixtures of over-the-counter pain killer drugs by low-field NMR spectroscopy, *J. Chem. Educ.* 94 (2017) 121-125, <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00105>.
- [21] G. Pagès, A. Gerdova, D. Williamson, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino, Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field  $^1\text{H}$  NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11897-11904, <https://doi.org/10.1021/ac503699u>.
- [22] G. Assemat, B. Gouilleux, D. Bouillaud, J. Farjon, V. Gilard, P. Giraudeau, M. Malet-Martino, Diffusion-ordered spectroscopy on a benchtop spectrometer for drug analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 160 (2018) 268-275, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.011>.
- [23] V. Gilard, S. Balayssac, A. Tinaugus, N. Martins, R. Martino, M. Malet-Martino, Detection, identification and quantification by  $^1\text{H}$  NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 476-493, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.011>.
- [24] B. Gouilleux, J. Marchand, B. Charrier, G.S. Remaud, P. Giraudeau, High-throughput authentication of edible oils with benchtop Ultrafast 2D NMR, *Food Chem.* 244 (2018) 153-158, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.016>.
- [25] S. Vickers, M. Bernier, S. Zambrzycki, F.M. Fernandez, P.N. Newton, C. Caillet, Field detection devices for screening the quality of medicines: a systematic review. *BMJ Glob. Health*, 3 (2018) e000725, <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-000725>.

### 3 RMN DOSY à bas champ pour l'analyse de médicaments

Comme nous venons de le voir dans l'article précédent, une grande partie des formulations pharmaceutiques conventionnelles sont, du fait de la concentration importante en actif, analysables par RMN bas-champ par de simples expériences monodimensionnelles du proton. Ces expériences permettent la détection du ou des principes actifs présents. Toutefois dans certains cas, la présence d'excipients, qu'ils soient sous formes de macromolécules, de sucres, etc... associés aux problématiques engendrées par la diminution du champ magnétique et donc à la diminution de l'étalement en fréquence, peuvent conduire à des spectres complexes avec de forts recouvrements. Il en résulte que la dimension spectroscopique n'est souvent qu'insuffisamment résolue pour permettre une caractérisation complète de la préparation pharmaceutique.

Un aspect que nous avons souhaité explorer dans le cadre de cette étude est de tirer profit de la capacité de la RMN à mesurer des informations dynamiques pour envisager une séparation des composés en mélange. Pour cela, nous avons voulu mettre en œuvre à bas champ des expériences diffusionnelles, principalement au travers d'expériences de type DOSY. La majorité des expériences RMN permettant de se procurer de telles informations nécessite l'utilisation de bobines de gradients ce qui n'était pas le cas sur le spectromètre sur lequel nous avons mis en place l'étude précédente. Pour ce travail, j'ai eu l'opportunité de travailler avec l'équipe du Pr Giraudeau à Nantes qui possède le premier spectromètre bas champ équipé de bobines de gradients. Cette collaboration m'a permis d'approfondir des aspects méthodologiques et de m'impliquer dans la mise au point de ces expériences. La diffusion, n'étant pas le cœur de mon sujet, j'ai choisi de ne pas détailler les aspects diffusion dans la partie introductive mais je rappellerai ici brièvement, quelques notions essentielles à la compréhension de l'article.

En solution, le déplacement d'une molécule guidé par l'énergie interne du système en fonction de sa taille, de la température de travail, de son rayon hydrodynamique et de la viscosité du milieu, constitue ce que l'on appelle la diffusion. Chaque molécule possède un coefficient de diffusion propre donné par l'équation de Stokes-Einstein ci-après :

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

Avec D le coefficient de diffusion, k la constante de Boltzmann, T la température,  $\eta$  la viscosité dynamique et  $R_H$  le rayon hydrodynamique de la molécule considérée sphérique.

Introduire une seconde dimension basée sur cette diffusion, à l'aide de gradients de champs pulsés, semble donc être une solution intéressante pour séparer les composés en mélange. A haut champ, des expériences DOSY permettant de réunir sur une carte l'information spectroscopique et les coefficients de diffusion existent. Depuis les années 1965, les séquences d'impulsions associées ne cessent de s'améliorer pour pallier les problèmes successifs rencontrés. En effet, l'utilisation de gradients de champs pulsés induit l'apparition de courants de Foucault, induisant eux-mêmes des problèmes de convection, empêchant la mesure de coefficients de diffusion. Des séquences d'écho de spin stimulé avec des gradients pulsés bipolaires et un délai LED avant l'acquisition (BPP-STE-LED) ainsi que des séquences prévenant la convection ont donc été élaborées, permettant à la fois d'utiliser la DOSY comme un outil puissant de déconvolution mais aussi de mesure des valeurs de coefficients de diffusion des espèces en solution.

L'intérêt des expériences DOSY en RMN haut champ pour l'analyse de formulations pharmaceutiques a déjà été démontré. En effet, la RMN DOSY est un outil de déformulation et de signature spectrale efficace pour la caractérisation de médicaments contrefaits. Transposer ces expériences DOSY sur un spectromètre à bas champs semble donc être une application qu'il serait tout à fait pertinent d'étudier dans le cadre de cette thèse.

Dans la publication donnée ci-après, nous montrons la première expérience DOSY, enregistrée sur un spectromètre RMN de paillasse équipé pour la première fois de bobines de gradients. Différentes séquences d'impulsions ont été évaluées, en adaptant les paramètres de diffusion aux contraintes imposées par l'instrumentation utilisée, à savoir ici une bobine de gradient ne pouvant fournir un maximum que de  $0.16 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$  et l'omniprésence de couplages forts. La géométrie des aimants de type Halbach, procurant un champ magnétique statique  $B_0$  perpendiculaire au tube a solutionné les problématiques liées à la convection. La séquence d'impulsion précédemment décrite (BPP-STE-LED) s'est montrée efficace pour pallier les problèmes associés aux courants de Foucault. Elle a également permis de significativement limiter l'évolution des cohérences à zéro quantum, accentuées par la présence de couplages forts à bas champ. La faible puissance délivrée par la bobine de gradient contraint à utiliser de longues périodes de diffusion, de fait, des optimisations spécifiques aux expériences bas-champs, visant principalement à limiter la perte d'information associée au temps de relaxation transversal ont dû être considérées.

La façon d'échantillonner la dimension diffusion a également été étudiée. En effet, un échantillonnage linéaire dans des formulations pouvant contenir en même temps des actifs et des macromolécules, n'est pas forcément idéal, de fait des échantillonnages exponentiels et sigmoïdaux procurant un grand

nombre de point pour, à la fois les molécules diffusant rapidement et celles diffusant lentement, ont été implémentés et évalués.

Dans cette preuve de concept, du fait des difficultés engendrées par des incompatibilités entre les logiciels d'acquisition et les logiciels de traitement des données, les décroissances ont été étudiées uniquement via des modes de fitting exponentiels ou bi-exponentiels permettant l'obtention de résultats prometteurs mais potentiellement encore optimisables. Les expériences de DOSY à bas champ ne permettent pas encore en l'état la mesure précise de coefficients de diffusion, mais peuvent d'ores et déjà être considérées comme un outil puissant de déconvolution.

# Diffusion-ordered spectroscopy on a benchtop spectrometer for drug analysis

Gaëtan Assemat<sup>a,§</sup>, Boris Gouilleux<sup>b,§</sup>, Dylan Bouillaud<sup>b</sup>, Jonathan Farjon<sup>b</sup>, Véronique Gilard<sup>a</sup>, Patrick Giraudeau<sup>b,c,\*</sup> and Myriam Malet-Martino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical NMR group, Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France

<sup>b</sup> CEISAM CNRS, UMR6230, EBSI team, Université de Nantes, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

<sup>c</sup> Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, 75005 Paris Cedex 05, France

<sup>§</sup> These authors contributed equally to this work.

Co-corresponding author: Pr Myriam Malet-Martino, Biomedical NMR group, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France.

Tel: 33561556890; e-mail: [martino@chimie.ups-tlse.fr](mailto:martino@chimie.ups-tlse.fr)

Co-corresponding author: Pr Patrick Giraudeau, CEISAM CNRS, UMR6230, EBSI team, Université de Nantes, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France. Tel: 33251125709, e-mail:

[patrick.giraudeau@univ-nantes.fr](mailto:patrick.giraudeau@univ-nantes.fr)



## Diffusion-ordered spectroscopy on a benchtop spectrometer for drug analysis

Gaëtan Assemat<sup>a,†</sup>, Boris Gouilleux<sup>b,†</sup>, Dylan Bouillaud<sup>b</sup>, Jonathan Farjon<sup>b</sup>,  
Véronique Gilard<sup>a</sup>, Patrick Giraudeau<sup>b,c,\*,\*\*</sup>, Myriam Malet-Martino<sup>a,\*,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical NMR Group, Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France  
<sup>b</sup> CEISAM CNRS, UMR6230, EBSI Team, Université de Nantes, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France  
<sup>c</sup> Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, 75005 Paris Cedex 05, France

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 15 April 2018  
Received in revised form 27 July 2018  
Accepted 5 August 2018  
Available online 6 August 2018

Keywords:  
Benchtop NMR  
Low field NMR  
DOSY NMR  
Drug analysis

### ABSTRACT

The first reported two-dimensional diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) experiments were recorded at low field (LF) on a benchtop NMR spectrometer using the BPP-STE-LED (bipolar pulse pair-stimulated echo) sequence with a longitudinal eddy current delay (j) pulse sequence which limits phase anomalies and baseline discrepancies. A LF DOSY map was first obtained from a solution of a model pharmaceutical formulation containing a macromolecule and an active pharmaceutical ingredient. It revealed a clear separation between the components of the mixture and gave apparent diffusion coefficients (ADC) values consistent with those measured from the reference high field experiment. LF DOSY was then applied to a real escopolamine medicine and several gradient sampling schemes (linear, exponential and semi-gaussian (SG)) were compared. With a pulsed field gradient range of 4.70s, the most reliable results were given by the SG ramp. The resulting LF DOSY map obtained after 2.84h of acquisition confirmed that the diffusion dimension is of prime interest to facilitate the assignment of overcrowded LF spectra although relevant ADC values could not be obtained in part of the spectrum with highly overlapped signals.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Although NMR is not considered as a routine tool in the quality control field due to its high purchase and maintenance costs, the ability of this technique to provide a large amount of information (structural, qualitative, quantitative, diffusion) could make it an essential tool in pharmaceutical manufacturing industries and quality control laboratories [1]. In the pursuit of a better analytical performance in terms of resolution and sensitivity, modern high-resolution NMR spectrometers rely on higher and higher static magnetic fields provided by large superconducting magnets. While high resolution NMR is competitive with other analytical techniques—allowing micromolar compound detection—this bulky

and sophisticated instrumentation is not always compatible with demanding industrial environments and usually requires a dedicated room and a trained staff to operate technical and cryogenic maintenance.

As an alternative, a new generation of compact and cryogen-free low-field (LF) spectrometers has emerged [2]. These permanent magnets have reached a sufficient level of maturity to afford a stable and homogeneous enough static magnetic field to resolve the chemical shift information. They can deliver NMR spectra with a sufficient quality to generalize their use in various fields of application such as chemical process monitoring [2–6], food screening [7–9], quality control of dietary supplements [10] and more recently in drug analysis [11]. However, those spectrometers operating at <sup>1</sup>H resonance frequencies between 40 and 80 MHz involve a drastic loss of analytical performances. Besides the loss in sensitivity, the reduction of the frequency dispersion leads to two main drawbacks: i) congested spectra with strong signal overlaps, especially in the case of complex mixtures; ii) ubiquitous second order couplings making the analysis of signal patterns a tricky task in the context of structural elucidation. The recent implementation of gradient coils in commercial LF NMR spectrometers opens the way to modern and efficient experiments, which improve the

<sup>†</sup> Corresponding author at: Biomedical NMR Group, Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France.

<sup>\*\*</sup> Corresponding author at: CEISAM CNRS, UMR6230, EBSI Team, Université de Nantes, BP 92208, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France.

E-mail addresses: [patrick.giraudeau@univ-nantes.fr](mailto:patrick.giraudeau@univ-nantes.fr) (P. Giraudeau), [martino@chimie.ups-tlse.fr](mailto:martino@chimie.ups-tlse.fr) (M. Malet-Martino).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.011>  
0731-7090/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Abstract

The first reported two-dimensional diffusion-ordered spectroscopy (DOSY) experiments were recorded at low field (LF) on a benchtop NMR spectrometer using the BPP-STE-LED (bipolar pulse pair-stimulated echo sequence with a longitudinal eddy current delay) pulse sequence which limits phase anomalies and baseline discrepancies. A LF DOSY map was first obtained from a solution of a model pharmaceutical formulation containing a macromolecule and an active pharmaceutical ingredient. It revealed a clear separation between the components of the mixture and gave apparent diffusion coefficients (ADC) values consistent with those measured from the reference high field experiment. LF DOSY was then applied to a realesomeprazole medicine and several gradient sampling schemes (linear, exponential and semi-gaussian (SG)) were compared. With a pulsed field gradient range of 4-70%, the most reliable results were given by the SG ramp. The resulting LF DOSY map obtained after 2.84 h of acquisition confirmed that the diffusion dimension is of prime interest to facilitate the assignment of overcrowded LF spectra although relevant ADC values could not be obtained in part of the spectrum with highly overlapped signals.

**Keywords:** Benchtop NMR; Low field NMR; DOSY NMR; Drug analysis



## 1. Introduction

Although NMR is not considered as a routine tool in the quality control field due to its high purchase and maintenance costs, the ability of this technique to provide a large amount of information (structural, qualitative, quantitative, diffusion) could make it an essential tool in pharmaceutical manufacturing industries and quality control laboratories [1]. In the pursuit of a better analytical performance in terms of resolution and sensitivity, modern high-resolution NMR spectrometers rely on higher and higher static magnetic fields provided by large superconducting magnets. While high resolution NMR is competitive with other analytical techniques -allowing micromolar compound detection-, this bulky and sophisticated instrumentation is not always compatible with demanding industrial environments and usually requires a dedicated room and a trained staff to operate technical and cryogenic maintenance.

As an alternative, a new generation of compact and cryogen-free low-field (LF) spectrometers has emerged [2]. These permanent magnets have reached a sufficient level of maturity to afford a stable and homogeneous enough static magnetic field to resolve the chemical shift information. They can deliver NMR spectra with a sufficient quality to generalize their use in various fields of application such as chemical process monitoring [2-6], food screening [7-9], quality control of dietary supplements [10] and more recently in drug analysis [11]. However, those spectrometers operating at  $^1\text{H}$  resonance frequencies between 40 and 80 MHz involve a drastic loss of analytical performances. Besides the loss in sensitivity, the reduction of the frequency dispersion leads to two main drawbacks: i) congested spectra with strong signal overlaps, especially in the case of complex mixtures; ii) ubiquitous second order couplings making the analysis of signal patterns a tricky task in the context of structural elucidation. The recent implementation of gradient coils in commercial LF NMR spectrometers opens the way to modern and efficient experiments, which improve the LF NMR performance [4] and increase its application potential in a high-throughput industrial context.

Introducing a diffusion dimension based on pulsed field gradient (PFG) experiments is an appealing solution to analyse complex mixtures. Incrementing the intensity of the PFG leads to a signal attenuation described by the well-known Stejskal and Tanner equation [12]. By fitting this attenuation, a virtual separation between the different components of a mixture is obtained, which gives access to their individual sub-spectra. Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) is a powerful data processing tool introduced by Morris and Johnson [13,14] which allows a two-dimensional (2D) map representation with one dimension corresponding to frequencies and the other to apparent diffusion coefficients (ADC). Several efficient processing algorithms have been suggested to optimize the quality of DOSY experiments, all being gathered in the useful DOSY Toolbox [15], recently updated to GNAT [16].

Diffusion experiments have already been reported at LF especially in the petroleum, polymer and food industries [6,17,18], but they mainly provided either single ADC measurements or diffusion-relaxation correlation maps. Here, we present the first 2D DOSY NMR experiments -whereby diffusion and chemical shifts are mapped together- on a commercial benchtop LF spectrometer equipped with a gradient coil, first on a model sample and then on a real medicine. The performances and limitations of this new approach are discussed, as well as its potential for pharmaceutical analysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

All chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deuterated solvents were obtained from Euriso-top (Gif-sur-Yvette, France).

The model sample was prepared by mixing 2 mg (i.e. 16 mM) of paracetamol with 5 mg of hypromellose 2910 (4000 cps) in 1 mL of DMSO-d<sub>6</sub>.

The generic formulation of Esomeprazole 40 mg from Ranbaxy was bought in a French pharmacy. A tablet was crushed in a mortar and 100 mg of the obtained powder were added to 1 mL of DMSO-d<sub>6</sub>. After sonication (5 min) and centrifugation (5 min, 3000 rpm), 700  $\mu$ L of supernatant and 90  $\mu$ L of a 10 mM solution of sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimethylsilyl) propanoate (TSP) in DMSO-d<sub>6</sub> (for chemical shift calibration) were introduced in a NMR tube.

### 2.2. HF NMR spectroscopy

HF NMR spectra were recorded on a Bruker 500 MHz AVANCE spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryoprobe set at 298 K. The maximum gradient strength this probe was able to deliver was 0.541 T/m (i.e. 54.1 G/cm). After calibration of the 90° radiofrequency pulse, diffusion experiments were recorded by using the bipolar pulse pair-stimulated echo sequence with a longitudinal eddy current delay (BPP-STE-LED) [19]. This sequence is based on a stimulated echo with unbalanced bipolar gradient pulses to remove unwanted magnetization and a LED delay to limit eddy currents. The duration of each gradient pulse ( $\delta/2$ ) was 1.5 and 3.0 ms for the model sample and the pharmaceutical formulation respectively while the diffusion time ( $\Delta$ ) was set at 200 and 500 ms. The spoiler gradients were either 600  $\mu$ s or 2 ms at -17.13 and -13.17% of the maximum gradient strength. All the gradient pulses had a sinusoidal shape to limit eddy currents. The gradient recovery time was 300  $\mu$ s for the model sample and 500  $\mu$ s for the esomeprazole drug and the relaxation delay was 3.5 s and 3.0 s, respectively. A total of 10 or 16 spectra with different gradient strengths were recorded. The gradient

strength ranged from 2 to 95% of the maximum gradient intensity. The gradient sampling was chosen from a home-written au-program and was semi-gaussian (i.e. sigmoid shape). Four dummy scans were recorded at the beginning of the experiment followed by 16 transients per gradient strength recorded in 32K data points. The total experimental time was 16.67 min for the model sample and 23.38 min for the esomeprazole sample.

### 2.3. Benchtop NMR spectroscopy

LF NMR experiments were performed on a Spinsolve benchtop spectrometer commercially available from Magritek (Germany), working at a frequency of 43.62 MHz via a permanent magnet based on a Halbach design [20,21]. This equipment includes a gradient coil along the  $B_0$ -axis (i.e. along the transverse plane of the NMR tube) which can generate a maximum field gradient of 0.16 T/m (i.e. 16 G/cm) and was operated through the programming interface Prospa 3.2. (Magritek, Germany). The diffusion experiments were performed with the BPP-STE-LED sequence schematized in Fig. 1 [19]. Moreover, the following 16-step phase cycling was used:

$\phi_1 = x$ ;  $\phi_2 = x$ ;  $\phi_3 = 2x, 2(-x)$ ;  $\phi_4 = 4x, 4(-x), 4y, 4(-y)$ ;  $\phi_5 = x$ ;  $\phi_6 = 2(x,-x), 2(-x,x), 2(y,-y), 2(-y,y)$ ;  $\phi_7 = 4x, 4(-x), 4y, 4(-y)$ ;  $\phi_{rx} = x, 2(-x), x, -x, 2x, -x, -y, 2y, -y, y, 2(-y), y$ .

This phase cycling enforces the coherence transfer pathway  $0 \rightarrow +1 \rightarrow -1 \rightarrow 0 \rightarrow +1 \rightarrow -1 \rightarrow 0 \rightarrow -1$ . All the diffusion experiments presented in the article share the following features. The diffusion dimension was sampled through 32 increments recorded with 80 scans separated by a total repetition time of 4 s involving a total experiment duration of 2.84 h. The FIDs contained 8192 points separated by a dwell time of 200  $\mu$ s leading to a detection time of 1.64 s. The flip angle of 90° was achieved by a pulse length of 6.7  $\mu$ s at 0 dB. The diffusion gradient pulses were applied during 2 ms ( $\delta/2$ ) with a trapezoidal shape including gradient ramps of 200  $\mu$ s. The gradient sampling was chosen from a home-written script and was either linear, exponential, or semi-gaussian. The time involved within the LED block was set at 8 ms. Other diffusion parameters were then adapted regarding the molecular weight of the compounds involved in the different analyzed mixtures. The DOSY maps of the model mixture containing paracetamol and hypromellose were performed with a diffusion delay ( $\Delta$ ) of 300 ms and a gradient strength range from 5 to 70%. A settle delay  $\tau$  of 0.2 ms following the gradient pulses was added. For the esomeprazole drug sample, the diffusion delay was set at 200 ms with a gradient strength range from 4 to 70%. The settle delay  $\tau$  following the gradient pulses was fixed at 1.5 ms.

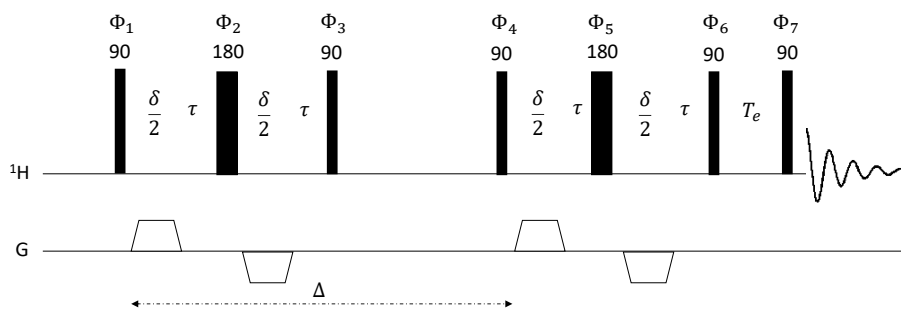


Figure 1: Schematic BPP-STE-LED pulse sequence.  $\Phi_x$  indicate pulse phases,  $\delta/2$  is the duration of each trapezoidal gradient,  $\tau$  is the recovery delay,  $T_e$  is the time involved within the LED block.  $\Delta$  is the diffusion time. Phase cycling and parameters values are reported in the experimental part.

## 2.4. DOSY processing

The diffusion data were processed in the DOSY toolbox with the following features [15]. The number of points was increased by one level of zero-filling to improve the digital resolution followed by a Gaussian apodisation with a 1.2 Hz and 1.5 Hz line broadening for the model mixture and the drug sample, respectively. After Fourier transformation, the resulting spectra experienced a manual phase correction and a baseline correction via a 3<sup>rd</sup> order polynomial function. After peak picking, the diffusion data were processed through a univariate approach whereby the decay of each signal is fitted to an exponential decay: mono-exponential for the model mixture and bi-exponential for the drug sample to cope with the numerous peak overlaps. The amplitude of the signal is given by the Stejskal–Tanner equation [12] adapted for the experiments relying on bipolar gradient pulses:

$$S(g) = S_0 e^{-D(\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3 - \tau/2)}$$

The DOSY maps were generated by extending the number of points in the diffusion dimension to 512.

## 3. Results and Discussion

The first step of the study was the choice of the diffusion pulse sequence which is of prime importance for the quality of the resulting DOSY maps. The criteria considered for this purpose were (i) that signals provide purely absorptive phased lineshapes and (ii) the quality of the baseline from spectra recorded at high gradient strengths. Regarding point (i), pulse sequences based on stimulated echoes are highly recommended to circumvent detrimental J-modulation effects pertained to Carr–Purcell echoes and  $T_2$  losses. Furthermore, the long diffusion delays required to balance the relative low gradient strength (0.16 T/m) potentially involve the evolution of zero-quantum coherences, especially in the presence of strong couplings. This leads to severe peak-distortions making phase correction of the resulting spectra unmanageable. This feature urged to use stimulated echoes relying on composite bipolar gradient pulses (BPP-STE) [19] whereby such undesired coherences are significantly limited [14,22]. Concerning point (ii), BPP-STE also provides a self-compensation of the

induced eddy currents while the overall gradient effect is similar regarding the diffusion encoding [19]. The quality of the baseline was further improved by adding a LED block prior to the detection [23]. The pulse sequence thus used is shown in Fig. 1.

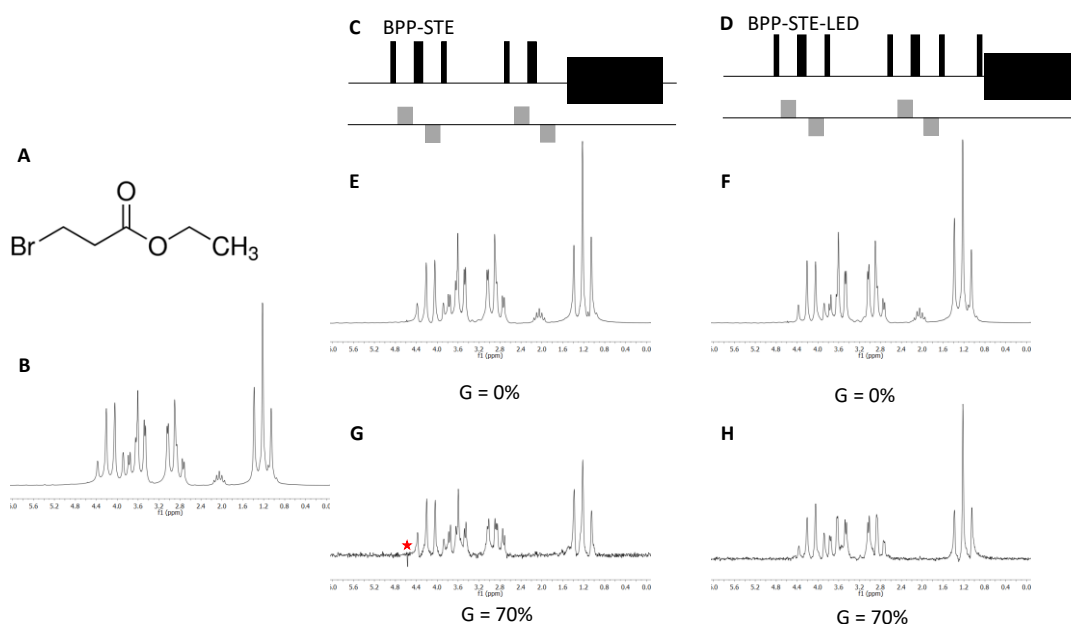


Figure 2: (A) Chemical structure of ethyl-bromopropionate. (B) 1D <sup>1</sup>H NMR spectrum of ethyl-bromopropionate. (C) Schematic BPP-STE pulse sequence. (D) Schematic BPP-STE-LED pulse sequence. (E) 1D <sup>1</sup>H NMR spectrum of ethyl-bromopropionate recorded with the pulse sequence (C) and null gradient. (F) 1D <sup>1</sup>H NMR spectrum of ethyl-bromopropionate recorded with the pulse sequence (D) and null gradient. (G) 1D <sup>1</sup>H NMR spectrum of ethyl-bromopropionate recorded with the pulse sequence (C) and a gradient amplitude of 70% (the red star shows an artefactual signal due to eddy currents). (H) 1D <sup>1</sup>H NMR spectrum of ethyl-bromopropionate recorded with the pulse sequence (D) and a gradient amplitude of 70%.

The performance in terms of phase and line shape of this BPP-STE-LED pulse sequence was compared to that of the BPP-STE sequence on a model compound, ethyl-bromopropionate (Fig. 2A). This small molecule, providing weak  $A_2X_3$  and strong  $A_2B_2$  coupled spin systems (Fig. 2B), is a relevant model to screen the potential phase anomalies related to the second order coupling. Fig. 2E and F show the 1D spectra recorded via bipolar experiments with null gradient values. The absorption phase mode together with clean line shapes highlight the performance of such bipolar experiments even in the presence of strong couplings. The same experiments were performed with high gradient pulses, e.g. 70% of the maximum value. The resulting 1D spectra point out slight signal and baseline distortions (Fig. 2G and H). Nevertheless, the quality of the data is sufficient to enable DOSY experiments. It could be noted that slightly better line shapes and a flatter baseline are provided by the BPP-STE-LED sequence with respect to the BPP-STE one (compare Fig. 2G and H).

To investigate the applicability of LF DOSY to real medicines, samples were prepared at low concentration (i.e. 10-15 mM), which is quite challenging for NMR experiments performed at 43 MHz. At such a concentration, 80 scans per increment were needed while the amplitude of the PFG did not exceed 70% of the maximum value. This led to raw data with a reasonable signal-to-noise ratio (SNR

>5 for the lowest signal) to carry out DOSY processing. 32 increments were used to sample the diffusion dimension involving an overall experiment duration of 2.84 h.

As a proof of concept, a model sample was prepared by mixing an active substance (paracetamol) and a macromolecule (hypromellose) often used in drug formulation as coating agent or tablet binder. The BPP-STE-LED experiment was applied with acquisition parameters reported in the experimental part. After an automatic peak-picking depending on a manually set threshold, the 2D DOSY maps were obtained with a mono-exponential fit. The whole processing was carried out with the DOSY Toolbox [15]. As a reliable point of comparison, a reference 2D DOSY map was recorded on the same sample via conditions routinely used in our laboratory on a 500 MHz spectrometer, with a total recording time of 17.5 min. Fig. 3 highlights the capability of LF diffusion experiments to deliver 2D DOSY maps leading to similar information compared to their HF counterpart. The LF DOSY map reveals a clear separation between the mixed substances and provides ADC values consistent with those obtained from the reference HF experiment. The ADC of the N-H exchangeable proton of paracetamol slightly differs from those of its other protons and this feature – already described for amide protons of proteins in the literature [24] – is observed in both HF and LF DOSY maps. Moreover, it is worth mentioning how the diffusion dimension overcomes the peak overlap around 3.5 ppm between the intense HOD line and signals from hypromellose. These results are consolidated by both mono-exponential fitting and residual curves (Fig. S1). In the case of well resolved and intense signals the mean residual error is lower than 3% and for overlapped resonances or broad signals the error even stays below 15%. Thanks to the SCORE algorithm [25] present in the DOSY toolbox, the NMR sub-spectra for specific diffusion coefficients were extracted (Fig. 3C). Compared to the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the mixture (Fig. 3B) and the LF  $^1\text{H}$  NMR spectra of standard paracetamol and hypromellose (Fig. S2), all components appeared virtually “purified” in their sub-spectra. These first results are promising and potentially warrant the use of LF DOSY on such samples, nonetheless at the cost of an increased experiment duration of at least one order of magnitude to compensate the inherent loss in sensitivity.

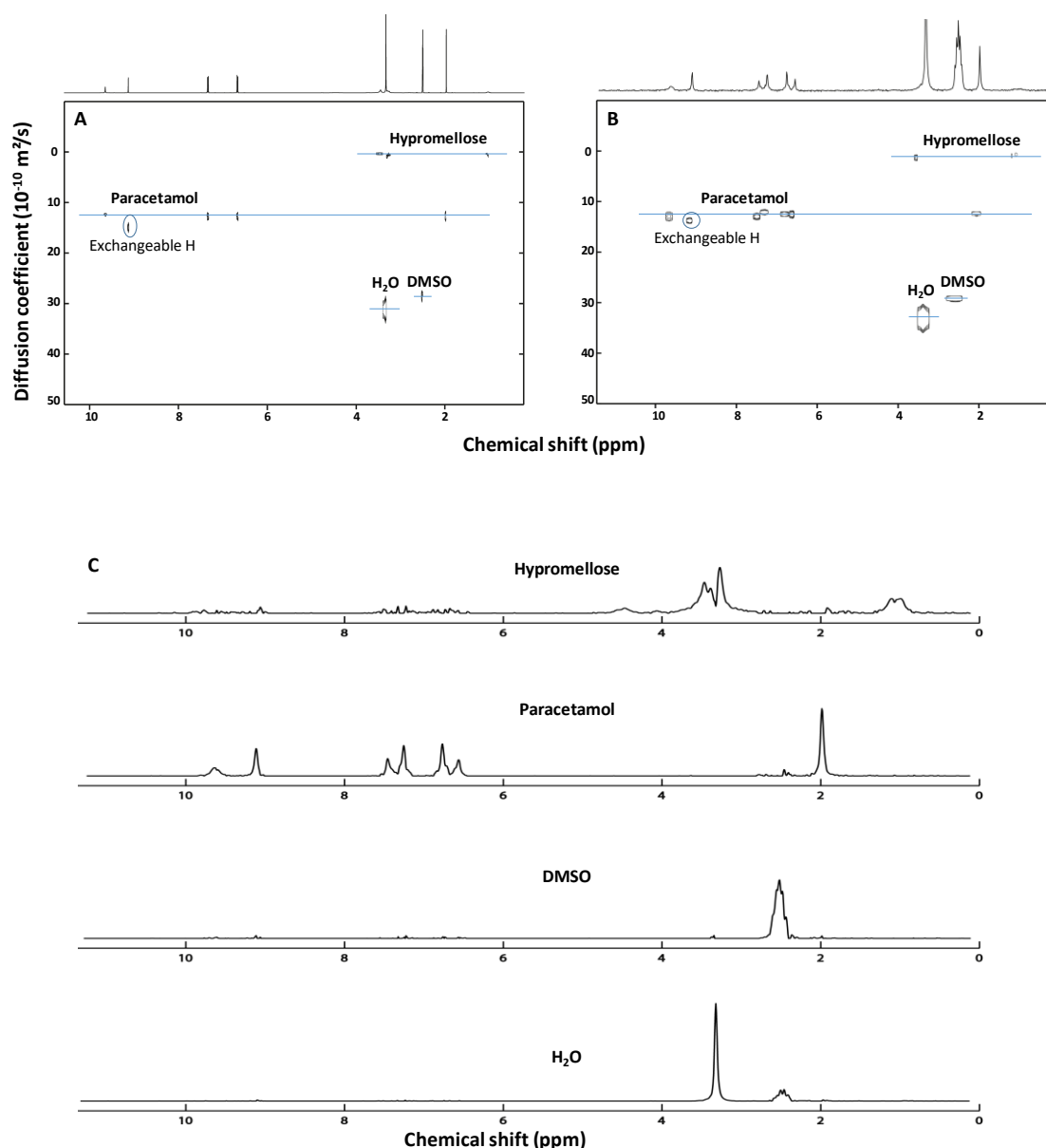


Figure 3:  $^1\text{H}$  NMR DOSY maps of a model sample containing paracetamol (16 mM) and hypromellose 2910 (4000 cps) in  $\text{DMSO-d}_6$  obtained (A) at 500 MHz with routinely used conditions (0.28 h), and (B) at 43 MHz (2.84 h). (C) Sub-spectra extracted from the DOSY map shown in (B). Both maps were obtained with BPP-STE-LED experiments and processed with the DOSY Toolbox [15]. Each blue line corresponds to a specific compound.

To go further in the investigation of both the potential and the limits of LF DOSY when applied to real medicines, we analyzed an esomeprazole drug formulation in  $\text{DMSO-d}_6$  [ $c_{\text{esomeprazole}} = 10 \text{ mM}$ ]. The resulting solution contains both high (hypromellose phthalate and povidone) and low (stearate, sucrose, esomeprazole, diethyl phthalate plus an added internal reference (TSP)) molecular weight compounds. This sample was therefore quite challenging and as it can be seen on the F2 projections shown in Fig. 4, the spectroscopic dimension is clearly congested and insufficient to enable a complete characterization of such a formulation. This was thus a milestone to assess how the addition of a diffusion dimension at 43 MHz could entirely or partially discriminate the different compounds and deliver consistent ADC values. Furthermore, it was reported by Pagès *et al.* [26] that in such complex

mixtures, sampling the diffusion dimension through a linear gradient ramp cannot provide reliable information on both small and large molecules. The same authors demonstrated that shaping the gradient ramp enabled the acquisition of a significant number of points for both the fast and slow diffusing molecules. Hence, to further improve the discrimination power of LF DOSY, shaped gradient sampling schemes, i.e. exponential and semi-gaussian (SG), were implemented and compared. This comparison is pointed out in Fig. 4. Fitting with our expectations, the SG and exponential ramps provided more consistent DOSY maps regarding peak alignment and ADC values compared to their linear counterpart. This is particularly apparent within the aromatic region where misalignments associated with the linear gradient sampling confuse the assignment of esomeprazole and diethyl phthalate (Fig. 4A). Both exponential and SG ramps outmatch these discrepancies (Fig. 4B and C) with a slightly better peak alignment observed in SG sampling, especially for the aliphatic signal of diethyl phthalate which lines up with the aromatic corresponding signal and has a coherent ADC value compared to its HF counterpart (Fig. 4C). It is worth mentioning that the fitting curves presented in Fig. S3 highlight a slightly lower residual error for the SG ramp probably due to the larger number of signals recorded at high gradient values. However, it should be noted that for sampling schemes with high PFG values (>70% of the maximum value) tested on the model sample, the SG ramp leads to unsuitable DOSY maps while the exponential one - more robust to strong gradients - should be recommended in this case (Fig. 5).

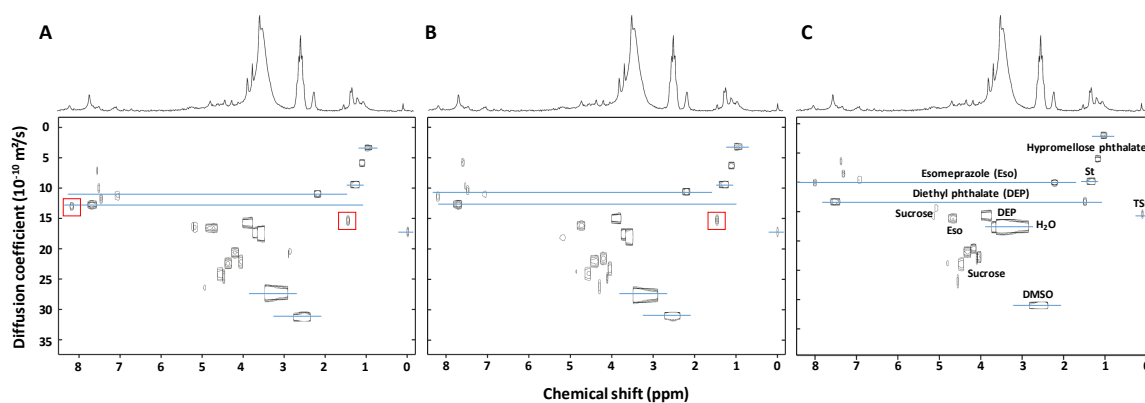


Figure 4: LF  $^1\text{H}$  NMR DOSY maps of an esomeprazole commercial sample (Ranbaxy) in  $\text{DMSO-d}_6$  recorded with a BPP-STE-LED pulse sequence and (A) a linear gradient ramp, (B) an exponential gradient ramp and (C) a semi-gaussian ramp. The red squares show misaligned signals due to the gradient ramp used. St: stearate; TSP: internal reference.



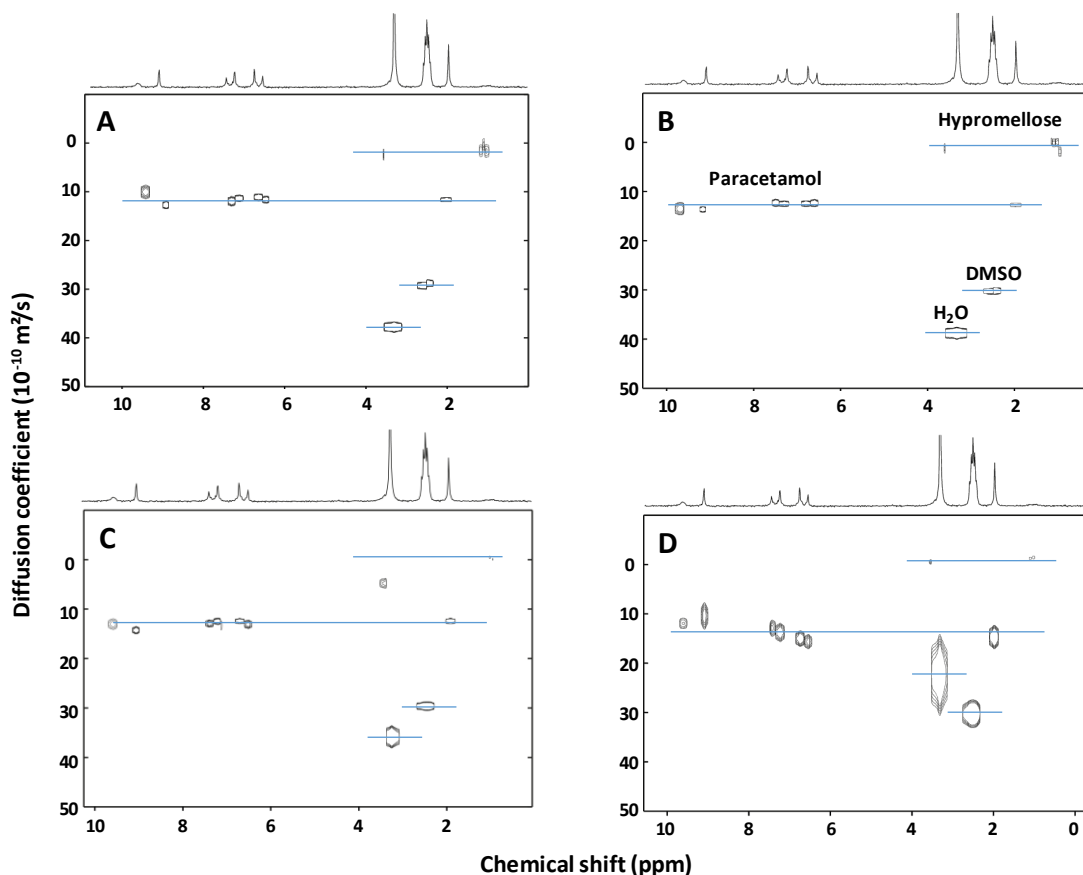


Figure 5: LF  $^1\text{H}$  NMR DOSY maps of a model sample containing paracetamol and hypromellose in  $\text{DMSO-d}_6$  recorded with (A) an exponential ramp and 70% of maximum gradient amplitude, (B) a semi-gaussian ramp and 70% of maximum gradient amplitude, (C) an exponential ramp and 95% of maximum gradient amplitude, and (D) a semi-gaussian ramp and 95% of maximum gradient amplitude.

In the present study with a PFG range of 4-70%, the SG ramp exhibits the most reliable results. The resulting LF DOSY map of the esomeprazole drug formulation obtained after parameter optimisation and 2.84 h of acquisition is presented in Fig. 6A. The parameters are the same as those described for the model sample except that the diffusion delay was decreased to 200 ms. The separation in the diffusion dimension, even between the small molecules is very efficient. Coherently aligned signals and ADC values in agreement with those measured at HF (Fig. 6B) are observed for esomeprazole and diethyl phthalate. Moreover, signals corresponding to the aromatic protons of diethyl phthalate and hypromellose phthalate can be separated while those signals are highly overlapped in the chemical shift dimension. It confirms once again that the diffusion dimension is of prime interest to facilitate the assignment of overcrowded LF spectra. However, it should be noted that for highly overlapped signals, LF diffusion experiments fail to deliver relevant ADC values and to provide a clear assignment of the corresponding compounds. This is mainly highlighted in the area between 3.0 and 5.0 ppm that includes the signals from water and sucrose as well as one resonance of both esomeprazole and diethyl phthalate. The large signal of water prevents a proper baseline

correction and thus induces a misalignment of the sucrose resonances, especially for the anomeric proton at 5.2 ppm, making the analysis far more complicated. It should also be noticed that the hypromellose phthalate signals are probably too large and overlapped to allow a proper alignment as well as coherent ADC. However, the diffusion dimension provides a good enough resolution to help with assignment and can be used as a deconvolution tool. Some other parameters, such as the operating temperature difference between HF and LF (25°C (HF) vs 28.5°C (LF)) and/or the bi-exponential fitting applied to overlapped signals with low SNR [27], might also partly explain these differences.

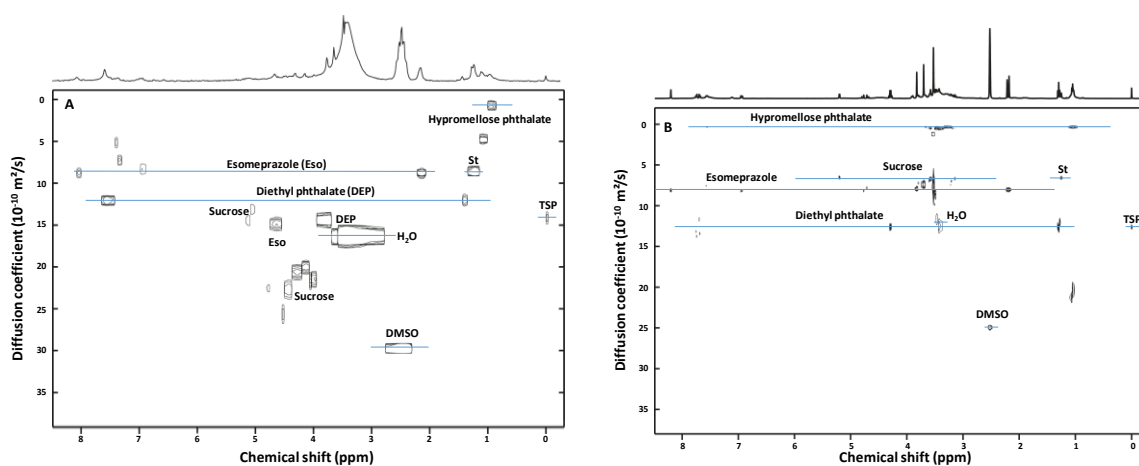


Figure 6: LF (A) and HF (B)  $^1\text{H}$  NMR DOSY maps of an esomeprazole commercial sample (Ranbaxy) recorded in  $\text{DMSO}-d_6$  with a BPP-STE-LED sequence and a semi-gaussian ramp. Each blue line corresponds to a specific compound. St: stearate; TSP: internal reference.

Overall, the results show a good discrimination allowing a deformation of complex mixture components in a reasonable experiment time, thus opening promising perspectives for the authentication and quality control of drugs at LF. Nevertheless, the loss of sensitivity inherent to LF, the poor response of macromolecules and the need for a  $\text{SNR} \geq 5$  even at high gradient strengths, force longer acquisition times or the use of higher concentrations. This reduces, for now, the applicability of this technique on industry routine basis, but could make it a second-best solution when the 1D spectrum cannot be directly assigned. Indeed, the diffusion dimension roughly compensates for the strong peak overlap caused by low frequency dispersion. With its current performance, LF DOSY should be viewed as a tool to separate the sub-spectra of individual components in a mixture, rather than to provide accurate values of diffusion coefficients.

However, in order to make this approach more applicable in a pharmaceutical environment and competitive with other analytical tools, which means being able to record a full DOSY map in less than one hour, the main remedy would be to increase the operating magnetic field (i.e.  $B_0$ ). At the time of writing, 60 and 80 MHz LF benchtop spectrometers increasing up to 2.8 times the SNR were

commercially available but were not (and still are not) equipped with gradient coils. Several recent technical developments leading to better field homogeneity, as well as the implementation of an autosampler, should improve the robustness of the DOSY experiment and enable the use of this technique in a high-throughput context. Moreover, other algorithms for diffusion-resolved data processing (DECRA [28], LOCODOSY [29], MaxEnt [30]...) would deserve to be tested although part of them still require to solve some software incompatibilities.

Other research perspectives which deserve to be investigated for more concentrated samples include the acceleration of LF DOSY via faster pulse sequences such as the OneShot pulse sequence [31], the use of non-uniform sampling [32], or even by yielding the diffusion dimension in a signal-scan manner through spatial encoding [33]. Homodecoupling strategies could also be investigated to further reduce peak overlapping in the chemical shift dimension although these pure shift approaches would be associated with a sensitivity penalty and with strong second order effects that could be particularly detrimental at low field [34]. Finally, LF DOSY experiments could also be used in other fields of applications, for example to investigate intermolecular interactions in supramolecular assemblies or nanoparticles. This proof of concept opens the way to a large range of experiments, which could be explored in a near future.

## Supplementary material

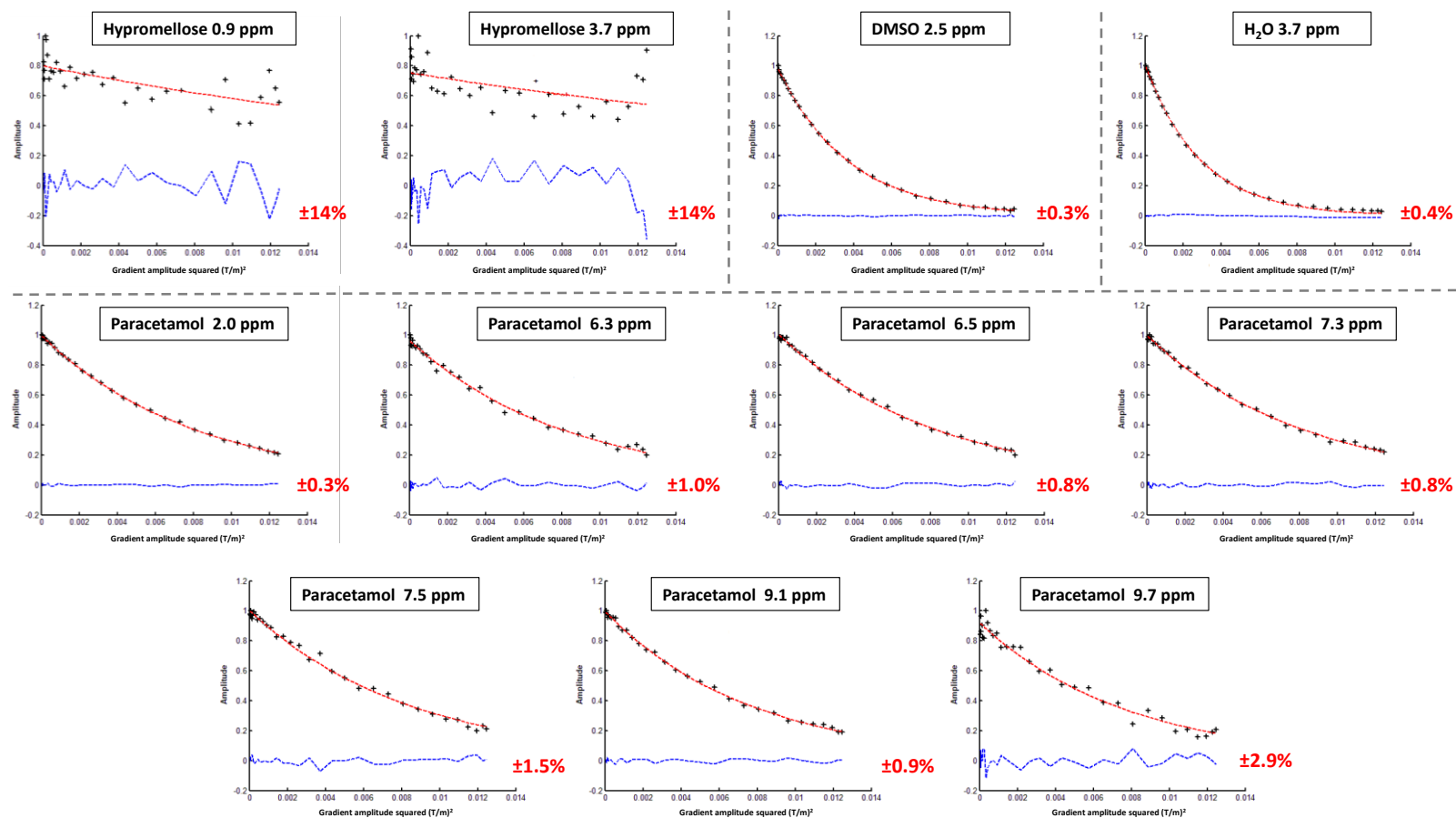


Figure S1: Diffusion decay curves for each component signal of the model sample recorded in DMSO- $d_6$  with a BPP-STE-LED sequence and a linear gradient ramp. Curves were obtained by varying the gradient strength from 4 to 70% in 32 steps.

+ experimental points, --- fitted curve, --- residual error plots calculated as the amplitude difference between experimental and fitted values.

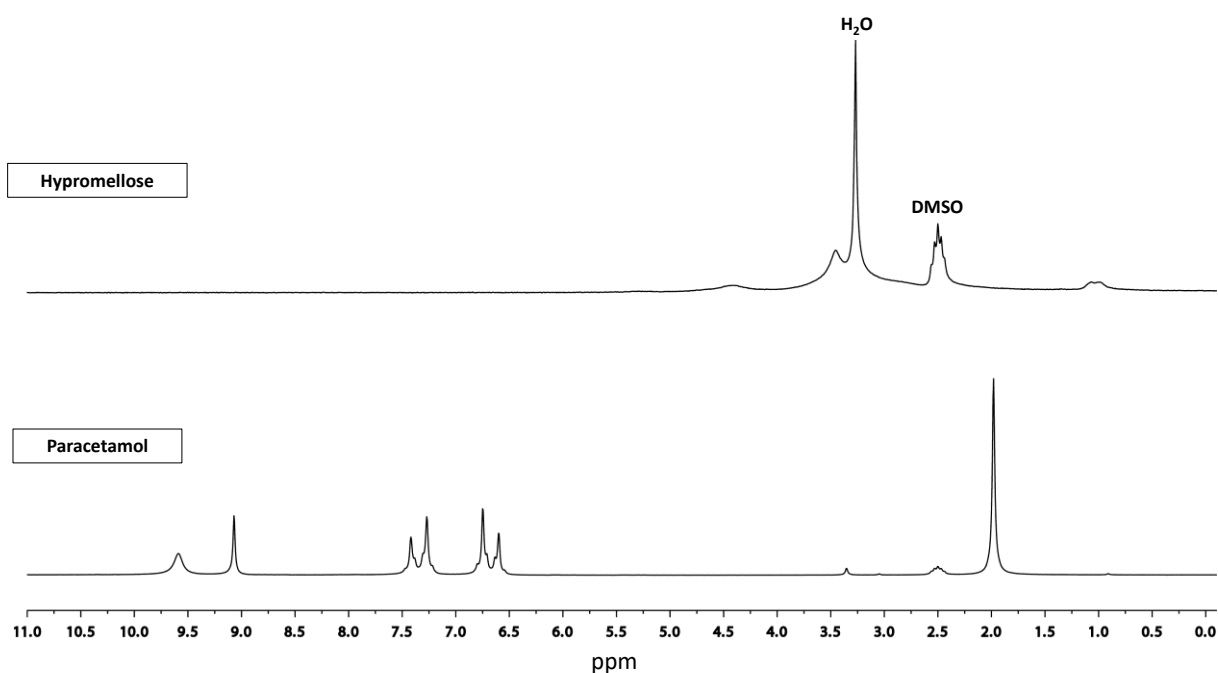


Figure S2: LF  $^1\text{H}$  NMR spectra of standard paracetamol and hypromellose recorded in  $\text{DMSO-d}_6$ .

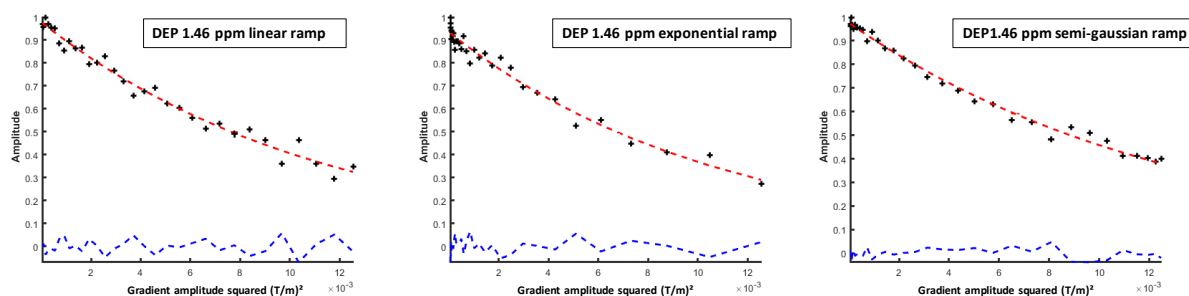


Figure S3: Diffusion decay curves for diethyl phthalate (signal at 1.46 ppm) in the esomeprazole commercial sample recorded in  $\text{DMSO-d}_6$  with a BPP-STE-LED sequence and (A) a linear gradient ramp, (B) an exponential gradient ramp, or (C) a semi-gaussian ramp. Curves were obtained by varying the gradient strength from 4 to 70% in 32 steps. + experimental points, --- fitted curve, --- residual error plots calculated as the amplitude difference between experimental and fitted values.

## Acknowledgements

The authors from Nantes acknowledge financial support from the Région Pays de la Loire (grants RésoNantes and AMER-METAL). The authors also gratefully thank Ernesto Danieli (Magritek) for technical support as well as Stephane Balayssac and Stephane Massou for numerous helpful discussions.

## References

- [1] T. Rundlof, NMR spectroscopy: a superior tool for quality control of pharmaceutical products. *Eur. Pharm. Rev.* issue 5 (2014).
- [2] K. Singh and B. Blümich, NMR spectroscopy with compact instruments, *Trends Analyt. Chem.* 83 (2016) 12-26.
- [3] K. Meyer, S. Kern, N. Zientek, G. Guthausen, M. Maiwald, Process control with compact NMR, *Trends Analyt. Chem.* 83 (2016) 39-52.
- [4] B. Gouilleux, B. Charrier, E. Danieli, J. N. Dumez, S. Akoka, F. X. Felpin, M. Rodriguez-Zubiri, P. Giraudeau, Real-time reaction monitoring by ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer, *Analyst* 140 (2015) 7854-7858.
- [5] F. Dalitz, M. Cudaj, M. Maiwald, G. Guthausen, Process and reaction monitoring by low-field NMR spectroscopy, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 60 (2012) 52-70.
- [6] J. Mitchell, L.F. Gladden, T.C. Chandrasekera, E.J. Fordham, Low-field permanent magnets for industrial process and quality control, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 76 (2014) 1-60.
- [7] T. Parker, E. Limer, A. D. Watson, M. Defernez, D. Williamson, E. K. Kemsley, 60 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for the analysis of edible oils, *Trends Analyt. Chem.* 57 (2014) 147-158.
- [8] W. Jakes, A. Gerdova, M. Defernez, A. D. Watson, C. McCallum, E. Limer, I. J. Colquhoun, D. C. Williamson, E. K. Kemsley, Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, *Food Chem.* 175 (2015) 1-9.
- [9] S. Geng, H. Wang, X. Wang, X. Ma, S. Xiao, J. Wang, M. Tan, A non-invasive NMR and MRI method to analyse rehydration process for dried sea cucumber, *Anal. Methods* 7 (2015) 2413-2419.
- [10] G. Pagès, A. Gerdova, D. Williamson, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino, Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field  $^1\text{H}$  NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11897-11904.
- [11] A. Zivkovic, J. J. Bandolik, A. J. Skerhut, C. Coesfeld, M. Prascevic, L. Zivkovic, H. Stark, Quantitative analysis of multicomponent mixtures of over-the-counter pain killer drugs by low-field NMR spectroscopy, *J. Chem. Educ.* 94 (2016) 121-125.
- [12] E. O. Stejskal and J. E. Tanner, Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient, *J. Chem. Phys.* 42 (1965) 288-292.
- [13] K. F. Morris and C. S. Johnson, Diffusion-ordered two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 3139-3141.
- [14] C. S. Johnson, Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 34 (1999) 203-256.

- [15] M. Nilsson, The DOSY Toolbox: a new tool for processing PFG NMR diffusion data, *J. Magn. Reson.* 200 (2009) 296-302.
- [16] L. Castañar, G.D. Poggetto, A.A. Colbourne, G.A. Morris, M. Nilsson, The GNAT: A new tool for processing NMR data, *Magn. Reson. Chem.* 56 (2018) 546-558.
- [17] I.A. Lingwood, T.C. Chandrasekera, J. Kolz, E.O. Fridjonsson, M.L. Johns, Emulsion droplet sizing using low-field NMR with chemical shift resolution and the block gradient pulse method, *J. Magn. Reson.* 214 (2012) 281-288.
- [18] J.P.M. van Duynhoven, G.J.W. Goudappel, G. van Dalen, P.C. van Bruggen, J.C.G. Blonk, A.P.A.M. Eijkelenboom, Scope of droplet size measurements in food emulsions by pulsed field gradient NMR at low field, *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) S51-S59.
- [19] D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses, *J. Magn. Reson.* 115 (1995) 260-264.
- [20] E. Danieli, J. Perlo, B. Blümich, F. Casanova, Highly stable and finely tuned magnetic fields generated by permanent magnet assemblies, *Phys. Rev. Lett.* 110 (2013) 180801.
- [21] E. Danieli, J. Perlo, B. Blümich, F. Casanova, Small magnets for portable NMR spectrometers, *Angew. Chem. Int. Edit. Eng.* 49 (2010) 4133-4135.
- [22] M. D. Pelta, H. Barjat, G. A. Morris, A. L. Davis, S. J. Hammond, Pulse sequences for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy (HR-DOSY), *Magn. Reson. Chem.* 36 (1998) 706-714.
- [23] S. J. Gibbs and C. S. Johnson, A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents, *J. Magn. Reson.* 93 (1991) 395-402.
- [24] T. Brand, E. J. Cabrita, G. A. Morris, R. Günther, H. J. Hofmann, S. Berger, Residue-specific NH exchange rates studied by NMR diffusion experiments, *J. Magn. Reson.* 187 (2007) 97-104.
- [25] M. Nilsson, G.A. Morris, Speedy component resolution: an improved tool for processing diffusion-ordered spectroscopy data, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3777-3782.
- [26] G. Pagès, A. Bonny, V. Gilard, M. Malet-Martino, Pulsed field gradient NMR with sigmoid shape gradient sampling to produce more detailed diffusion ordered spectroscopy maps of real complex mixtures: examples with medicine analysis, *Anal. Chem.* 88 (2016) 3304-3309.
- [27] M. Nilsson, M. A. Connell, A. L. Davis, G. A. Morris, Biexponential fitting of diffusion-ordered NMR data: practicalities and limitations, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3040-3045.
- [28] W. Windig, J.P. Hornak, B. Antalek, Multivariate image analysis of magnetic resonance images with the direct exponential curve resolution algorithm (DECRA), *J. Magn. Reson.* 132 (1998) 298-306.
- [29] A.A. Colbourne, G.A. Morris, M. Nilsson, Local covariance order diffusion-ordered spectroscopy: a powerful tool for mixture analysis, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 7640-7643.
- [30] M.A. Delsuc, T.E. Malliavin, Maximum entropy processing of DOSY NMR spectra, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2146-2148.

- [31] M. D. Pelta, G. A. Morris, M. J. Stchedroff, S. J. Hammond, A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) S147-S152.
- [32] M. Urbanczyk, W. Kozminski, K. Kazimierzuk, Accelerating diffusion-ordered NMR spectroscopy by joint sparse sampling of diffusion and time dimensions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 6464-6467.
- [33] L. Guduff, I. Kuprov, C. van Heijenoort, J. N. Dumez, Spatially encoded 2D and 3D diffusion-ordered NMR spectroscopy, *Chem. Commun.* 53 (2017) 701-704.
- [34] M. Nilsson and G. A. Morris, Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered  $^1\text{H}$  spectra without multiplet structure, *Chem. Commun.* 9 (2007) 933-935.





# Conclusion générale

L'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit était d'évaluer la capacité de la spectroscopie RMN à bas et haut champ magnétique comme un outil de contrôle qualité de différents produits de santé.

Dans un premier temps sur un complément alimentaire, unique de par sa complexité, nous avons montré que la RMN à haut champ trouve parfaitement sa place dans l'ensemble des techniques analytiques existantes. Si dans l'étude des produits de santé, la RMN tire principalement son intérêt de sa capacité à analyser la globalité de l'échantillon en une seule analyse, il peut être pertinent comme dans le cas décrit que cet outil soit associé à des techniques analytiques complémentaires. En effet, bien que dans cette étude la RMN n'ait pas permis l'entière caractérisation de la formulation en une seule analyse, elle a quand même mis en évidence dans des conditions de routine, la présence de produits de synthèse jusqu'alors jamais détectés et dans un second temps a permis d'en élucider les structures. Il est cependant utile de noter que l'ensemble des contaminants détectés n'auraient pas pu être mis en évidence par des conditions standardisées en chromatographie ou en spectrométrie de masse et que c'est bel et bien la complémentarité analytique qui a permis d'aboutir aux résultats présentés.

Dans une seconde étude en collaboration avec des organismes institutionnels, l'apport de la RMN pour l'étude de compléments alimentaires vendus pour contenir des substances améliorant les performances physiques et sportives, a été étudié. Il s'est avéré que tant pour des aspects qualitatifs que quantitatifs, la RMN est un outil puissant permettant la mise en évidence des cas d'adultérations fréquents et parfois complexes. Bien que cette fois la RMN ait nécessité des développements expérimentaux, une fois au point les méthodes d'analyses proposées permettent d'obtenir une quantité d'informations supérieure aux techniques analytiques de références, qui sont souvent plus ciblées et parfois incompatibles avec la grande diversité des molécules détectées.

La RMN à haut champ, en plus d'apporter une approche non destructrice, fiable, répétable et quantitative avec la solubilité de molécules d'intérêt comme seul prérequis, est donc une technique analytique de choix à considérer. Elle peut être utilisée seule ou bien en tant qu'outil complémentaire aux techniques de références pour l'analyse de formulations complexes. Cependant, la RMN possède deux inconvénients importants : son coût car les spectromètres RMN sont extrêmement onéreux tant à l'achat qu'au niveau de la maintenance et sa faible sensibilité intrinsèque.

Dans l'étude de médicaments conventionnels, la faible sensibilité de la RMN n'est pas une réelle limitation dans la mesure où les actifs annoncés ou détectés sont généralement présents à des dosages de l'ordre de plusieurs milligrammes. Le coût d'une analyse RMN pourrait être considérablement diminué grâce à la mise sur le marché récente de spectromètres à bas champ. Ces nouveaux spectromètres pourraient permettre l'introduction d'analyses RMN dans des laboratoires pour lesquels s'équiper avec un spectromètre haut champ conventionnel est inenvisageable. Cette approche analytique par RMN bas champ a été envisagée pour l'étude de médicaments potentiellement contrefaits. Cette étude a montré, sur deux classes de médicaments qui font l'objet de contrefaçons que cette technique est satisfaisante pour à la fois détecter et quantifier les substances dans des temps d'analyse corrects par rapport aux méthodes de références.

Cependant la perte de résolution due à la diminution de l'étalement en fréquence, peut rendre la caractérisation spectrale très complexe dans certains cas. Pour pallier ce problème, nous avons dans la seconde partie du second chapitre, implémenté pour la première fois des séquences DOSY  $^1\text{H}$  sur un spectromètre bas champ équipé de bobines de gradients. L'apport d'une seconde dimension basée sur la diffusion permet de créer une séparation virtuelle des composés en fonction de leurs coefficients de diffusion, apportant de fait une plus grande lisibilité et permettant de globalement compenser la perte de résolution causée par la diminution en champs. Cette approche, pour l'instant en développement, nécessite encore quelques optimisations notamment au niveau de la perte de sensibilité induite mais peut, d'ores et déjà être considérée comme un outil puissant de déformulation.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont mis en évidence l'adaptabilité de la RMN à diverses problématiques associées aux produits de santé. Cette technique propose l'accès à un nombre d'informations diverses (qualitatives, quantitatives, structurales, dynamiques) après une préparation d'échantillon très simple. Les développements technologiques et méthodologiques associés aux spectromètres de paillasse laissent présager un avenir prometteur pour leurs applications dans de nombreux domaines. La prise de conscience toute récente des constructeurs quant à la nécessité de rendre ces instruments stables dans des environnements totalement inadaptés, ainsi que le développement de systèmes d'automatisation, ouvrent de nouvelles perspectives pour des applications de proximité.

# Annexes : autres publications

Dans les annexes ci-après sont présentées trois publications réalisées pendant mes 3 années de doctorat.

Ces études initiées par le groupe avant le début de ma thèse ne sont pas présentées dans le manuscrit mais sont en lien direct avec mes travaux de thèse. Ci-dessous j'expliquerai très brièvement mon implication dans chacune d'entre elles, ainsi que les conclusions attendantes.



Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss



Rabab Hachem<sup>a</sup>, Gaëtan Assemat<sup>a</sup>, Nathalie Martins<sup>b</sup>, Stéphane Balayssac<sup>a</sup>,  
Véronique Gilard<sup>a</sup>, Robert Martino<sup>a</sup>, Myriam Malet-Martino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

<sup>b</sup> Service commun de spectrométrie de masse, Université de Toulouse, UPS, 31077 Toulouse Cedex 4, France

Dans la première réalisée au cours de mes premiers mois de thèse, j'ai pu appréhender la problématique de l'adultération de compléments alimentaires amaigrissants. Dans ce projet, je me suis particulièrement impliqué dans l'analyse quantitative de divers adultérants et la caractérisation structurale de certains. Dans cette publication nous mettons en évidence un taux d'adultération de 56% (90/160) au travers de 6 actifs détectés.

Drug Saf (2017) 40:809–821  
DOI 10.1007/s40264-017-0544-z



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Role of Medicines of Unknown Identity in Adverse Drug Reaction-Related Hospitalizations in Developing Countries: Evidence from a Cross-Sectional Study in a Teaching Hospital in the Lao People's Democratic Republic

Céline Caillet<sup>1,2,3</sup> · Chanvilay Sichanh<sup>2,3</sup> · Gaëtan Assemat<sup>4</sup> · Myriam Malet-Martino<sup>4</sup> ·  
Agnès Sommet<sup>1,5</sup> · Haleh Bagheri<sup>1,6</sup> · Noudy Sengxeu<sup>7</sup> · Niphonh Mongkhonmath<sup>7</sup> ·  
Mayfong Mayxay<sup>3,8</sup> · Lamphone Syhakhang<sup>9</sup> · Maryse Lapeyre-Mestre<sup>1,5</sup> ·  
Paul N. Newton<sup>2,3</sup> · Anne Roussin<sup>1,5</sup>

Published online: 20 May 2017  
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Dans la seconde, j'ai eu l'occasion de travailler en collaboration avec le centre de pharmacovigilance de Toulouse, menant un projet au Laos. Dans ces travaux l'équipe de pharmacovigilance cherchait un moyen simple, rapide et efficace d'identifier des médicaments vendus au Laos, hors de leur emballage d'origine, afin de trouver un lien entre des pathologies détectées et les substances ingérées. Dans cette étude mes travaux ont consisté à confirmer ou infirmer les hypothèses des praticiens à l'aide de la RMN. Il en résulte un taux de conformité de 72% entre les expériences menées et les hypothèses émises. Dans 26% des cas la RMN a permis de déterminer la composition des formulations étudiées.



### Screening of “spice” herbal mixtures: From high-field to low-field proton NMR



Gaëtan Assemat<sup>a</sup>, Florian Dubocq<sup>a</sup>, Stéphane Balayssac<sup>a</sup>, Catherine Lamoureux<sup>b</sup>, Myriam Malet-Martino<sup>a</sup>, Véronique Gilard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France  
<sup>b</sup> SCL—Laboratoire d'Île-de-France, 1 rue Gabriel Vicaire, 75141 Paris Cedex 03, France

Dans ce dernier article, à la suite d'un travail réalisé en RMN haut champ par un stagiaire, j'ai pu évaluer les capacités d'un spectromètre RMN de paillasse pour la détection de cannabinoïdes de synthèse imprégnés sur des mélanges de plantes complexes. Cette étude qui est la première du genre réalisée à bas champ met en avant la possibilité de détection de telles substances dans des temps d'analyses raisonnables, mais montre également les limites de la technique, qui est plus pertinente pour appréhender les spectres obtenus dans leur globalité : comme des empreintes spectrales, que comme outil complet de caractérisation structurale.



# Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss



Rabab Hachem<sup>a</sup>, Gaëtan Assemat<sup>a</sup>, Nathalie Martins<sup>b</sup>, Stéphane Balayssac<sup>a</sup>,  
Véronique Gilard<sup>a</sup>, Robert Martino<sup>a</sup>, Myriam Malet-Martino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

<sup>b</sup> Service commun de spectrométrie de masse, Université de Toulouse, UPS, 31077 Toulouse Cedex 4, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 November 2015

Received in revised form 16 February 2016

Accepted 17 February 2016

Available online 22 February 2016

### Keywords:

Food supplements

Adulteration

Weight loss products

NMR

Mass spectrometry

## ABSTRACT

One hundred and sixty food supplements (FS) marketed for weight loss and mainly purchased on the Internet were analyzed. All the FS were claimed as 100% natural containing only natural compounds, plant extracts and/or vitamins and the presence of an active pharmaceutical ingredient (API) was never mentioned. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy was used for detecting the presence of adulterants and for their identification and quantification. Mass spectrometry was used as a complementary method for supporting their identification. Among the 164 samples considered because capsules from 5 different blisters of the same FS were analyzed, 56% were tainted with six API. Forty three contained sibutramine as single adulterant (26%), 9 phenolphthalein (6%) and 23 a mixture of these API (14%) that were both withdrawn from the market several years ago because of toxicity concerns. Sildenafil was found in 12 samples, either as a single adulterant (n = 5) or in combination with sibutramine (n = 3), phenolphthalein (n = 3) and both sibutramine and phenolphthalein (n = 1). Fluoxetine was present in 4 formulations, alone (n = 3) or in combination with sibutramine and orlistat (n = 1). At last, lorcaserine was detected in one FS. The content of sibutramine per dosage unit was comprised between 0.1 and 22 mg and that of phenolphthalein between 0.05 and 56 mg. The study also highlights poor manufacturing practices as evidenced for instance by the variability of API in capsules from different blisters of the same box. This paper demonstrates the need for more effective quality control of weight loss FS and the efficiency of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for the detection of tainted FS.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Overweight and obesity are among the greatest public health challenges of the 21st century as they increase the risk of developing cardiovascular diseases, diabetes, musculoskeletal disorders, especially osteoarthritis, sleep apnoea and respiratory problems, and cancers of the breast, endometrium, colon, prostate, kidney and gallbladder [1]. Whatever their causes (poor nutritional habits, lack of physical activity, genetic predetermination or medical reasons), reversing overweight and obesity requires changes of lifestyle. Indeed, diet, exercise and behavioural modification should be included in all overweight and obesity management approaches. Drugs should be used only as adjunctive support to lifestyle change therapy. Currently few drugs are approved for weight loss pur-

poses: orlistat, naltrexone/bupropion and liraglutide in both USA and EU, and lorcaserin and phentermine/topiramate in USA for long-term treatment as well as phentermine and diethylpropion for short term use (3 months) in USA. Moreover, a variety of drugs approved for other uses have been utilized off-label by some prescribers as weight loss medications, such as the anticonvulsant zonisamide, the antidiabetic metformin, the Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) agonist exenatide, the antidepressant bupropion and the thyroid hormones. All are prescription drugs (except orlistat at a low dosage available as an over-the-counter (OTC) drug), usually expensive that should be administered under medical supervision as they can have serious adverse effects [2]. Hence, as the tendency of patients is to self-treat overweight and obesity, they are tempted to buy weight loss food supplements (FS) that are freely available in pharmacies, health food stores, groceries and on the Internet, and aggressively marketed with extreme claims such as quick and easy weight loss, totally safe, all natural or 100% natural [3]. However, most often these claims are exaggerated or even

\* Corresponding author.

E-mail address: [martino@chimie.ups-tlse.fr](mailto:martino@chimie.ups-tlse.fr) (M. Malet-Martino).

dishonest as some unscrupulous manufacturers do not hesitate to fraudulently add synthetic active pharmaceutical ingredients (API) in order to improve the efficiency of their preparations [4].

Due to the growing trend in the intentional adulteration of FS with non-labelled substances, efficient analytical methods are required to detect (or exclude) their presence in weight loss/slimming FS. Chromatographic techniques, essentially high or ultra-high performance liquid chromatography (HPLC or UHPLC) combined with diode array detector (DAD) or most often with mass spectrometry (MS) or high resolution MS (HRMS) or tandem MS (MS/MS) detectors, are predominantly used for the detection and quantification of adulterants such as anorexics, stimulants, anxiolytics, antidepressants, diuretics or laxatives that can be present in slimming FS [5,6]. Other much less often employed chromatographic techniques are gas chromatography (GC) with MS/MS detection and capillary electrophoresis (CE) with UV, electrochemical or MS/MS detection, as well as high-performance-thin layer chromatography (HP-TLC)-UV densitometry that was developed as an easy and rapid method for the screening and quantification of the sole sibutramine in herbal diet foods [7–10]. However, spectroscopic methods are gaining interest as they are rapid and require little or no sample preparation. Attenuated total reflectance-mid-infrared and mid-infrared (MIR) spectroscopies used in conjunction with basic chemometric techniques were able to detect sibutramine in FS directly in their solid or liquid state with a minimum of false positive results, but with no adulterated samples passing the screening test [11]. Very recently, MIR spectroscopy combined with multivariate analyses and test set validation was showed to be a well-suited technique, in contrast to near-infrared and Raman, for identification and semi-quantification of sibutramine and phenolphthalein in weight loss herbal products [12].  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy is recognized to be a method of choice for the analysis of complex mixtures (plants, pharmaceuticals, herbal medicinal products, FS for instance) as it is highly reproducible, robust, inherently quantitative with no need for identical reference materials, and nonselective allowing an unbiased overview of the sample composition [13,14]. Hence, it is commonly used for detection, identification and quantitative determination of adulterants in weight loss FS [14–16]. Diffusion-ordered spectroscopy (DOSY)  $^1\text{H}$  NMR which allows the virtual separation of several components of a mixture based on the difference in their self-diffusion coefficients, was demonstrated to be a convenient tool for providing a fingerprint of weight loss FS [14]. Ion mobility spectrometry and flow injection tandem MS are high-throughput methods that were applied to the rapid screening of major adulterants found in slimming FS [17,18].

In the present study, a lot of 160 weight loss FS mainly bought on the Internet and claiming to contain only natural compounds, plant extracts or vitamins were analyzed using  $^1\text{H}$  NMR as an holistic method to establish their spectral signatures and to identify and quantify the adulterants detected.

## 2. Materials and methods

### Materials

The 160 FS analyzed were bought mainly on internet web sites (141) but also for a few number in specialized shops, like organic groceries and dietetic stores, in France (7) and in pharmacies in Lebanon (12), between June 2012 and June 2015. FS were selected because they were advertised as 100% natural. FS were mainly formulated as conventional (108) or softgel capsules (10), but there were also a few tablets (10), soluble coffee powders (13), other soluble powders (6), tea bags (11), drinkable liquid (1) and patch (1). The last one is not strictly speaking a FS but was included in the present

study because of its claimed 100% natural content. All samples with their names, origin, form, batch number and expiration date are listed in Table 1. Capsules from 5 different blisters contained in the same box of FS **133** were analyzed leading to a total of 164 samples investigated. All chemicals used were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) except sildenafil citrate that was purchased from TLC PharmaChem (Vaughan, Ontario, Canada). Deuterated solvents were obtained from Euriso-top (Gif-sur-Yvette, France).

### 2.2. NMR analysis

#### 2.2.1. Preparation of samples for NMR analysis

For the qualitative analysis, around 100 mg of powdered samples were mixed with 1 mL of deuterated acetonitrile:deuterated water ( $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ ) 80:20 (v/v) under vortex agitation for 15 s and then sonicated for 5 min. The suspension was then centrifuged (5 min, 3000 rpm) and the supernatant (700  $\mu\text{L}$ ) analyzed. Sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimethylsilyl) propanoate (TSP) as internal chemical shift reference was added before NMR analysis.

For the quantitative analysis, between 5 and 100 mg of powdered sample were accurately weighed and dissolved in 1 mL of deuterated methanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) under vortex agitation for 15 s, then sonicated for 10 min and mixed under magnetic stirring for 20 min. The suspension was then centrifuged (5 min, 3000 rpm). Thirty  $\mu\text{L}$  of a 5 mM solution of TSP as quantitation reference were added to 800  $\mu\text{L}$  of supernatant and the resulting solution analyzed. The final concentration of TSP was 0.181 mM. The quantitative experiments were done in triplicate, i.e. analysis of the same product prepared three times. Quantification of caffeine was performed only in formulations **70**, **79** and **117**, using the same procedure except that the solvent  $\text{CD}_3\text{OD}$  was replaced by  $\text{D}_2\text{O}$ . Sample preparation for softgels (formulations **9**, **11**, **15**, **16**, **22**, **75**, **85** and **99**), liquid (formulation **128**) and patch (formulation **100**) was respectively as follows: (i) for qualitative analysis,  $\approx 100$  mg of the viscous content were dissolved in 1 mL of  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  80:20. For quantitative analysis, the whole content, exactly weighed, was dissolved in 15 mL of methanol under vortex agitation for 15 s, then sonicated for 10 min and mixed under magnetic stirring for 20 min; an aliquot of 1 mL was evaporated to dryness and the residue dissolved in 1 mL of  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; the quantification was then performed as described above for the powdered samples; (ii) for qualitative analysis, 0.7 mL of  $\text{D}_2\text{O}$  were added to 0.3 mL of the liquid formulation; no quantitative analysis was performed because of the absence of adulterant; (iii) one patch (167 mg) was cut into small pieces which, after transfer in a glass tube, were extracted with 2 mL of  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  for profiling; no quantitative analysis was performed because of the absence of adulterant.

#### 2.2.2. $^1\text{H}$ NMR recording conditions

The  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed on a Bruker Avance 500 spectrometer (Bruker Biospin AG, Fallanden, Switzerland) equipped with a 5 mm cryoprobe at 298 K. Typical acquisition parameters were as follows: number of scans 16, pulse width 10.0  $\mu\text{s}$  (flip angle  $90^\circ$ ), acquisition time 2.04 s, spectral width 8000 Hz, 32 K data points, and relaxation delay 1 s, corresponding to a recording time of 0.8 min. The signal of TSP set at 0 ppm was used as an internal reference for chemical shift ( $\delta$ ) measurement. For the quantitative 1D  $^1\text{H}$  NMR experiments, the spectra were recorded in fully relaxed conditions with 64 K data points, a pulse width shortened to 3.3  $\mu\text{s}$  (flip angle  $\approx 30^\circ$ ) and a relaxation delay lengthened to 6 s. The number of scans was augmented to 64 or to 256 for some weakly concentrated samples, for respective recording times of 11 min and 44 min. The concentrations were measured by comparing the signal areas of convenient protons (see below) of the compounds to be quantified with those of TSP, the area of each NMR peak being directly proportional to the number

**Table 1**  
Formulations analyzed in this study and their contents in adulterants.

Number	Formulation name (origin) <sup>a</sup>	Batch number <sup>b</sup> (expiration date) <sup>b</sup>	Form	Adulterant (content in mg per formulation unit)		
				Sibu <sup>c</sup>	PhPh <sup>c</sup>	Other <sup>c</sup>
1	1 day diet (I)	201 30320 (03/19/2016)	Dark red capsule		38	
2	2x powerful slimming (I)	NI (12/2016)	Dark red capsule	0.1	1	Sild 6
3	5K2S (I)	4268 (10/13)	White powder in a transparent capsule			
4	7 + 1 (I)	BAF206x (07/2015)	Beige capsule			
5	7 days herbal Slim (I)	20130311 (10/03/2015)	White capsule	3	24	
6	10 days slim Waist (I)	20120102 (01/01/2014)	Green capsule	0.3	2	
7	AB Slim (PhL)	100801 (06/2017)	Green capsule		18	Sild 2
8	AB Slim slimming tea (PhL)	NI (NI)	Tea powder in a sachet			
9	ABC Acai Berry (I)	27LUG111 (27/07/2015)	Brown softgel capsule with viscous content	3		
10	Acai boost (PhL)	14025 (06/2017)	Blue capsule			
11	Adi Pill (SSFr)	P120047 (12/2014)	Pink softgel capsule with viscous content			
12	AF6 (I)	abc201307 (28/03/2014)	Beige tablet			
13	A-Slim (I)	20120220 (19/02/2014)	Dark and light green capsule	11		
14	a AyurSlim (I)	11203944 (10/15)	Brown powder in a transparent capsule			
	b AyurSlim (I)	22200318G (09/2015)	Green capsule			
15	Balance of time slimming capsule (I)	20140820 (19/08/2016)	Green softgel capsule with viscous content	8		
16	Beautiful slim body (I)	20140526 (25/05/2017)	Green softgel capsule with viscous content	5		
17	Beauty Slimming Tea (I)	NI (01/01/2013)	Tea powder in a sachet			
18	Best share green coffee (Brazilian slimming coffee) (I)	23032013 (22/03/2015)	Coffee powder in a sachet	4		
19	Best Shown coffee (I)	NI (01/12/2014)	Coffee powder in a sachet	12		
20	Bio firm (SSFr)	092122 (07/2015)	Brown tablet			
21	Body beauty (I)	NI (01/2015)	Coffee powder in a sachet		6	
22	a Botanical Slimming soft gel (I)	MSV 201111 (17/11/2013)	Green softgel capsule with viscous content	2 <sup>d</sup>	0.5 <sup>d</sup>	
	b Botanical Slimming soft gel (I)	04102011 (04/09/2013)	Green softgel capsule with viscous content	5 <sup>d</sup>	0.3 <sup>d</sup>	
	c Botanical Slimming soft gel (I)	NI (28/09/2016)	Green softgel capsule with viscous content	6 <sup>d</sup>		
23	Brazilian slimming coffee (I)	NI (30/01/2015)	Coffee powder in a sachet	7	20	
24	Brulgraiice minceur (SSFr)	BOG15 (NI)	Tea powder in a sachet			
25	Bye Kg (I)	06SET121 (27/05/2015)	White capsule			
26	CACTI-NEA (SSFr)	D066S (03/2014)	Light green tablet			
27	CiblAction A37 (I)	LW117 (04/2015)	Brown powder in a transparent capsule			
28	Coffee plus (I)	290813 (NI)	Coffee powder in a sachet			
29	Colodetox (I)	P131369A (02/2017)	Green powder in a transparent capsule			
30	Dr Mao slimming capsules (I)	NI (13/10/2015)	Red capsule	13		
31	Dr Ming tea (PhL)	NI (06/2015)	Tea powder in a sachet			
32	DR. Ming's chinese capsule (I)	200612 (06/2015)	Beige powder in a transparent capsule	2	45	
33	Dream Body slimming capsule (I)	20130628 (27/06/2015)	Purple capsule	7		
34	Fat Napalm Bomb (I)	2052013 (05/2015)	Green and white capsule	11		
35	Fatloss Jimpness Beauty (I)	12109316 (10/2014)	Dark and light green capsule			Sild 0.2
36	Fruit & plant slimming capsule (I)	14032312 (25/09/2016)	Dark and light green capsule	9		
37	a Fruta bio (I)	20130426 (25/04/2015)	Green and white capsule	12		
	b Fruta bio (I)	20130615 (14/06/2015)	Green and white capsule			
38	a Fruta Planta (grape) (I)	110510 (29/05/2013)	Dark and light green capsule	12	32	
	b Fruta planta (grape) (I)	130707 (07/07/2015)	Green and white capsule	14	18	
	c Fruta planta (grape) (I)	140108 (01/08/2016)	Dark and light green capsule	0.1		Sild 0.4
39	Green coffee 1000 (I)	SS 2013 10 (21/10/2015)	Coffee powder in a sachet		2	



Table 1 (Continued)

Number	Formulation name (origin) <sup>a</sup>	Batch number <sup>b</sup> (expiration date) <sup>b</sup>	Form	Adulterant (content in mg per formulation unit)		
				Sibu <sup>c</sup>	PhPh <sup>c</sup>	Other <sup>c</sup>
40	Health Slimming Coffee (I)	NI (12/2013)	Coffee powder in a sachet	7		
41	Herba Laxa (PhL)	NI (06/2016)	Tea powder in a sachet			
42	Herbal Flos Ionicerae (I)	NI (03/11/2016)	Green capsule	14		
43	Herbal Tea Anti food slim tea (SSFr)	CFM 001-2 (04/09/2014)	Tea powder in a sachet			
44	Instant slim (I)	130618 (17/06/2016)	White and green capsule			
45	Irem (I)	NI (NI)	Brown powder in a transparent capsule			Fluox 29
46 a	Japan Hokkaido slimming pills (I)	130115 (14/01/2015)	Pink capsule			Sild 8
b	Japan Hokkaido slimming pills (I)	130220 (12/02/2015)	Pink capsule			Sild 8
c	Japan hokkaido slimming pills (I)	140503/(02/05/2016)	Pink capsule	22		Sild traces
47	Jiang Zhi Jian Fei Wan (I)	8000628 (06/2018)	Red and pink capsule			
48	Kalory emergency 1000 (PhL)	P058D (02/2016)	Whitish tablet			
49	KILO KO (I)	11GEF018911 (10/2014)	Grey powder in a transparent capsule			
50	Kilo-Minus (I)	290002 (01/2017)	Beige powder in a transparent capsule			
51 a	La Jiao Shou Shen (I)	NI (10/2015)	Grey and orange capsule			
b	La Jiao Shou Shen (I)	20140226 (26/02/2016)	Grey and orange capsule			
52	Leisure 18 slimming coffee (I)	NI (05/04/2015)	Coffee powder in a sachet	6	21	
53	Leisure 18 slimming orange juice (I)	130417 (16/04/2016)	Yellow powder in a sachet	10		
54 a	LiDa Dai dai hua (I)	111029 (28/10/13)	Dark and light green capsule	4		
b	Li Da Dai dai hua (I)	NI (NI)	Dark and light green capsule	5	5	
c	Li Da Dai dai hua (I)	NI (NI)	Dark and light green capsule			Fluox 3
d	Li Da Dai dai hua (I)	20141025 (24/10/2016)	Dark and light green capsule	12	3	
e	Li Da Dai dai hua (I)	NI (NI)	Dark and light green capsule		9	
55	Liji shou (I)	20111030 (10/2013)	Beige and orange capsule	11		
56	Lingzhi cleansed slim tea (I)	NI (12/2016)	Tea powder in a sachet	12		
57	Lipo 8 burn Slim (I)	NI (NI)	Silver green capsule	13		
58	Lipo 8 DUG CORE (I)	176521KC (03/06/2015)	White capsule	0.8		Fluox 0.8 Orlistat 13
59	Lipo 9 for lady and gentleman (I)	NI (NI)	Silver capsule	12		
60	Lipo Bomb (I)	LB086x (12/09/2013)	Green powder in a transparent capsule			
61	Lose quickly (I)	130702 (01/07/2015)	Green and white capsule			Lorcaserin 7
62	Lose weight Coffee (I)	20130326 (25/03/2015)	Coffee powder in a sachet	8		
63	Magic Slim (I)	NI (12/2012)	Purple capsule	11		
64	Magic slim Spécial Minceur (I)	P130165 (02/2016)	Small white tablet			
65 a	Majestic Slimming capsule (Australia) (PhL)	95026954 (01/08/2016)	Blue and white capsule	traces <sup>e</sup>	22	
b	Majestic slimming capsule (New Zealand) (I)	NI (11/01/2017)	Dark and light green capsule			Sild 3
66	Max slimming coffee (I)	130108 (21/04/2015)	Coffee powder in a sachet	3		
67	Menova (I)	0628200 (27/06/2016)	Light blue capsule	12		
68	Mermaid thin products (I)	NI (NI)	Beige and purple capsule			
69 a	Miaozi (I)	20100901 (09/2012)	Dark green capsule	0.1	0.9	
b	Miaozi (I)	20110302 (03/2013)	Dark green capsule	0.9		
c	Miaozi (I)	20110202 (02/2013)	Dark green capsule	6		
70	Mini thin (I)	HD14 (NI)	Red capsule			
71	Natural Max Slimming capsule (I)	04122013 (04/11/2016)	Dark and light green capsule			
72	Nature Slim tea (I)	NI (NI)	Tea powder in a sachet			
73	New X-treem Active (PhL)	5101 (04/2016)	Pink transparent capsule			

Table 1 (Continued)

Number	Formulation name (origin) <sup>a</sup>	Batch number <sup>b</sup> (expiration date) <sup>b</sup>	Form	Adulterant (content in mg per formulation unit)		
				Sibu <sup>c</sup>	PhPh <sup>c</sup>	Other <sup>c</sup>
74	Nuvoryn (I)	205002 (05/2014)	White capsule			
75	P57Hoodia (I)	20110415 (14/04/2013)	Green softgel capsule with viscous content	18		
76	PAI YOU GUO (I)	NI (NI)	Green and white capsule			
77	Perfect line (I)	68280 (07/2016)	Beige powder in a transparent capsule			
78	Perfect slim (I)	NI (10/2017)	Beige powder in a transparent capsule			Fluox 9
79	Phen 375 (I)	120332901 (03/2014)	Greenish tablet			
80	Pineapple plus (I)	NI (NI)	Green and white capsule	4	41	
81	Pineapple tea Dr Ming (I)	GF 083887462 (01/2017)	Tea powder in a sachet			
82	Proactol (I)	NI (NI)	Beige tablet			
83	PSB Minceur Pro (I)	P131681 (01/2017)	White capsule			
84	Pure fat 3 days (I)	20130420 (19/04/2015)	White and purple capsule			
85	Queen (I)	NI (11/07/2016)	Turquoise softgel capsule with viscous content	4 <sup>d</sup>	11 <sup>d</sup>	
86	Rapidly slimming (I)	06122012 (05/12/2014)	Dark and light green capsule	2	25	
87	Relacore extra (I)	37915701 (07-2015)	Green tablet			
88	Revex-16 (I)	0421800313 (03/2015)	Red capsule			
89	Royal Slim (PhL)	103315 (08/2016)	Brown powder in a transparent capsule		38	
90	S shape slim (I)	NI (NI)	Dark and light green capsule	8		Sild 0.9
91	a Seven super color Slim & Health (box with a blue bottom) (I)	NI (NI)	Green and yellow capsule	4	19	
	b Seven super color Slim & Health (box with a gold bottom) (I)	NI (NI)	Green and yellow capsule	9	33	
	c Seven super color Slim & Health (triangular box) (I)	13030201 (03/2015)	Beige powder in a transparent capsule	8	36	
92	Shape (I)	NI (NI)	Green and white capsule	6	32	
93	Shoufsy (I)	NI (03/2015)	Green and yellow capsule	9		
94	a Sleep and slim (I)	05APR133 (28/10/2015)	White capsule			
	b Sleep and slim (I)	13MAG131 (28/10/2015)	White capsule			
95	Slender Capsule (I)	20140902 (01/09/2016)	Dark and light green capsule	5		
96	Slim Caps 3000 (I)	4505 (02/2014)	Beige powder in a transparent capsule			
97	Slim effect 24 h (I)	07MAR119 (28/01/2014)	Beige powder in a sachet			
98	Slim fast (I)	185 (07/2013)	Beige powder in a transparent capsule			
99	Slim Forte Double power (I)	20130718 (17/07/2015)	Green softgel capsule with viscous content	10		
100	Slim patch Paris (I)	3262 (01/06/2015)	Beige patch			
101	Slim smart royal ananas + papaya (PhL)	13040065 (07/2015)	White capsule			
102	Slim turbo vital (I)	NI (NI)	Powder in a sachet			
103	Slimming essence (I)	NI (10/2014)	Purple capsule			
104	Slimula (I)	10359 (06/2015)	Orange capsule			
105	Slim-Vie (I)	NI (08/09/2016)	Dark and light green capsule	15		
106	SLIMXTREME (I)	NI (10/10/2016)	Golden capsule	16		
107	a St nirvana herbal slimming (I)	0828200 (27/08/2016)	Blue capsule	16		
	b St nirvana herbal slimming (I)	NI (24/09/2015)	Blue capsule	1	19	
108	Stickafé (I)	NI (NI)	Coffee powder in a sachet			
109	Sulami (I)	NI (09/2016)	Red and orange capsule	0.4		
110	Super extreme accelerator (I)	NI (10/10/2016)	White capsule	14		
111	Super Fat burning (I)	140303 (02/03/2016)	Blue and white capsule	1	1	

Table 1 (Continued)

Number	Formulation name (origin) <sup>a</sup>	Batch number <sup>b</sup> (expiration date) <sup>b</sup>	Form	Adulterant (content in mg per formulation unit)		
				Sibu <sup>c</sup>	PhPh <sup>c</sup>	Other <sup>c</sup>
112 a	Super slim (green blister) (I)	120612 (11/06/2014)	Green and white capsule		31	
b	Super Slim (silver blister) (I)	1706582603 (01/2015)	Green and white capsule	12	51	
113	Supernatural 26 wt loss coffee (I)	20130502 (01/05/2015)	Coffee powder in a sachet			
114	TE XiAO SHOU FU JIAN FEI (I)	D050JZ (04/2015)	Brown powder in a transparent capsule			
115	TGV 36 (I)	11MAG121 (28/12/2014)	White capsule			
116	Thé minceur (SSFr)	2-co36-06.12 (06/2016)	Tea powder in a sachet			
117	Thermospeed (I)	02180514 (28/05/2017)	White capsule			
118	Tomato plant Double Power (I)	130303 (02/03/2017)	Beige and orange capsule			Sild 0.2
119	Trim-Fast (I)	20140915 (14/09/2016)	Orange capsule containing a gel	8		
120	Turbo light plan (I)	290004 (08/2017)	White powder in a transparent capsule			
121	V tea (I)	NI (02/05/2014)	White powder in a sachet	3		
122	V12 fruit slimming (I)	NI (NI)	Brown powder in a sachet	6	8	
123	V26Coffee Slimming granules (I)	NI (NI)	Brown powder in a sachet	14		
124 a	Via ananas (PhL)	1113060 (01/2017)	White capsule			
b	Via ananas (I)	NI (NI)	White capsule			
125	Via Slim (I)	HWB140824 (23/08/2017)	White capsule	8		
126	Vitaccino (I)	20110930 (09/2013)	Coffee powder in a sachet	16		
127	WAIST TEA (SSFr)	MVP101-2 (03/11/2014)	Tea powder in a sachet			
128	Wakame Plus (I)	X256 (09/2016)	Liquid			
129 a	Xiushentang (Japan weight loss blue) (I)	unknown (28/03/2014)	Blue and white capsule			56
b	Xiushentang (Japan weight loss blue) (I)	FE044013 (07/06/2013)	Blue tablet			
130	Xiyoujiqingzhi capsule (I)	NI (NI)	Red and white capsule			6
131	XS pro (I)	1353-02509 (09/2015)	Cocoa powder in a sachet			
132	XS Slim (I)	9151 (06/2015)	Light pink capsule			
133 <sup>f</sup>	Blister 1 Blister 2 Blister 3 Blister 4 Blister 5	20140108 (07/01/2017)	Red capsule	0.8 0.8 1		7 Sild 1
134	Zacti + (I)	290001 (05/2016)	Beige powder in a transparent capsule			
135	Zero-cal caps (I)	13GELC01 246 (09/2015)	White and blue capsule			
136	Zotream Plus (I)	20140708 (07/07/2017)	Red capsule		0.05	Sild 0.2
137	Zuccarin (PhL)	3628 (08/2016)	Greenish tablet			

<sup>a</sup> Food supplements bought on Internet web sites (I), specialized shops in France (SSFr), pharmacies in Lebanon (PhL).

<sup>b</sup> NI: not indicated.

<sup>c</sup> Sibu: sibutramine; PhPh: phenolphthalein; Sild: sildenafil; Fluox: fluoxetine.

<sup>d</sup> The values indicated are rough estimates because the reproducibility of the quantification of the softgel content is very bad.

<sup>e</sup> The very low level of sibutramine precluded its detection with NMR. This compound was only detected by mass spectrometry.

<sup>f</sup> This formulation was sold as a box containing five identical blisters. The capsules from each blister were analyzed separately.

of corresponding nuclei. The areas were measured using the Bruker TopSpin software.

### 2.2.3. <sup>1</sup>H NMR signals used for quantification

The quantification was performed on at least one characteristic proton signal from each compound. The signals selected are reported in bold in Tables 2 and 3. The amount of compound (g) per dosage unit is calculated from the following equation

$$Q = \frac{A_i}{A_{TSP}} \times \frac{Nb_{TSP}}{Nb_i} \times C_{TSP} \times \frac{V_2}{V_1} \times V_t \times M \times \frac{m_t}{m}$$

with  $A_i$  and  $A_{TSP}$  being the areas of the characteristic NMR signal(s) of the analyte to be quantified ( $i$ ) and of the TSP signal respectively,  $Nb_i$  and  $Nb_{TSP}$  the number of protons contributing to the signal of the analyte and of TSP (9 protons),  $C_{TSP}$  the concentration of TSP in

the solution analyzed,  $V_1$  the volume of supernatant analyzed,  $V_2$  the volume of solution analyzed (supernatant + TSP),  $V_t$  the volume used to dissolve the sample,  $M$  the molecular weight of the analyte,  $m_t$  and  $m$  the weights of the dosage unit and of the sample analyzed.

Relative standard deviations (rsd) of the three NMR assays of a given formulation prepared three times ranged between 0.1 and 12% with an overall average value of 5%. Some softgel formulations with viscous content (**22** and **85**) were more difficult to quantify and the rsd was thus high (up to 50%). The values reported in Table 1 for these formulations should therefore be considered as rough estimates.

In our experimental conditions, the limit of quantification was 0.05 mg of an adulterant with a molecular weight of  $\approx 300 \text{ g mol}^{-1}$  for a capsule content of  $\approx 400 \text{ mg}$ .

**Table 2**  
<sup>1</sup>H NMR and MS data of the adulterants detected in the food supplements analyzed in this study.

Compound	<sup>1</sup> H NMR <sup>a</sup> δ (ppm), multiplicity <sup>b</sup> (J, Hz), attribution (see Fig. 1 for chemical structures and numbering)	Mass spectrometry	Positive ionisation mode
		Measured accurate m/z value [M+H] <sup>+</sup> formula (mass error) <sup>c</sup>	m/z of major characteristic fragment ions observed <sup>d</sup>
Sibutramine	<b>7.44</b> <sup>e</sup> (m, 4H, H-6, H-7, H-9, H-10), 3.63 (dd, J=7.2 Hz, J=5.3 Hz, 1H, H-11), 2.81 <sup>f</sup> (broad s, 3H, H-13 or H-12), 2.60 (m, 1H, H-2 or H-4syn aromatic ring), 2.49 (m, 1H, H-2 or H-4 anti aromatic ring), 2.41 (m, 1H, H-4 or H-2 anti aromatic ring), 2.37 (m, 1H, H-4 or H-2syn aromatic ring), 2.19 <sup>f</sup> (broad s, 3H, H-12 or H-13), 1.96 and 1.78 (two m, 2H, H-3), 1.78 (m, 1H, H-15), 1.53 and 1.39 (two m, 2H, H-14), <b>1.04</b> <sup>e</sup> (d, J=6.5 Hz, 3H, H-17 or H-16), <b>1.00</b> <sup>e</sup> (d, J=6.5 Hz, 3H, H-16 or H-17)	280.1837 [C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> ClN] <sup>+</sup> (+1.77)	153.0454 139.0294 125.0132
Phenolphthalein	<b>7.91</b> (m, 1H, H-7), <b>7.78</b> (td, J=7.6 Hz, J=1.1 Hz, 1H, H-5), 7.63 (m, 2H, H-4 and H-6), 7.14 and 6.80 (AA'XX' system, J=8.8 Hz, 8H, H-10, H-15, H-17, H-21 and H-11, H-14, H-18, H-20)	319.0974 [C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> (+1.15)	225.0552 197.0600 169.0640 141.0685 105.0306
Orlistat	<b>8.09</b> (s, 1H, H-32), 4.97 (m, 1H, H-6), 4.45 (dd, J=8.9 Hz, J=6.0 Hz, 1H, H-26), 4.40 (m, 1H, H-4), 3.38 (m, 1H, H-3), 2.08–2.02 (m, 2H, H-5), 1.80–1.55 (m, 6H, H-7, H-18, H-27), 1.45–1.21 (m, 26H, H-19 to H-22 and H-8 to H-16), 0.97–0.87 (m, 12H, H-17, H-23, H-29, H-30)	496.4001 [C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>5</sub> ] <sup>+</sup> (+0.20)	337.3094 319.2992 301.2889 160.0961
Lorcaserin	7.26 (d, J=2.1 Hz, 1H, H-9), <b>7.21</b> (dd, J=8.0 Hz, J=2.1 Hz, 1H, H-7), <b>7.17</b> (d, J=8.0 Hz, 1H, H-6), 3.59 (app quint, J=7.5 Hz, 1H, H-1), 3.39 (m, 1H, H-4), 3.37 (m, 1H, H-5), 3.32 (app d, J=13.8 Hz, 1H, H-2), 3.07 (app dd, J=16.4 Hz, J=7.2 Hz, 1H, H-5'), 2.97 (app t, J=11.7 Hz, 1H, H-4'), 2.90 (app dd, J=13.7 Hz, J=8.9 Hz, 1H, H-2'), <b>1.42</b> (d, J=7.3 Hz, 3H, H-12)	196.0890 [C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> ClN] <sup>+</sup> (-1.54)	179.0621 167.0618 151.0302 144.0923 139.0298 129.0682 103.0514
Fluoxetine	<b>7.54</b> and <b>7.05</b> (AA'XX' system, J=8.7 Hz, 4H, H-3, H-7 and H-4, H-6), 7.44–7.37 (m, 4H, H-13, H-14, H-16, H-17), 7.33 (m, 1H, H-15), 5.51 (dd, J=8.6 Hz, J=3.9 Hz, 1H, H-8), 3.22 and 3.14 (two m, 2H, H-10), 2.66 (s, 3H, H-11), 2.34 and 2.23 (two m, 2H, H-9)	310.1423 [C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> NO] <sup>+</sup> (+1.37)	230.8906 148.1121
Sildenafil	<b>8.20</b> (d, J=2.2 Hz, 1H, H-15), <b>7.91</b> (dd, J=8.9 Hz, J=2.2 Hz, 1H, H-17), <b>7.35</b> (d, J=8.9 Hz, 1H, H-18), 4.30 (q, J=7.0 Hz, 2H, H-20), 4.19 (s, 3H, H-10), 3.12 and 3.27 (two broad signals, 8H, H-24, H-28 and H-25, H-27), 2.87 (t, J=7.4 Hz, 2H, H-11), 2.67 <sup>g</sup> (s, 3H, H-29), 1.78 (sext, J=7.4 Hz, 2H, H-12), 1.44 (t, J=7.0 Hz, 3H, H-21), 0.96 (t, J=7.4 Hz, 3H, H-13)	475.2125 [C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S] <sup>+</sup> (-0.52)	311.1498 299.1138 283.1190 100.0947 99.0870 70.0577 58.0563

<sup>a</sup> δ were measured in CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20). Bold signals were used for quantitative analysis.

<sup>b</sup> s: singlet; d: doublet; dd: doublet of doublet; t: triplet; td: triplet of doublet; q: quadruplet; quint: quintuplet; sext: sextuplet; m: multiplet; app: apparent.

<sup>c</sup> Mass error in ppm between experimental and calculated values.

<sup>d</sup> These data are in agreement with those reported in the literature.

<sup>e</sup> Depending on the formulation considered, the quantification of sibutramine was performed on the m at 7.44 ppm and/or the two d at 1.04 and 1.00 ppm.

<sup>f</sup> Signal not always observed due to broadening.

<sup>g</sup> The δ of this signal is variable between 2.2 and 2.9 ppm.

### 2.3. MS analysis

The samples were dissolved in CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) and analyzed after direct infusion in a Waters XEVO G2 QTOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Positive and negative ionisation modes were used. For both modes, the instrument parameters were as follows: for MS analysis, cone voltage 30 V and 50 V, source temperature 110 °C, desolvation temperature 300 °C, cone gas flow rate 50 Lh<sup>-1</sup>, desolvation gas flow rate 1100 Lh<sup>-1</sup>, scan range m/z 100–2000; for MS/MS analysis, three different collision energies were used 15, 25 and 35 V (the cone voltage was maintained at 30 V), scan range m/z 50–2000. All analyses were performed using the lockspray, which ensured accuracy and reproducibility. Leucine enkephalin (1 ng μL<sup>-1</sup>) was used as the lockmass generating a reference ion in positive mode at m/z 556.2771 and introduced by a lockspray at 10 μL.min<sup>-1</sup>.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Detection and characterization of adulterants

<sup>1</sup>H NMR was used as a fast screening method for detecting potential adulteration of FS. Indeed, the <sup>1</sup>H NMR profiles were obtained after a rapid and simple sample preparation as described

in the experimental part and a spectrum acquisition time of less than 1 min. Moreover, the solvent used (CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O; 80:20) dissolved most organic compounds and thus permitted the detection of adulterants. Their presence was clearly revealed, provided that they did not occur at very low levels, and their identification was performed by comparing the <sup>1</sup>H NMR spectrum of the FS considered with those of chemical standards recorded under the same conditions. <sup>1</sup>H NMR characteristics of the adulterants detected in this study are gathered in Table 2 and their chemical structures in Fig. 1. All the FS analyzed in this study were claimed as 100% natural and the presence of API was never mentioned.

<sup>1</sup>H NMR spectra of some characteristic FS are illustrated in Fig. 2. Formulations **37b** and **87** were not adulterated. Indeed, the spectrum of formulation **37b** showed only weak signals of the natural matrix as for example, in the spectrum regions represented, the characteristic signals of fatty acids (FA) from plants at δ (ppm) 0.88, 1.28, 1.55 and 2.26 ppm. The spectrum of formulation **87**, sold as a FS containing different plant extracts supplemented with several vitamins, displayed some characteristic signals of vitamins (C at 4.78 ppm; B3 (niacinamide form) at 8.97, 8.70, 8.24 and 7.54 ppm; B5 at 0.86<sub>1</sub>, 0.86<sub>5</sub> and 2.53 ppm; B1 at 5.36, 2.51 and 2.48 ppm; B2 at 2.55 and 2.46 ppm; B6 at 4.99 and 2.54 ppm) and FA (most probably stearic acid commonly used as a lubricant). In contrast, FS **125**, **130** and **38a** were adulterated respectively with the anorec-

**Table 3**<sup>1</sup>H NMR and MS data of caffeine, 1,3-dimethylamylamine (DMAA), *p*-synephrine and vitamins detected in the food supplements analyzed in this study.

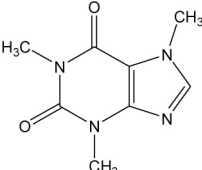
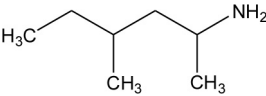
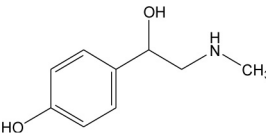
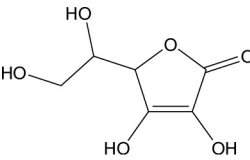
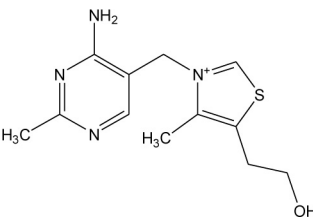
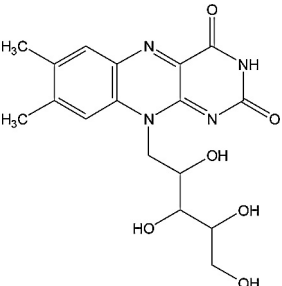
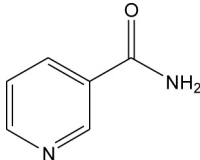
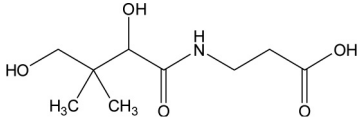
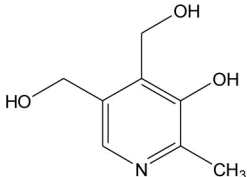
Compound	Structure	<sup>1</sup> H NMR <sup>a</sup>	Mass spectrometry Positive or negative ionisation mode	
		δ (ppm), multiplicity <sup>b</sup> (J, Hz), attribution	Measured accurate <i>m/z</i> value [M+H] <sup>+</sup> or [M-H] <sup>-</sup> formula (mass error) <sup>c</sup>	<i>m/z</i> of major characteristic fragment ions observed <sup>d</sup>
Caffeine		<b>7.79</b> (s, 1H, CH <sub>arO</sub> ), <b>3.92</b> (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), <b>3.47</b> (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), <b>3.29</b> (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> )	195.0881 [C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (-0.52)	138.0649 123.0408 110.0688 83.0561
DMAA <sup>e</sup>		3.35 (m, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ), 1.64 – 1.08 (m, 5H, 1CH and 2CH <sub>2</sub> ), 1.24 <sub>5</sub> and 1.23 (2 d, J = 6.6 Hz, 3H, CH <sub>2</sub> -C H-NH <sub>2</sub> ), <b>0.90</b> and 0.87 (2 d, J = 6.6 Hz, 3H, CH <sub>2</sub> -CH), 0.88 <sub>5</sub> and 0.88 (2t, J = 7.3 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> )	116.1439 [C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N] <sup>+</sup> (-0.21)	57.0708
<i>p</i> -synephrine		<b>7.21</b> (app d, J = 8.5 Hz, 2H, CH <sub>arO</sub> ), <b>6.81</b> (app d, J = 8.5 Hz, 2H, CH <sub>arO</sub> ), <b>4.73</b> (dd, X part of an ABX system, J = 9.0 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, C H-OH), <b>2.79</b> (AB part of an ABX system, J <sub>AB</sub> = 12.4 Hz, J = 9.0 Hz, J = 4.2 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), <b>2.44</b> (s, 3H, CH <sub>3</sub> )	168.1015 [C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (-5.67)	150.0903 135.0661
Vitamin C		4.78 (d, X part of an ABMX system, J <sub>XM</sub> = 2.0 Hz, 1H, C H-O-), 3.93 (td, M part of an ABMX system, J <sub>MX</sub> = 2.0 Hz, J <sub>MA</sub> = J <sub>MB</sub> = 6.6 Hz, 1H, C H-OH), 3.61 (AB part of an ABMX system, J <sub>AB</sub> = 11.3 Hz, J <sub>AM</sub> = J <sub>BM</sub> = 6.6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> -OH)	175.0252 [C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup> (+5.35)	115.0026 87.0076 71.0126
Vitamin B1		9.36 (s, 1H, CH <sub>arO</sub> -N <sup>+</sup> ), 7.96 (s, 1H, CH <sub>arO</sub> ), 5.36 (s, 2H, CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> ), 3.79 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> -OH), 3.10 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.51 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.48 (s, 3H, CH <sub>3</sub> )	265.1124 [C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS] <sup>+</sup> (+0.35)	144.0478 122.0714
Vitamin B2		7.97 (s, 1H, CH <sub>arO</sub> ), 7.96 (s, 1H, CH <sub>arO</sub> ), 4.94 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -N), 4.36 (m, 1H, CHO H-CH <sub>2</sub> -N), 2.55 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.46 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ) <sup>f</sup>	377.1467 [C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup> (+1.57)	243.0882 198.0661 172.0867

Table 3 (Continued)

Compound	Structure	<sup>1</sup> H NMR <sup>a</sup>	Mass spectrometry Positive or negative ionisation mode	
		δ (ppm), multiplicity <sup>b</sup> (J, Hz), attribution	Measured accurate m/z value [M+H] <sup>+</sup> or [M-H] <sup>-</sup> formula (mass error) <sup>c</sup>	m/z of major characteristic fragment ions observed <sup>d</sup>
Vitamin B3 (niacinamide form)		8.97 (dd, <i>J</i> = 2.3 Hz, <i>J</i> = 0.7 Hz, 1H, C <sub>q</sub> —CH <sub>aro</sub> —N), 8.70 (dd, <i>J</i> = 4.9 Hz, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H, CH <sub>aro</sub> —N), 8.24 (td, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H, CH <sub>aro</sub> —C <sub>q</sub> ), 7.54 (ddd, <i>J</i> = 8.0 Hz, <i>J</i> = 4.9 Hz, <i>J</i> = 0.7 Hz, 1H, CH <sub>aro</sub> )	123.0560 [C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> (+1.32)	96.0451 80.0505
Vitamin B5		3.90 (s, 1H, C—OH), 3.44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> —NH), 3.38 (AB system, <i>J</i> = 11.1 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> —OH), 2.53 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> —COOH), 0.865 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 0.861 (s, 3H, CH <sub>3</sub> )	218.1035 [C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> (+2.99)	146.0820 88.0391
Vitamin B6		8.02 (s, 1H, CH <sub>aro</sub> ), 4.99 (s, 2H, CH <sub>2</sub> —OH), 4.65 (s, 2H, CH <sub>2</sub> —OH), 2.54 (s, 3H, CH <sub>3</sub> )	170.0822 [C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (+2.83)	152.0706 134.0599

<sup>a</sup> δ were measured in CD<sub>3</sub>CN:D<sub>2</sub>O (80:20). Bold signals were used for quantitative analysis.

<sup>b</sup> s: singlet; d: doublet; dd: doublet of doublet; ddd: doublet of doublet of doublet; t: triplet; td: triplet of doublet; m: multiplet; app: apparent.

<sup>c</sup> Mass error in ppm between experimental and calculated values.

<sup>d</sup> These data are in agreement with those reported in the literature.

<sup>e</sup> Due to the presence of two chiral centers, two DMAA diastereoisomers are detected and the <sup>1</sup>H NMR spectrum is very complex.

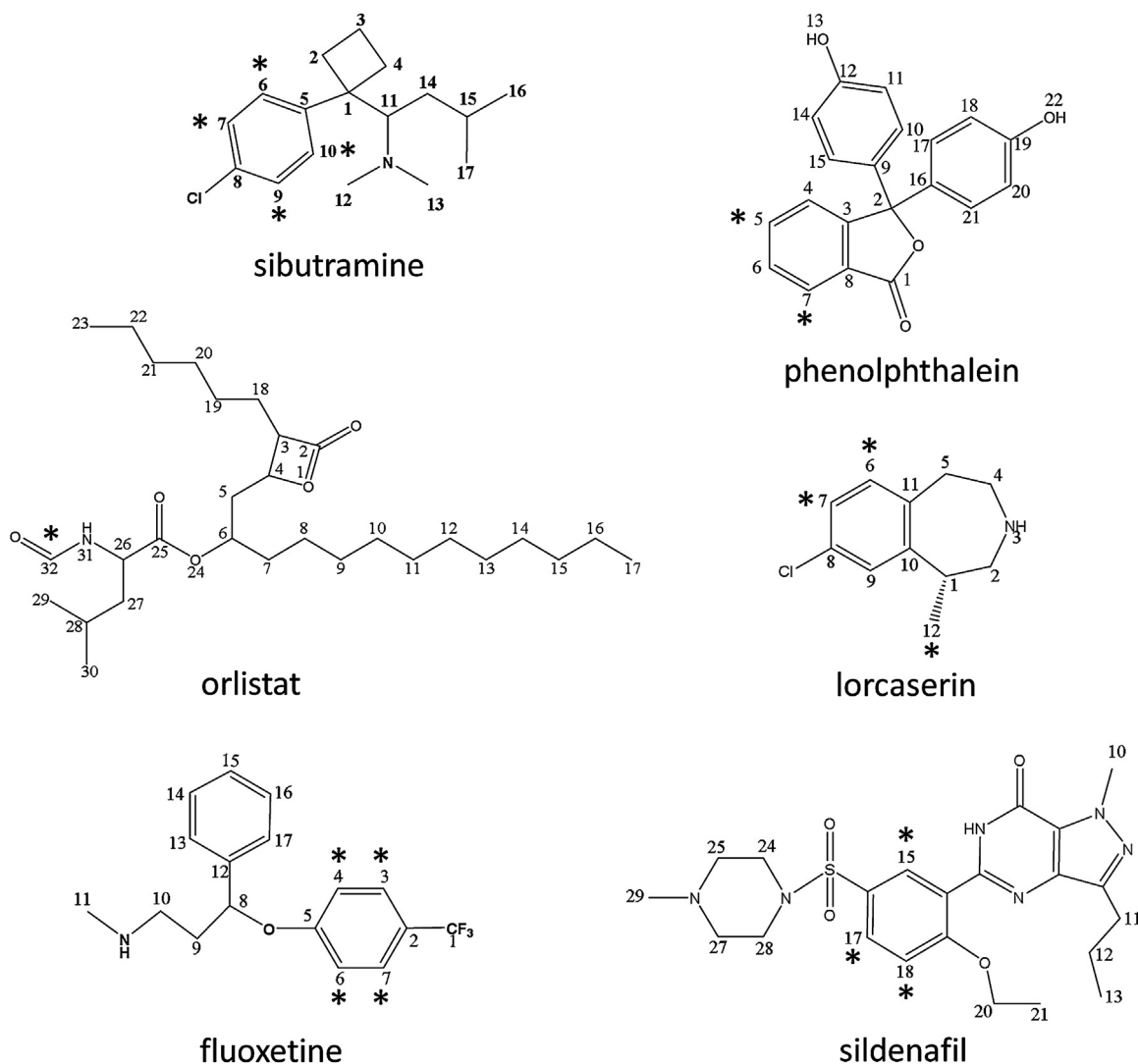
<sup>f</sup> The resonances of the CHO—H—CHO—CH<sub>2</sub>OH moiety could not be attributed because they appeared in a crowded region of the <sup>1</sup>H NMR spectrum of FS **87**.

tic sibutramine, the laxative phenolphthalein and a mixture of both these API. The visual observation of the spectra was sufficient to point out the presence of these compounds. Adulteration with phenolphthalein was easily detected from the characteristic pattern of its aromatic protons with chemical shifts ranging between 7.91 and 6.80 ppm, whereas the presence of sibutramine was established from the characteristic signals of its aromatic protons at 7.44 ppm and methyl protons CH<sub>3</sub> 16 and CH<sub>3</sub> 17 at 1.04 and 1.00 ppm. Although sibutramine and phenolphthalein were the most commonly observed adulterants, some other drugs were also identified in slimming FS. For example, formulation **54c** contained fluoxetine whose proton signals resonating in the spectrum parts shown in Fig. 2 were assigned, especially those of the AA'XX' system at 7.54 and 7.05 ppm used for its quantitative determination. More unexpected was to find sildenafil in slimming FS as in formulation **46b**. This API was easily identified from the characteristic pattern (d, dd, d) of its three aromatic protons at 8.20, 7.91 and 7.35 ppm and from the resonances of aliphatic protons at 0.96, 1.44 and 1.78 ppm. In summary, the NMR peaks in the downfield part of the spectra (6–9 ppm) gave an overview of the potential presence of adulterants with characteristic aromatic or ethylenic protons such as sibutramine, phenolphthalein, fluoxetine, sildenafil and also lorcaserin (not shown in Fig. 2), whereas those in the upfield part of the spectra illustrated (0–3 ppm) helped to identify characteristic aliphatic protons of adulterants like sibutramine, fluoxetine and sildenafil. Adulteration with orlistat was detected very easily by the singlet of its formamidic proton (H—C(O)—NH-) at 8.09 ppm (not shown in Fig. 2). Natural matrixes were characterized by signals of low intensity except those of FA assigned in the spectra of

all the formulations presented in Fig. 2 and sugars (lactose, glucose, sucrose: doublets of anomeric protons at δ between 4.5 and 5.5 ppm and multiplets of other protons between 3.3 and 4.0 ppm, spectra regions not shown in Fig. 2). Finally, as in formulation **87**, the resonances of vitamins added in FS could be detected.

<sup>1</sup>H NMR also led to identify other active substances. Caffeine was detected in numerous formulations (34 out of 160) from a low level corresponding to its natural concentration in some plants to an obviously higher concentration in coffee powders. Its association with *p*-synephrine as in FS **70** and **117** or dimethylamylamine (DMAA; also called methylhexanamine) as in FS **79** might however lead to health risks (see next section). Even if the precise identification of the natural matrix products was not the aim of this study, some natural compounds from plant or fruit extracts were identified, e.g. chlorogenic acid in formulations **50** and **134**, raspberry ketone in formulation **10**, sinapine (from oilseeds) in formulations **67**, **98** and **107a**, salicin (from willow bark) in formulation **104**. Some weak signals characteristic of polyphenols were also observed in some spectra.

MS was used as a complementary method in order to support the structure of the compounds already identified from their NMR characteristics. For all the molecules of interest identified in this study, the accurate masses of their parent ions [M+H]<sup>+</sup> or [M-H]<sup>-</sup> and main fragments in the MS<sup>2</sup> spectra are listed in Tables 2 and 3. The elemental formula of each compound was confirmed by the exact mass measurement of its molecular ion with a tolerated value of 3.0 ppm between the experimental and calculated values (except for *p*-synephrine and vitamin C). The generally high levels of adulterants explain that, despite the complexity and the variability of



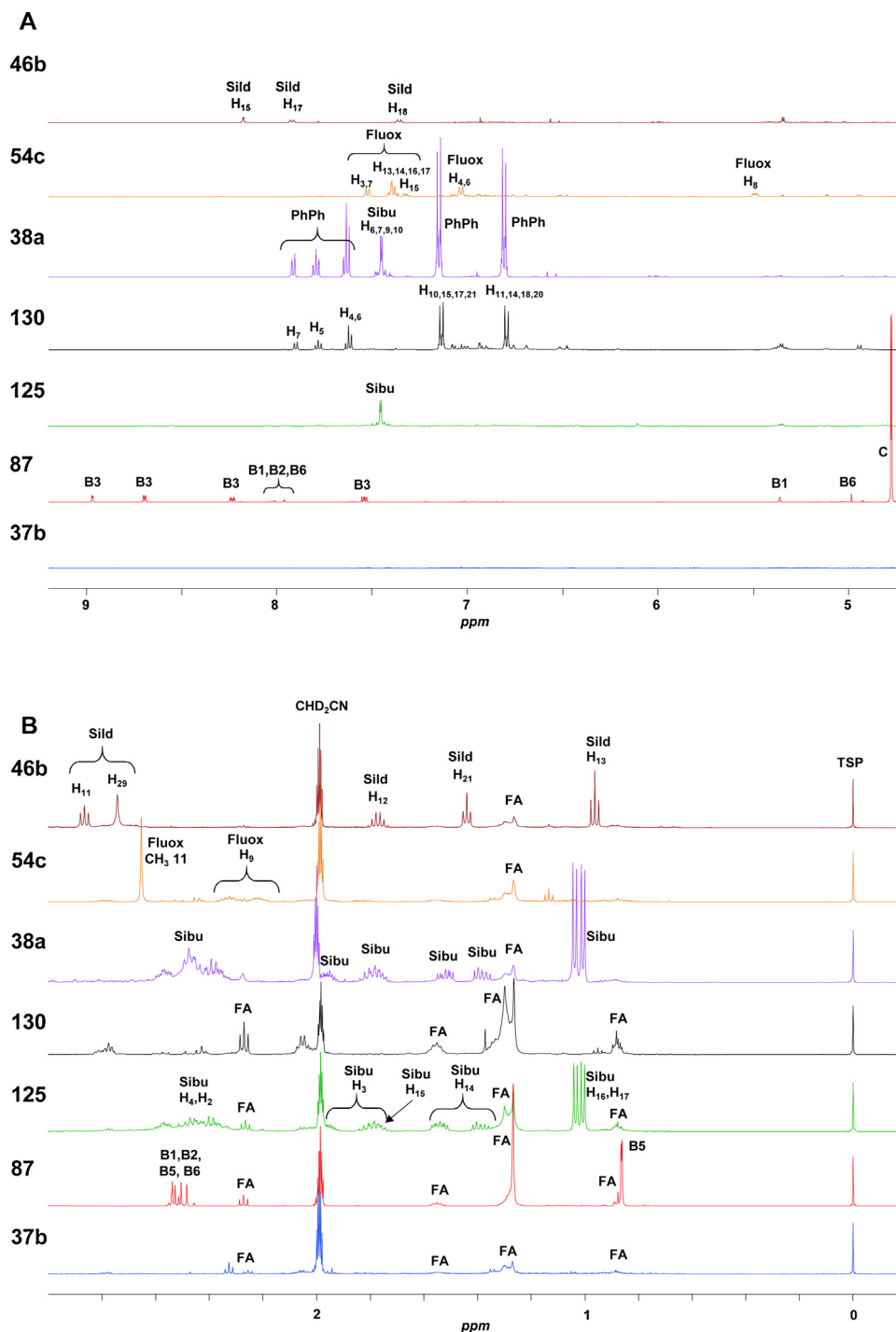
**Fig. 1.** Chemical structures of the active pharmaceutical ingredients identified in the food supplements analyzed. The asterisks denote protons considered for quantification.

the FS matrixes, a shotgun analysis provides good results and a satisfactory ionisation yield to complete their characterisation in FS. In some cases MS helped to establish the adulterant structure. For example, it is difficult to distinguish sibutramine and its analogues monodesmethylsibutramine (DMS) and didesmethylsibutramine (DDMS) from the  $^1\text{H}$  NMR spectra of FS because the  $\text{N}-\text{CH}_3$  signals of these compounds are broadened and their detection not always easy in such complex mixtures. Their unambiguous identification is thus achieved from the determination of the mass of the parent ions. Note that only sibutramine and never DMS and/or DDMS were detected in the FS analyzed.

As shown in Fig. 3A, 56% of the samples analyzed (92 out of 164 corresponding to 160 FS as 5 blisters of the same FS were investigated) were adulterated. This result is comparable to the recent reports of Reeuwijk et al. [19] and Johansson et al. [16] where respectively 48% (24 out of 50) and 49% (21 out of 43) of the FS analyzed contained adulterants, but higher than that of Kim et al. [6] and Zeng et al. [20] who detected adulterants in respectively 33% (62 out of 188) and 27% (119 out of 447) of the FS analyzed. In contrast, de Carvalho et al. [8] found that only 4% (4 out of 106) of the weight loss FS bought in Brazil were tainted, one sample containing sibutramine and three fenproporex, a stimulant drug used as an appetite suppressant. However, it was mentioned in the article that the results were not necessarily representative of adulteration

of herbal weight loss products in Brazil as all the samples were sold in pharmacies.

Among the 164 samples analyzed, 43 contained sibutramine as single adulterant (26%), 9 phenolphthalein (6%) and 23 a mixture of both these API (14%). Sildenafil was found in 12 samples, either as a single adulterant ( $n=5$ ) or in combination with sibutramine ( $n=3$ ), phenolphthalein ( $n=3$ ) and both sibutramine and phenolphthalein ( $n=1$ ). Fluoxetine was present in 4 formulations, alone ( $n=3$ ) or in combination with sibutramine and orlistat ( $n=1$ ). At last, lorcaserine was detected in one FS (Fig. 3B). Sibutramine was by far the most frequently encountered adulterant as it was present, alone or in combination with other products, in 77% (71 out of 92) of the adulterated FS, but alone in only 47% (43 out of 92). This result is in agreement with recent reports where sibutramine was the most frequent illicit agent found in 46% (55 out of 119) [20], 58% (14 out of 24) [19], 80% (53 out of 66) [21], and 88% (205 out of 232) (alone in 73% (170 out of 232)) [22] of the tainted FS. In contrast, Kim et al. [6] observed that sibutramine was detected in only 29% (18 out of 62) of adulterated FS collected in South Korea and was surpassed by senosides A and B, stimulant laxatives used instead of the banned phenolphthalein, which were found in 48% of the adulterated FS. Phenolphthalein, found in 39% (36 out of 92) of the adulterated FS, mostly in combination with sibutramine (25%, 23 out of 92) and to a much lesser extent alone (10%, 9 out of 92), was the second



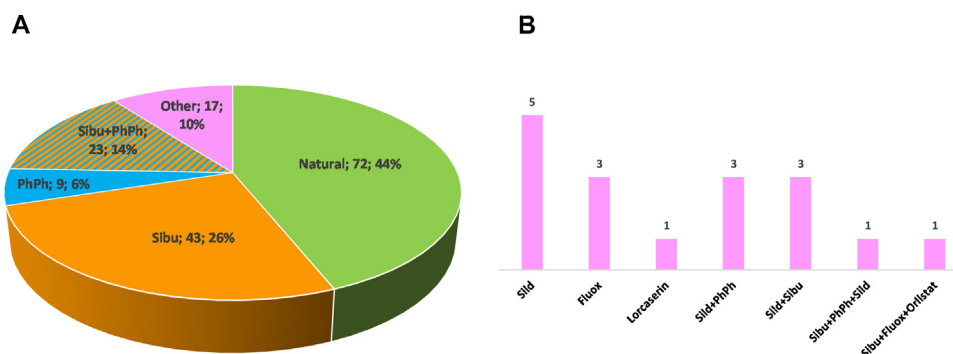
**Fig. 2.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of formulations **37b**, **87**, **125**, **130**, **38a**, **54c**, **46b** recorded in  $\text{CD}_2\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20). Two characteristic regions are displayed: 9.2–4.7 ppm (A) and 3.0–(–) 0.8 ppm (B). The numbering of protons is given in Fig. 1. The intensity of the TSP signal was normalized for the seven formulations.

Sild: sildenafil, Fluox: fluoxetine, PhPh: phenolphthalein, Sib: sibutramine, B: vitamin B, C: vitamin C, FA: fatty acids,  $\text{CHD}_2\text{CN}$ : residual signal of the solvent  $\text{CD}_3\text{CN}$ , TSP: sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimethylsilyl) propanoate as internal chemical shift reference.

illicit medicine most commonly encountered in the present study. The global percentage is higher than the values reported in the literature. Indeed, phenolphthalein was detected in 33% (22 out of 66) [21], 29% (7 out of 24) [19], 21% (25 out of 119) [20], 16% (38 out of 232) (12% (28 out of 232) in combination with sibutramine) [22], and 0% (0 out of 62) [6] of the adulterated FS. Fluoxetine was observed in 4% of the adulterated FS, a value comparable to that calculated from the data of Zeng et al. [20] (6%) and of the FDA (4%) [22] but lower than that observed (10%) in South Korea by Kim et al. [6].

The adulteration by the active metabolites of sibutramine (DMS and DDMS) was never detected while the literature data report values of 2% [20], 3% [22], 10% [21] and 33% [19]. In our study, sildenafil was identified in 13% of the adulterated FS, a percentage identical to that reported for the Dutch market [19] but much higher than that calculated from the FDA results (1%) [22]. The analysis of FS in the literature studies cited above was performed with chromatographic techniques, essentially HPLC or UPLC with UV or/and MS/MS detection [6,19–21], but also CE with electrochemical detec-





**Fig. 3.** (A) Pie chart showing the categorical breakdown (number and percentage) of the 164 samples evaluated in this study. (B) Adulterants in the 17 samples classified as "Other" in A.

Sibu: sibutramine, PhPh: phenolphthalein, Sild: sildenafil, Fluox: fluoxetine.

tion [8] and GC-MS [21]. Hence, as only the targeted compounds were detected, adulterants which were not under investigation, such as phenolphthalein, sildenafil, DMD and DDMS in the study of de Carvalho et al. [8] or sildenafil in the studies of Kim et al. [6] and Zeng et al. [20] were obviously not found.  $^1\text{H}$  NMR overcomes this limitation because the method is non-selective and all the compounds present in the mixture analyzed, provided they contain hydrogen nuclei, are detected simultaneously in a single run.

### 3.2. Level of adulteration and manufacturing practices

The amount of adulterants in all the FS analyzed was determined by quantitative NMR (qNMR) and the results are reported in Table 1. The content of sibutramine per dosage unit (capsule or sachet) ranged between 0.1 and 22 mg with a mean value of 8.6 mg. Sibutramine is an oral anorectic drug removed from the market in 2010 in several countries (USA, European Union, Australia, China for instance) because it had been associated with increased risks of heart attacks and strokes in patients with a history of cardiovascular diseases [19]. Before its withdrawal, sibutramine hydrochloride monohydrate was prescribed at daily doses ranging between 5 mg and 15 mg, corresponding respectively to 4.2 mg and 12.55 mg of sibutramine base [19]. The sibutramine base content in 47 out of the 71 FS adulterated with this drug exceeded the lowest therapeutic dose. They may produce a pharmacological effect but the 12 containing the drug at a higher dose than the maximum recommended might be responsible of serious adverse effects. Phenolphthalein was widely used as a cheap and potent laxative until the late 1990's. Indeed, because of concerns about carcinogenic potential [23], it was banned by the FDA in January 1999 in USA and the decision has spilled over to other countries. In this study, doses detected ranged from 0.05 to 56 mg with a mean value of 21.3 mg. The oral dose levels of phenolphthalein previously used in OTC laxatives ranged from 30 to 200 mg for adults and 15–60 mg for children [19]. Twenty out of the 36 FS containing phenolphthalein exceeded the lowest daily dose of 15 mg. Additionally, to our knowledge, the safety of the combination of sibutramine and phenolphthalein detected in 23 formulations had not been established in clinical trials. The approved anti-obesity agent orlistat was only present in formulation 58 at a level (13 mg per capsule) well below the recommended therapeutic dose (120 mg, three times a day). Lorcaserin is an anorectic approved by the FDA in 2012 for the treatment of obesity under the tradename Belviq®. However, in May 2013 due to euphoric, hallucinogenic, and dissociative effects at high doses, the US Drug Enforcement Administration classified lorcaserin as a Schedule IV drug under the Controlled Substances Act [24]. Lorcaserin was identified as an adulterant in a slimming FS for the first time in 2014 at a dosage of 7 mg per capsule (formulation 61

in this study), below the recommended therapeutic dose (10 mg twice daily) [24]. Moreover, the FS were adulterated not only by weight loss drugs but also with unexpected API. Indeed, fluoxetine, an antidepressant drug belonging to the group of selective serotonin reuptake inhibitors, was detected in four FS, with contents per capsule well below its therapeutic dose of 20 mg/day (0.8, 3 and 9 mg) in 3 and at a level (29 mg per capsule) corresponding to nearly 1.5 times the therapeutic dose in formulation 45. Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor (PDE-5i) well known as the API of Viagra®, was present in 12 FS, at levels ranging from traces to 8 mg per capsule. This dosage is low by comparison to the therapeutic doses used to treat erectile dysfunction (25, 50 or 100 mg) (Viagra®) or pulmonary arterial hypertension (20 mg) (Revatio®). As no pharmacological effect can be expected from these low doses, it is quite possible that the presence of sildenafil is adventitious and due to a cross contamination with other FS marketed for erectile dysfunction during the process of manufacturing. Similarly, the very low amounts of sibutramine ( $\leq 1$  mg) observed in 12 formulations could reveal inadequate cleaning of the manufacturing chain between production runs.

The  $^1\text{H}$  NMR analysis of capsules of each of the five blisters contained in a box of the X-treem slimming FS (formulation 133) is also an illustration of poor manufacturing practices. Indeed, if no adulterant was found in the first blister capsules, low amounts of sibutramine (0.8–1 mg/capsule) were detected in blisters 2, 3 and 4 as well as low levels of a mixture of phenolphthalein and sildenafil (7 and 1 mg/capsule respectively) in blister 5 (Fig. 4). The analysis of several capsules per blister ( $n \geq 3$ ) showed no inter-capsule variations. Note that if a batch number was inscribed on the box, no batch number was indicated on the blisters. Venhuis et al. [25] have already observed variability in dose units in single packages of counterfeit medicines and adulterated FS. For example, (i) suspected counterfeit Viagra 100 mg tablets were found to contain either  $\approx 100$  mg of sildenafil or no API; (ii) some sachets of instant coffee marketed for weight loss showed the presence of DDMS (8 out of 18), whereas no active ingredient was found in the other 10 sachets.

Our study also revealed changes in the chemical composition within the same branded products. For instance, the FS LiDa Dai dai hua (formulation 54) contained either sibutramine alone (54a), phenolphthalein alone (54e), a mixture of sibutramine and phenolphthalein (54b, 54d) or even fluoxetine alone (54c). These formulation changes aim probably to render more difficult the detection of adulterants in routine controls. Other examples are the two Majestic slimming formulations 65a and 65b whose packaging (logo and writing) was similar but not identical and the capsule color (respectively blue and white, and dark and light green) as well as the country of origin (respectively Australia and New Zealand)

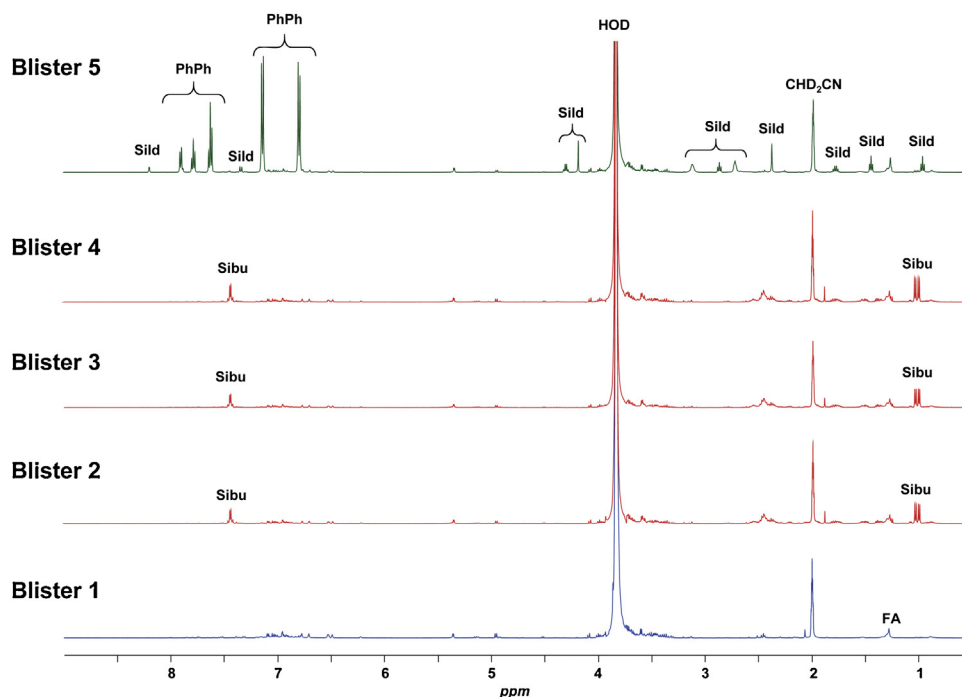


Fig. 4.  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded in  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20) of the content of capsules from five different blisters of FS **133** (Xtreem slimming capsule).

different. Phenolphthalein and traces of sibutramine were detected in **65a** and sildenafil in **65b**. Variability in the FS composition based on color difference was already reported between natural and adulterated sachets' artwork of slimming instant coffees [25]. Another interesting example concerns the FS "Seven super color" (**91a-c**). The three formulations contained both sibutramine and phenolphthalein but at different dosages, the amount of adulterants in **91a** being roughly half that in **91b** and **91c**. A close inspection of the packaging revealing different colours of the bottom of each box (blue for **91a** and gold for **91b**), it was tempting to consider that the adulterant content was related to this color modification. However, it was not possible to associate this packaging change to the adulterant levels because FS **91b** and **91c** with different box forms and capsule colours contained same amounts of adulterants (Table 1). Numerous formulations changes were also described for FS marketed for sexual dysfunction with structural changes in the nature of the API detected [26]. These observations should encourage the regulatory authorities to strengthen FS surveillance by periodically performing quality control of the same branded products.

Besides the presence of the adulterants reported above, some product combinations can be considered as dangerous for health. For example, if caffeine alone is safe, caffeine potentiates the weak cardiovascular effects of the alkaloid synephrine [27]. Of all the reports collected by health authorities (FDA, Health Canada, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (French acronym ANSES)) related to the adverse effects (mainly cardiovascular, but also hepatic or neurological) potentially linked to the consumption of weight loss or sport supplements and suspected to be associated with the presence of *Citrus* species plants as a source of synephrine or of synephrine itself, practically all involve FS also containing caffeine [27]. Hence, ANSES recommended to not combine synephrine with caffeine [27]. In 2013, Dutch health authorities issued a warning for serious health threat including tachycardia, palpitations and even one case of cardiac arrest, posed by a fat-burner weight loss FS that contained high synephrine and caffeine levels as well as other stimulants such as theophylline,

oxilofrine, deterenol and yohimbine [28]. The FS composition mentioned these ingredients or the plants (*Citrus aurantium*, green tea) from which they were extracted but the high levels of two of them (synephrine and theophylline) cast doubts on their purported natural origin [28]. The presence of synephrine combined with caffeine in FS **70** and **117** at doses of 25 and 10 mg per capsule for synephrine and 155 and 73 mg for caffeine, leads to draw attention to the potential risks of their consumption. DMAA, although banned by the World Anti-Doping Agency, is a stimulant often listed on the label of sports nutrition products that is also used as a slimming agent and as a recreational drug [29]. DMAA can produce adverse effects from vomiting, headache, nausea, to more serious events, including panic attacks, cardiac failure, cerebral haemorrhage, psychiatric disorders as well as death in some cases [29]. It was detected in FS **79** at a dose of 13 mg per capsule, in combination with 65 mg of caffeine. The DMAA contents per serving reported in the literature vary widely from 1.2 to 285 mg [30]. The presence of synephrine or DMAA concomitantly with caffeine in FS **70**, **117** and **79** cannot be considered as an adulteration because these ingredients were listed on the labels and thus not hidden to consumers. For the two FS **70** and **117**, the amounts measured were consistent with those stated on the label for synephrine and slightly lower for caffeine. No quantitative information was given for caffeine and DMAA on the label of FS **79**.

#### 4. Conclusion

In this study, we demonstrated the power of high-field  $^1\text{H}$  NMR as a screening method for the detection, identification and quantitation of adulterants in slimming FS. Among the 164 samples analyzed, only 44% were either truly natural or with a composition conform to the label. The others were tainted with six API, mainly sibutramine, phenolphthalein or a mixture of these two compounds. The study also highlights poor manufacturing practices and the need for more effective quality control of weight loss FS.


## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé: ANSM) for financial support (projet AAP-2012-082, convention ANSM/UPS n°2012S071) and Thierry Derozier from OCLAESP (Office Central de Lutte contre les Atteintes à l'Environnement et à la Santé Publique) for helpful discussions.

## References

- [1] National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity, Overweight, obesity, and health risk, *Arch. Intern. Med.* 160 (2000) 898–904.
- [2] C.M. Apovian, L.J. Aronne, D.H. Bessesen, M.E. McDonnell, M.H. Murad, U. Pagotto, D.H. Ryan, C.D. Still, Pharmacological management of obesity: an endocrine society clinical practice guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 342–362.
- [3] A. Hackett, J. Krska, Is it time to regulate over-the-counter weight-loss formulations, *Int. J. Pharm. Pract.* 20 (2012) 199–202.
- [4] A.M. Abe, D.J. Hein, P.J. Gregory, Regulatory alerts for dietary supplements in Canada and the United States 2005–13, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 72 (2015) 966–971.
- [5] E. Deconinck, K. Verlinde, P. Courselle, J.O. Beer, A validated Ultra High Pressure Liquid Chromatographic method for the characterisation of confiscated illegal slimming products containing anorexics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 59 (2012) 38–43.
- [6] H.J. Kim, J.H. Lee, H.J. Park, S.H. Cho, S. Cho, W.S. Kim, Monitoring of 29 wt-wt compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A* 31 (2014) 777–783.
- [7] Y. Li, H. Zhang, J. Hu, F. Xue, Y. Li, C. Sun, A GC-EI-MS-MS method for simultaneous determination of seven adulterants in slimming functional foods, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 928–933.
- [8] L.M. De Carvalho, P.A. Cohen, C.V. Silva, A.P. Moreira, T.M. Falcao, T.R. Dal Molin, G. Zemolin, M. Martini, A new approach to determining pharmacologic adulteration of herbal weight loss products, *Food Addit. Contam. Part A* 29 (2012) 1661–1667.
- [9] S. Akamatsu, T. Mitsuhashi, Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 426–433.
- [10] C. Mathon, A. Ankli, E. Reich, S. Bieri, P. Christen, Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry, *Food Addit. Contam. Part A* 31 (2014) 15–20.
- [11] E. Deconinck, T. Cauwenbergh, J.L. Bothy, D. Custers, P. Courselle, J.O. De Beer, Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 100 (2014) 279–283.
- [12] J.S. Rooney, A. McDowell, C.J. Strachan, K.C. Gordon, Evaluation of vibrational spectroscopic methods to identify and quantify multiple adulterants in herbal medicines, *Talanta* 138 (2015) 77–85.
- [13] C. Simmler, J.G. Napolitano, J.B. McAlpine, S.N. Chen, G.F. Pauli, Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples, *Curr. Opin. Biotechnol.* 25 (2014) 51–59.
- [14] J. Vaysse, S. Balayssac, V. Gilard, D. Desoubdizanne, M. Malet-Martino, R. Martino, Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY <sup>1</sup>H-NMR, *Food Addit. Contam. Part A* 27 (2010) 903–916.
- [15] Y.B. Monakhova, T. Kuballa, S. Lobell-Behrends, S. Maixner, M. Kohl-Himmelseher, W. Ruge, D.W. Lachenmeier, Standardless <sup>1</sup>H NMR determination of pharmacologically active substances in dietary supplements and medicines that have been illegally traded over the internet, *Drug Test. Anal.* 5 (2013) 400–411.
- [16] M. Johansson, D. Fransson, T. Rundlof, N.H. Huynh, T. Arvidsson, A general analytical platform and strategy in search for illegal drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 100 (2014) 215–229.
- [17] J.D. Dunn, C.M. Gryniowicz-Ruzicka, D.J. Mans, L.C. Mecker-Pogue, J.F. Kauffman, B.J. Westenberger, L.F. Buhse, Qualitative screening for adulterants in weight-loss supplements by ion mobility spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 18–26.
- [18] F. Song, D. Monroe, A. El-Demerdash, C. Palmer, Screening for multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 136–143.
- [19] N.M. Reeuwijk, B.J. Venhuis, D. de Kaste, R.L. Hoogenboom, I.M. Rietjens, M.J. Martena, Active pharmaceutical ingredients detected in herbal food supplements for weight loss sampled on the Dutch market, *Food Addit. Contam. Part A* 31 (2014) 1783–1793 (and references quoted in).
- [20] Y. Zeng, Y. Xu, C.L. Kee, M.Y. Low, X. Ge, Analysis of 40 weight loss compounds adulterated in health supplements by liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* (2015) 10.1002/dta.1846.
- [21] M.H. Tang, S.P. Chen, S.W. Ng, A.Y. Chan, T.W. Mak, Case series on a diversity of illicit weight-reducing agents: from the well known to the unexpected, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 71 (2011) 250–253.
- [22] Tainted Supplements CDER, US Food and Drug Administration Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/sda/sdNavigation.cfm?filter=&sortColumn=1d&sd=tainted\\_supplements\\_cder&page=1](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/sda/sdNavigation.cfm?filter=&sortColumn=1d&sd=tainted_supplements_cder&page=1) (accessed 27.05.15).
- [23] G.S. Cooper, M.P. Longnecker, R.K. Peters, Ovarian cancer risk and use of phenolphthalein-containing laxatives, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 13 (2004) 35–39.
- [24] R. Hachem, M. Malet-Martino, V. Gilard, First identification and quantification of lorcaserin in an herbal slimming dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 94–99 (and references quoted in).
- [25] B.J. Venhuis, M.E. Zwaagstra, P.H. Keizers, D. de Kaste, Dose-to-dose variations with single packages of counterfeit medicines and adulterated dietary supplements as a potential source of false negatives and inaccurate health risk assessments, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 158–165.
- [26] V. Gilard, S. Balayssac, A. Tinaugus, N. Martins, R. Martino, M. Malet-Martino, Detection, identification and quantification by <sup>1</sup>H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 476–493.
- [27] OPINION of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on the risks associated with the presence in food supplements of p-synephrine or ingredients obtained from *Citrus* spp. fruits containing this substance. Available at: <https://www.anses.fr/en/content/anses-request-based-opinions-and-reports?titre=synephrine> (accessed 15.02.16).
- [28] B. Venhuis, P. Keizers, A. van Riel, D. de Kaste, A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events, *Drug Test. Anal.* 6 (2014) 578–583.
- [29] J.R. Archer, P.I. Dargan, A.M. Lostia, J. van der Walt, K. Henderson, N. Drake, S. Sharma, D.M. Wood, C.J. Walker, A.T. Kicman, Running an unknown risk: a marathon death associated with the use of 1,3-dimethylamylamine (DMAA), *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 433–438 (and references quoted in).
- [30] Y. Zhang, R.M. Woods, Z.S. Breitbart, D.W. Armstrong, 1,3-Dimethylamylamine (DMAA) in supplements and geranium products: natural or synthetic? *Drug Test. Anal.* 4 (2012) 986–990.

# Role of Medicines of Unknown Identity in Adverse Drug Reaction-Related Hospitalizations in Developing Countries: Evidence from a Cross-Sectional Study in a Teaching Hospital in the Lao People's Democratic Republic

Céline Caillet<sup>1,2,3</sup>  · Chanvilay Sichanh<sup>2,3</sup> · Gaëtan Assemet<sup>4</sup> · Myriam Malet-Martino<sup>4</sup> · Agnès Sommet<sup>1,5</sup> · Haleh Bagheri<sup>1,6</sup> · Noudy Sengxeu<sup>7</sup> · Niphonh Mongkhonmath<sup>7</sup> · Mayfong Mayxay<sup>3,8</sup> · Lamphone Syhakhang<sup>9</sup> · Maryse Lapeyre-Mestre<sup>1,5</sup> · Paul N. Newton<sup>2,3</sup> · Anne Roussin<sup>1,5</sup>

Published online: 20 May 2017

© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

## Abstract

**Introduction** The health dangers of medicines of unknown identity (MUIs) [loose pharmaceutical units repackaged in individual bags without labelling of their identity] have been suspected in L/MICs. Using visual and analytical tools to identify MUIs, we investigated the frequency of, and factors associated with, adverse drug reaction (ADR)-related hospitalizations in a central hospital in Vientiane Capital, Lao People's Democratic Republic (PDR).

**Methods** All unplanned admissions, except for acute trauma and intentional overdose, were prospectively recorded during a 7-week period in 2013, leading to include 453 adults hospitalized for  $\geq 24$  h. The patients or their relatives were interviewed to complete the study questionnaire. MUIs suspected of being involved in ADR(s) were identified through comparison of visual

characteristics of tablets/capsules with that of reference medicines (photograph tool), and by proton nuclear magnetic resonance and mass spectrometry analyses. Factors associated with ADRs were identified by multivariate logistic regression.

**Results** The frequency of hospitalizations related to an ADR was 5.1% (23/453, 95% confidence interval [CI] 3.1–7.1). Forty-eight (12.8%) patients used MUI(s) in the last 2 weeks preceding hospitalization. They were more likely to be hospitalized because of an ADR (adjusted odds ratio 4.5, 95% CI 1.7–11.5) than patients using medicines of known identity. MUIs were mainly involved in bleeding gastroduodenal ulcers. The photograph tool led to the misidentifications because of look-alike pharmaceutical units in the medicines photograph collection.

**Conclusion** According to the results of this study, there is a need to ensure appropriate labelling of medicines at dispensing and to provide well-suited tools to identify MUIs in clinical settings to improve drug safety and patients' care

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s40264-017-0544-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Céline Caillet  
celine.caillet@iddo.org

<sup>1</sup> Pharmacoépidémiologie, Faculté de Médecine, UMR 1027 INSERM-Université Toulouse III, 37, Allées Jules Guesde, 31000 Toulouse, France

<sup>2</sup> Infectious Diseases Data Observatory–WorldWide Antimalarial Resistance Network, Centre for Tropical Medicine and Global Health, Churchill Hospital, CCVTM, University of Oxford, Oxford, UK

<sup>3</sup> Lao-Oxford-Mahosot Hospital-Wellcome Trust Research Unit, Microbiology Laboratory, Mahosot Hospital, Vientiane, Lao People's Democratic Republic

<sup>4</sup> Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068-Université Toulouse III, Toulouse, France

<sup>5</sup> Service de Pharmacologie Médicale et Clinique, Faculté de Médecine, Centre d'Investigation Clinique, CIC1436, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

<sup>6</sup> Service de Pharmacologie Médicale et Clinique, Faculté de Médecine, Centre Midi-Pyrénées de Pharmacovigilance, de Pharmacoépidémiologie et d'Informations sur le Médicament, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

<sup>7</sup> Faculty of Pharmacy, University of Health Sciences, Vientiane, Lao People's Democratic Republic

<sup>8</sup> Faculty of Postgraduate Studies, University of Health Sciences, Vientiane, Lao People's Democratic Republic

<sup>9</sup> Food and Drug Department, Ministry of Health, Vientiane, Lao People's Democratic Republic

in developing countries with limited capacities for drug analysis.

### Key Points

Our study, conducted at a central hospital of a lower middle income country (Laos) showed that 5.1% of hospitalizations are related to an adverse reaction.

The study also highlighted that the use of loose pharmaceutical units repackaged in individual bags without labelling of their identity was associated with drug-related morbidity and is detrimental for patient care.

These findings suggest that evidence-based measures to reduce the mislabelling of medicines by medicine providers and systems (e.g. an international imprint coding of medicines) to identify active pharmaceutical ingredients in medicines are required.

## 1 Introduction

Identification of strategies for detecting and preventing adverse reactions due to drugs and medication errors is one of the WHO global priority areas for patient safety research [1]. An adverse drug reaction (ADR) represents “a response to a medicinal product which is noxious and unintended, that arises from the use of the product within or outside the terms of the marketing authorization” (including off-label use, overdose, misuse, abuse and medication errors) or from occupational exposure, as defined by the European Medicines Agency [2, 3]. In low- and middle-income countries (L/MICs), there is relatively little drug safety research, and this is impaired by factors such as the lack of databases on exposure to medicinal products and on medical data during hospitalization.

Unclear labelling of medicines, or even no labelling (i.e. when patients purchase loose tablets or capsules repackaged in individual bags without any labelling as to identity or dose), have been identified in many L/MICs in South-East Asia, Africa, Latin America and the Caribbean [4–17]. In some developed countries, such as the US, medicines are commonly dispensed after repackaging of dosage units from initial bulk packaging. Although variability in the content of instruction and warning on the containers after repackaging has been observed, labels are present [18]. However, prescription medicines packaged loosely without affixed labels have been obtained from international online pharmacies [19, 20]. In South-East Asia, plastic bags

containing mixed unidentified tablets are sold by shops without staff with medical or pharmaceutical training. In the late 1990s, Stenson et al. observed that almost half of the medicines sold in community pharmacies of the Lao People’s Democratic Republic (Lao PDR, Laos) bore no label and that in 26% of cases, medicines were mixed in the same package, known as ‘yaa chud’, literally ‘combination medicine’ [21] (Fig. 1).

This practice is also observed in adjacent Thailand and Cambodia [11, 22, 23]. Dispensing unlabelled solid oral dosage forms of medicines is still common practice, as shown in a ‘mystery shopper’ survey conducted in five provinces of Laos in 2012, in which 10.1% of the 158 medicines bought for malaria treatment were sold as loose tablets with no label or written information [24].

These dispensing malpractices are an important public health issue that has been neglected, with few data to inform policy. Potential consequences of such poor dispensing practices are inadequate adherence of patients, if the dosage, time and mode of administration are not written on the plastic bags, and accelerated degradation of the active pharmaceutical ingredients (API) if the medicines are kept for long periods in unsealed plastic bags. An important potential consequence is the risk of ADRs. Analysis of the content of yaa chud tablets/capsules sold in the early 2000s on the Thailand–Myanmar border, to a buyer asking for medicines to treat fever in his pregnant wife. showed that, in addition to not being efficacious to treat malaria, they may be harmful during pregnancy [22].

For serious ADRs leading to hospitalization, lack of knowledge of medicines used by patients impairs patients’ care for both the treatment of the ADR and subsequent prescriptions. In order to characterize the role of medicines of unknown identity (MUIs) in ADR-related hospitalizations, we investigated the frequency of, and factors associated with, hospitalizations due to ADRs in Mahosot



Fig. 1 ‘Yaa chud’ sold in Laos, 2013

Hospital, Vientiane Capital. We achieved this aim by determining the provisional identity of active pharmaceutical ingredients in unknown tablets/capsules suspected to be involved in ADR-related hospitalizations, first from their visual characteristics, in comparison with that of medicines sold in Laos, and then by formal physico-chemical analysis.

## 2 Methods

### 2.1 Study Settings and Population

This cross-sectional study with prospective inclusion of patients was conducted at Mahosot Hospital, Vientiane, Lao PDR, a 450-bed adult and child primary tertiary care teaching hospital. A sample size of 456 patients was initially estimated as necessary to detect a frequency of medication-related hospital admissions of 5%, with a 95% confidence interval (CI) of 3.0–7.0%, based on international systematic reviews [25, 26]. The study was conducted over a 7-week period in February–June 2013.

All consecutive adults ( $\geq 16$  years of age) who presented to the adult medical emergency department during weekdays, and who were admitted for 1 day or more (unplanned admissions) to a hospital ward (medical, surgical and intensive care wards), were eligible for enrollment if they gave oral, informed consent. Patients hospitalized for trauma and intentional overdoses of medicines were not included.

### 2.2 Data Collection

Each patient, or their relatives, was interviewed within 48 h of admission by a Lao medical doctor, trained to complete the study questionnaire developed for the purpose of this study, with a pharmacovigilance pharmacist. The questionnaire was developed in French and the questions were asked in the Lao language by the Lao medical doctor, who is fluent in French. The 40-questions questionnaire included sociodemographic, medical history and medication exposure data (see electronic supplementary material 1). It was tested with 39 patients enrolled in a feasibility study, to assess understanding and ease of completion. The respondents to the feasibility study were asked to tell if all the words were understood. A few minor corrections were made to the original questionnaire.

A detailed prehospital medication exposure history for the 2 weeks preceding admission was taken through open-ended questions to record the name, dosage, place of procurement, if the medicine was obtained through self-medication, and the start and end dates of taking the medication. The respondents were asked to show any

medicines, prescriptions, health record booklets and/or referral letters. To minimize information bias, a questionnaire adapted from Roulet et al. [27] was used to record self-medication history. Yaa chud use was also recorded. Medication was considered as chronic use if taken for  $\geq 3$  months. Medicines were classified on the basis of the Anatomical Therapeutic Chemical classification index [28].

Patients were followed during the hospitalization and charts were reviewed again following discharge. Patients were subsequently contacted through telephone to ensure data completeness.

### 2.3 Outcome Measures

A list of trigger events, adapted from Rozich et al. [29] and Mehta et al. [30], was used during the initial screening of ADRs (see electronic supplementary material 2). The investigators did not know when an ADR was involved in the hospitalization. Whether the patients were admitted because of an ADR was first assessed by the Lao medical doctor and the pharmacovigilance specialist during the collection of the data on medication use, medical history, and history of the current condition.

Some unknown medicines used prior to hospitalization were suspected to be involved in ADR-related hospitalizations, based on chronology, reason of use and hospital diagnosis. After identification of API(s) for these unknown medicines, each initially suspected ADR was reviewed and causality assessment was performed, using the WHO criteria, by three pharmacovigilance specialists until consensus was reached [31]. Unassessable cases were excluded from the study. Only ADRs assessed as possible, probable and certain were included in the analysis.

The classification of symptoms and signs of ADRs was based on WHO Adverse Reaction Terminology (WHO ART) [31].

### 2.4 Identification of Unknown Medicines

We defined an MUI as one for which the name of the brand or active pharmaceutical ingredient(s) was not written on the primary package, and that could not be identified by any other means at the time of the interview (prescription, record booklet, patients statements ...).

MUIs suspected of being involved in an ADR-related hospitalization were provisionally identified using a visual identification tool (a photograph tool). This tool relied on the visual comparison of the features of the tablet/capsule with those of 494 known unambiguously labelled medicines collected from private community pharmacies in Vientiane Capital. One sample of all solid oral dosage forms (tablets and capsules) of medicines belonging to the

following classes, chosen as most commonly involved in ADRs [25, 26, 32], was bought to create the collection: antidiabetic, anti-infective, cardiovascular, antithrombotic, analgesic, anti-inflammatory medicines and medicines for central nervous system disorders. Identifications were performed using photographs of the reference pharmaceutical units by three health workers—two pharmacists (NS and NM) and one medical doctor (CS)—without conferring. Whenever possible, samples of the MUIs were collected by the research team and proton magnetic nuclear resonance ( $^1\text{H}$  NMR)-mass spectrometry (MS), when needed, was conducted.

## 2.5 Statistical Analysis

Data were entered into an MS Access Database 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) created specifically for the study. Qualitative variables were expressed in numbers and percentages [ $n$  (%)] and compared between patients with or without ADR-related hospitalization using Chi-square tests or Fisher's exact tests, as appropriate. Quantitative variables were expressed as mean  $\pm$  95% CI, or median and first and third quartiles (Q1–Q3), and were compared between the two groups using  $t$  tests or Wilcoxon–Mann–Whitney tests, as appropriate.

A backward logistic regression model was performed to assess factors associated with ADR-related hospitalizations. All variables associated with ADRs with a  $p$  value  $<0.20$  on univariate analysis were entered into a multivariate logistic regression model, in addition to age and sex, factors commonly associated with ADR-related hospitalizations [26]. The goodness-of-fit of the final model was assessed using the Hosmer and Lemeshow test. The results are presented as odds ratio (OR) and adjusted ORs (aOR) and their 95% CIs. Only ADRs assessed as possible, probable and certain were included in the analysis.

Data analysis was carried out using SAS 9.3 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). The level of significance was set at 0.05 (two-sided).

## 3 Results

### 3.1 Prevalence of Adverse Drug Reaction (ADR)-Related Hospitalizations in the Study Population

During the study period, 2426 adult patients of the 3529 patients visiting the emergency ward presented to the acute medical care department; 483 who were admitted for  $>24$  h provided consent and were included. Thirty cases were excluded from the study, 13 of which were unassessable cases of suspected ADRs, with a lack of information on the medication exposure ( $n = 10$ ) or the

medical history ( $n = 3$ ). The remaining 17 cases were not suspected as ADRs but were excluded because of a lack of information on the medication exposure ( $n = 14$ ) or medical history ( $n = 3$ ). Sufficient information regarding medication and/or medical history was obtained for 453 patients (94%) (Fig. 2).

The 453 patients were mainly hospitalized in the departments of infectious diseases (29.8%), gastroenterology (29.4%) and cardiology (13.5%). The remaining patients were hospitalized in the pneumology (11.3%), intensive care unit (6.8%), psychiatry (4.4%), international clinic (2.0%), surgery (1.5%) and gynaecology/obstetrics (1.3%) departments. The most frequent diagnoses at discharge were dengue fever ( $n = 55$ , 12.1%), acute respiratory diseases ( $n = 34$ , 7.5%), cancers ( $n = 32$ , 7.1%), hypertension ( $n = 28$ , 6.2%) and gastric disorders ( $n = 26$ , 5.7%). Of the 453 hospitalizations, 23 were initially suspected as ADR-related, giving a frequency of 5.1% (95% CI 3.1–7.1) during the study period.

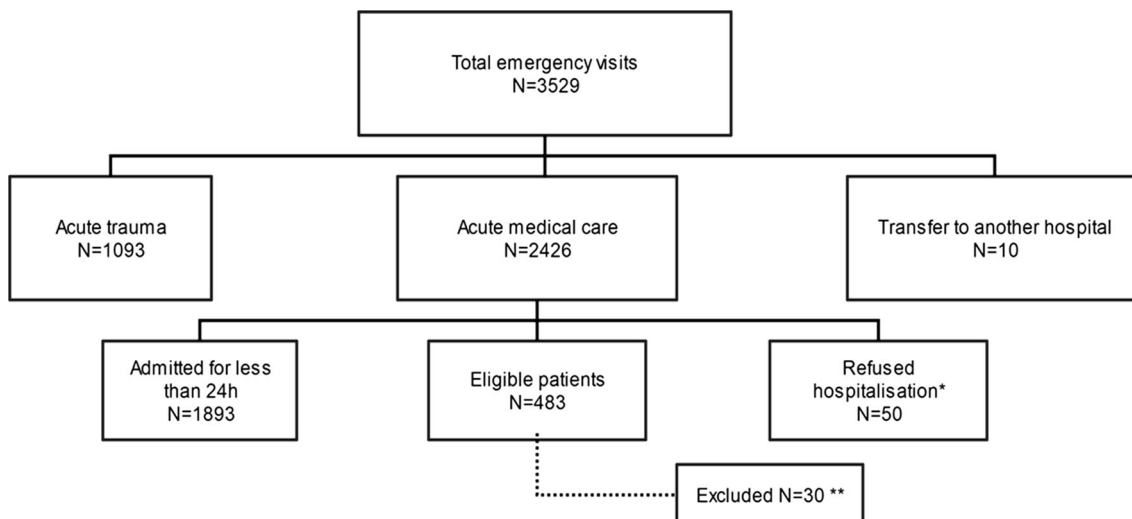
### 3.2 Identification of Medicines of Unknown Identity (MUIs) as Factors Associated with ADR-Related Hospitalizations

Factors associated with ADR-related hospitalizations were investigated in the 376 (83.0%) patients who used at least one medicine during the 2 weeks preceding hospitalization; 17 admissions were judged as being related to an ADR with known medicines, and six additional ADR-related hospitalizations from MUIs were identified using the visual tool and/or  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 3; Table 1).

The 376 patients used 1488 medicines (median 3.0 medicines per patient, interquartile range [IQR] 2.0–6.0).

Overall, 126 MUIs were used by 48 (12.8%) patients in the 2 weeks preceding hospitalization, 30 (23.8%) of which were suspected, during the initial screening, to be implicated in ADRs in six patients, based on the chronology and symptomatology. Identification of these 30 MUIs was performed by a photograph identification tool specifically developed for this study and checked by  $^1\text{H}$  NMR/MS for 27 MUIs that were obtained from the patients. The three MUIs identified by the photograph tool only, without chemical analysis, contained ibuprofen (one MUI used by a patient presenting with duodenal ulcer haemorrhage) or paracetamol (two MUIs used by patients with an ADR related to the use of medicines of known identity).

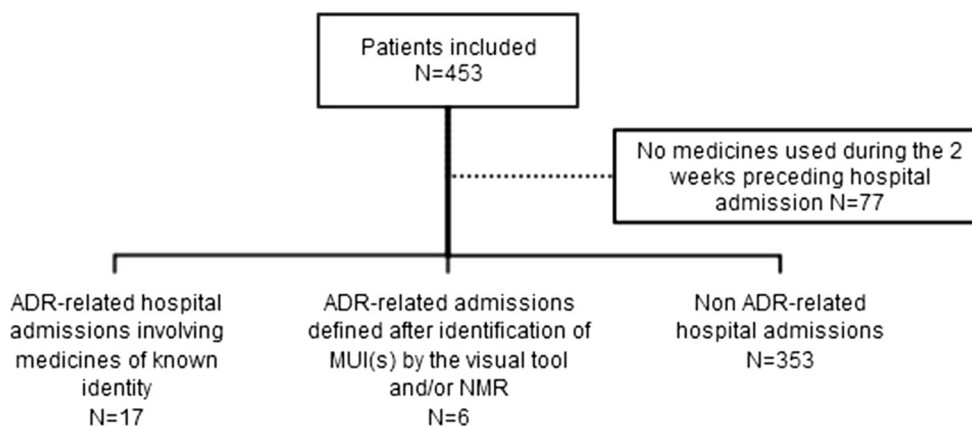
Active pharmaceutical ingredients identified by  $^1\text{H}$  NMR and/or the photograph tool were mainly vitamins ( $n = 6$ , 20.7%), antibiotics ( $n = 4$ , 13.8%;  $\beta$ -lactam  $n = 2$ , macrolide  $n = 1$ , tetracycline  $n = 1$ ), nonsteroidal anti-inflammatory drugs [NSAIDs] ( $n = 4$ , 13.8%), paracetamol monotherapies ( $n = 2$ , 6.9%) and paracetamol combination medicines ( $n = 1$ , 3.4%), proton pump inhibitors ( $n = 2$ ,



**Fig. 2** Participant flowchart. \*Patients who left the emergency department hospitalization ward (did not want to be hospitalized or decided to go to another health facility). \*\*Information regarding

medication and/or medical history was insufficient or contradictory and could not be supplemented or verified

**Fig. 3** Description of the included patients according to ADR-related hospitalizations with MUIs or medicines of known identity. ADR adverse drug reaction, MUIs medicines of unknown identity



7.7%) and cardiovascular diseases medicines ( $n = 2$ , 7.7%; digoxin  $n = 1$  and heptaminol  $n = 1$ ) [see electronic supplementary material 3 and 4].

The photograph tool led to the misidentification of 3 of 14 medicines (21.4%), with at least one dual match in the collection because of look-alike pharmaceutical units in the medicine photograph collection. Colchicine was falsely identified instead of acetylsalicylic acid (judged as implicated in one hospital admission); tetracycline instead of cloxacillin, and codeine-sulfogaiacol-*Grindelia* combination instead of a dextromethorphan-chlorpheniramine combination.

Excipients only were detected by  $^1\text{H}$  NMR in one unit that could not be identified by the photograph tool, and excipients plus an unknown macromolecular ingredient were detected in another.

Eleven identified (37.9%) MUIs were found in six ADR-related hospitalizations. For each of these cases, at least one MUI was judged to be involved in the hospitalization.

Patients hospitalized as a result of an ADR had used more medicines (median 7.0 [IQR 3.0–9.0] medicines per patient vs. 3.0 [IQR 2.0–5.0] medicines per patient;  $p < 0.001$ ) and at least one MUI ( $n = 8$  [34.8%] vs.  $n = 40$  [11.3%];  $p < 0.01$ ) than patients hospitalized for other reasons (Table 1). Two patients hospitalized because of an ADR and five patients hospitalized for other reasons had taken yaa chud (8.7 vs. 1.4%,  $p = 0.06$ ).

Table 2 presents the results of the univariate and multivariate logistic regressions. The number of medicines used in the 2 weeks preceding the hospitalization was not included in the multivariate model because of the strong collinearity of this variable with the use of MUI. Indeed, patients who used MUI(s) used significantly more medicines than those who took medicines of known identity (median 6.0 [IQR 3.0–8.0] medicines per patient versus 3.0 [IQR 1.0–5.0] medicines per patient;  $p < 0.001$ ). The results of the multivariate model suggest that the use of an MUI was independently associated with



**Table 1** Demographic and clinical characteristics of patients ( $N = 376$ )

Characteristics	Non ADR-related admissions [ $n = 353$ ]	ADR-related admissions [ $n = 23$ ]	All admissions [ $N = 376$ ]	$p$ value
Age, years [mean (95% CI)]	49.3 (47.1–51.5)	54.5 (47.1–61.9)	49.6 (47.4–51.7)	0.22
Sex, Female	181 (51.3)	15 (65.2)	196 (52.1)	0.19
District <sup>a</sup>				0.32
Urban	200 (56.7)	17 (73.9)	217 (57.7)	
Peri-urban	67 (19.0)	2 (8.7)	69 (18.4)	
Rural	10 (2.8)	1 (4.3)	11 (2.9)	
Remote	76 (21.5)	3 (13.0)	79 (21.0)	
Hospitalization in intensive care unit	20 (5.7)	3 (13.0)	23 (6.1)	0.16
Length of stay, days [median (Q1–Q3)]	4.0 (2.0–6.0)	4.0 (2.0–6.0)	4.0 (2.0–6.0)	0.68
Number of comorbid conditions				0.43
0	188 (53.3)	10 (43.5)	198 (52.7)	
$\geq 1$	164 (46.5)	13 (56.5)	177 (47.1)	
Tobacco use <sup>b</sup>	55 (15.6)	2 (8.7)	57 (15.2)	0.60
Alcohol consumption <sup>b</sup>	30 (8.5)	1 (4.3)	31 (8.2)	0.74
Creatinine clearance <sup>c</sup> , mL/min				0.12
$\geq 60$	14 (4.0)	1 (4.3)	15 (4.0)	
$< 60$	41 (11.6)	6 (26.1)	47 (12.5)	
ND	321 (90.9)	16 (69.6)	337 (89.6)	
Death during hospitalization, regardless of cause	4 (1.1)	1 (4.3)	5 (1.3)	0.27
Medications used in the last 2 weeks preceding hospitalization [median (Q1–Q3)]	3.0 (2.0–5.0)	7.0 (3.0–9.0)	3.0 (2.0–6.0)	$< 0.001$
Use of at least one MUI in the last 2 weeks preceding hospitalization	40 (11.3)	8 (34.8)	48 (12.8)	$< 0.01$
Yaa chud use	5 (1.4)	2 (8.7)	7 (1.9)	0.06
Use of at least one medicine obtained through self-medication	83 (23.5)	6 (26.1)	89 (23.7)	0.83
Use of at least one traditional medicine	60 (17)	6 (26.1)	66 (17.6)	0.26

Data are expressed as  $n$  (%) unless otherwise specified

CI confidence interval, Q1 first quartile, Q3 third quartile, ADR adverse drug reaction, MUI medicines of unknown identity, ND not determined

<sup>a</sup> Distance in travel time (by car) from provincial capital [33]:  $\leq 1$  h (urban), 1–2 h (peri-urban), 2–3 h (rural),  $> 3$  h (remote)

<sup>b</sup> At least once a day

<sup>c</sup> Estimated using the Cockcroft–Gault formula

ADR-related hospitalizations [aOR 4.5, 95% CI 1.7–11.5).

Patients exposed to MUI(s) were older than those who used medicines of known identity only (mean 55.5 [95% CI 48.8–61.3] years of age vs. 48.8 [95% CI 46.5–51.0] years of age;  $p = 0.03$ ) (Table 3) and MUIs were more frequently purchased in private clinics and less frequently in public hospitals than medicines of known identity (48.4% vs. 9.0% [ $p < 0.001$ ] and 34.1% vs. 73.9% [ $p < 0.001$ ], respectively) (Table 4).

### 3.3 Characteristics of Cases of ADR-Related Hospitalizations

Electronic supplementary material 5 summarizes the 23 patients with ADR-related hospitalizations. Ten (43.5%)

cases of ADRs were classified as probable, and 13 (56.5%) were classified as possible.

Four cases (numbers 1, 2, 3, 4) of drug-induced ulcer were caused by MUIs. Among them, ibuprofen 600 mg was dispensed to patient number 1 in a private clinic after the first symptom of gastrointestinal haemorrhage appeared (melena); one yaa chud containing two different NSAIDs (diclofenac and piroxicam) was taken by a 65-year-old patient (number 2) and one yaa chud containing acetylsalicylic acid (81 mg) and prednisone (5 mg) was taken three times per day by a 68-year-old patient (number 3). Six drug-induced ulcers involved medicine(s) of known identity (NSAIDs, including acetylsalicylic acid). In two of these cases, the culprit medicines were administered after (patient number 7) or continued (patient number 9) after the first symptoms (melena). In one case (patient number

**Table 2** Factors associated with adverse drug reaction-related hospitalizations in the backward logistic regression model

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	<i>p</i> value	aOR (95% CI)	<i>p</i> value
Age group, years				
≥65 vs. <65	1.5 (0.6–3.7)	0.36	1.3 (0.5–3.2)	0.58
Sex				
Female vs. male	1.8 (0.7–4.3)	0.20	2.0 (0.8–5.1)	0.12
Use of MUI				
Yes vs. no	4.2 (1.7–10.5)	<0.01	4.5 (1.7–11.5)	<0.01
District <sup>a</sup>		0.38		
Peri-urban vs. urban	0.4 (0.1–1.6)			
Rural vs. urban	1.2 (0.1–9.7)			
Remote vs. urban	0.5 (0.1–1.6)			
Number of comorbid conditions				
≥1 vs. 0	1.5 (0.6–3.5)	0.60		
Tobacco use <sup>b</sup>				
Yes vs. no	0.5 (0.1–2.2)	0.38		
Alcohol consumption <sup>b</sup>				
Yes vs. no	0.5 (0.1–3.7)	0.48		
Number of modern medications used				
>5 vs. ≤5	6.3 (2.6–15.4)	<0.001		
Use of at least one traditional medicine				
Yes vs. no	1.7 (0.7–4.6)	0.27		
Use of at least one medicine obtained through self-medication				
Yes vs. no	1.1 (0.4–3.0)	0.79		

OR odds ratio, CI confidence interval, aOR adjusted odds ratio, MUI medicine of unknown identity

<sup>a</sup> Distance in travel time (by car) from provincial capital [33]: ≤1 h (urban), 1–2 h (peri-urban), 2–3 h (rural), >3 h (remote)

<sup>b</sup> At least once a day

10), the NSAID was obtained through self-medication and taken in the same time as another prescribed NSAID (ibuprofen). Patient number 11 was dispensed two NSAIDs, including a high dose of piroxicam (60 mg/day) for arthralgia in a hospital.

Hypoglycemia induced by oral antidiabetics was responsible for hospitalization in three patients (numbers 13, 14, 15), of which one MUI, identified as glibenclamide, taken in high doses (20 mg/day), induced a hypoglycemic coma. One case of hypokalemia involved three different hypokalemiant medicines, of which one potassium chelative agent was prescribed, whereas the kaliemia of the patient was within normal range (patient number 16). One patient (number 19) developed a severe rash within 1 h following the intake of four MUIs, subsequently identified as clarithromycin, cephalexin and a combination of thiamine-pyridoxine.

One tablet could not be identified by either the photograph tool or NMR/MS. A 17-year-old patient (number 22) developed an acute hepatitis following the intake of four different brand medicines containing paracetamol in a short period of time, of which three were procured by a

friend to treat fever and one was dispensed in a hospital after the jaundice occurred.

### 3.4 Visual Characteristics of Tablets and Capsules in Private Pharmacies

Of the 494 medicines bought in community pharmacies for the implementation of the photograph tool, 215 tablets/capsules (43.5%) did not bear any imprint. Among these unimprinted medicines, 127 (59.1%) had at least one look-alike unit in the collection. Moreover, 7.8% of the 281 imprinted medicines also had look-alike units in the collection (Table 5; Fig. 4). In all cases the imprints represented the name of the manufacturer.

## 4 Discussion

We investigated the frequency of, and factors associated with, adult hospitalizations due to ADRs in Mahosot Hospital, Vientiane Capital. We also aimed to characterize the role of MUIs in ADR-related hospitalizations, an aim

**Table 3** Characteristics of patients taking medicines of unknown identity versus patients taking medicines of known identity only

Characteristics	Patients using medicines of known identity [ <i>n</i> = 328]	Patients using medicines of unknown identity [ <i>n</i> = 48]	All patients [ <i>N</i> = 376]	<i>p</i> value
Age, years [mean (95% CI)]	48.8 (46.5–51.0)	55.5 (48.8–61.3)	49.6 (47.5–51.7)	0.03
Sex, Female	176 (53.7)	20 (41.7)	196 (52.1)	0.13
District <sup>a</sup>				0.63
Urban	188 (57.3)	29 (60.4)	217 (57.7)	
Peri-urban	63 (19.2)	6 (12.5)	69 (18.4)	
Rural	9 (2.7)	2 (4.2)	11 (2.9)	
Remote	68 (20.7)	11 (22.9)	79 (21.0)	
Hospitalization in intensive care unit	21 (6.4)	2 (4.2)	23 (6.1)	0.75
Length of stay, days [median (Q1–Q3)]	4.0 (2.0–6.0)	4.0 (3.0–6.0)	4.0 (2.0–6.0)	0.39
Number of comorbid conditions				0.32
0	177 (54.0)	21 (43.8)	198 (52.7)	
≥1	150 (45.7)	27 (56.3)	177 (47.1)	
Tobacco use <sup>b</sup>	46 (14.0)	11 (22.9)	57 (15.2)	0.30
Alcohol consumption <sup>b</sup>	24 (7.3)	7 (14.6)	31 (8.2)	0.22
Creatinine clearance <sup>c</sup> , mL/min				0.31
≥60	13 (4.0)	2 (4.2)	15 (4.0)	
<60	38 (11.6)	9 (18.8)	47 (12.5)	
ND	277 (84.5)	37 (77.1)	314 (83.5)	
Death during hospitalization, regardless of cause	4 (1.2)	1 (2.1)	5 (1.3)	0.50
Number of medications used [median (Q1–Q3)]		3.0 (1.0–5.0)	6.0 (3.0–8.0)	<0.001
Use of at least one traditional medicine	53 (16.2)	13 (27.1)	66 (17.6)	0.07
Use of at least one medicine obtained through self-medication	78 (23.8)	11 (22.9)	89 (23.7)	0.35

Data are expressed as *n* (%) unless otherwise specified, *ND* not determined

*CI* confidence interval, *Q1* first quartile, *Q3* third quartile

<sup>a</sup> Average distance (by car) to provincial capital [33]: ≤1 h (urban), 1–2 h (peri-urban), 2–3 h (rural), >3 h (remote)

<sup>b</sup> At least once a day

<sup>c</sup> Estimated using the Cockcroft–Gault formula

that was achieved by determining the provisional identity of active pharmaceutical ingredients in unknown tablets/capsules suspected of being involved in ADR-related hospitalizations, first from their visual characteristics (in comparison with that of medicines sold in Laos), and then by formal physicochemical analysis. With a frequency of 5.1% during the survey period, this study demonstrates that ADRs substantially contribute to adult hospitalizations in Mahosot Hospital. Visual identification of MUI(s) at the time of hospitalization, coupled with a physicochemical analysis of active ingredients, allowed us to determine that one-fourth of ADR-related hospitalizations involved the use of MUI(s). Using MUI(s) was identified as a risk factor of ADR-related hospitalization.

As far as we are aware, only two studies have investigated the frequency of ADR-related hospitalizations in adults in L/MICs using similar definitions as in our study; however, these were in upper- to middle-income economies (e.g. Malaysia and South Africa) and reported higher frequencies (8.4 and 9.9%) than in the present work [30, 34].

This study has several limitations. Several reasons could have led to an underestimation of the frequency of ADR-related hospitalization in the present study. First, documenting pharmaceutical and medical histories was mainly based on patient data. Sociocultural issues relating to difficult subjects in Laos (for example HIV and tuberculosis) might have impaired the collection of information. It was

**Table 4** Characteristics of medicines of unknown identity versus medicines of known identity

	Medicines of known identity [n = 1362]	Medicines of unknown identity [n = 126]	All medicines [N = 1488]	p value
Place of procurement				<0.001
Community pharmacies	176 (12.9)	17 (13.5)	193 (13.0)	
Public hospital	1006 (73.9)	43 (34.1)	1049 (70.5)	
Health center	17 (1.2)	2 (1.6)	19 (1.3)	
Private clinic	122 (9.0)	61 (48.4)	183 (12.3)	
Others	41 (3.0)	3 (2.4)	44 (3.0)	
Chronic use				0.12
Yes	263 (19.3)	18 (14.3)	281 (18.9)	
No	1054 (77.4)	105 (83.3)	1159 (77.9)	

Data are expressed as n (%)

**Table 5** Description of imprinted look-alike ambiguous pharmaceutical units in the medicines collection

Description of the unit	Active ingredient, dose (Brand name)
White round tablet (diameter 9 mm) with engraved figure '2' in a foursquare on one side	Propranolol, 40 mg (Cardiolol <sup>®</sup> ) Griseofulvin, 125 mg (Grisoline <sup>®</sup> ) Phenobarbital, 100 mg (Phenobarbital <sup>®</sup> ) Prednisolone, 5 mg (Prednisolone <sup>®</sup> )
White round tablet (diameter 13 mm) with engraved figure '2' in a foursquare on one side	Albendazole, 200 mg (Albendazole <sup>®</sup> ) Paracetamol, 500 mg (Paracetamol <sup>®</sup> ) Sulfadoxine 500 mg, pyrimethamine 25 mg (Tancida <sup>®</sup> ) Chlorpropamide, 250 mg (Diabeta <sup>®</sup> )
Yellow round tablet (diameter 13 mm) with engraved figure '2' in a foursquare on one side	Paracetamol 500 mg, chlorpheniramine 2 mg, phenylephrine 10 mg (Deewad <sup>®</sup> ) Niclosamide, 500 mg (Tomesal <sup>®</sup> )
White round tablet (diameter 13 mm) with engraved 'KPN' in a circle on one side	Paracetamol, 500 mg (Noparin <sup>®</sup> ) Paracetamol, 500 mg (Para <sup>®</sup> )
White round tablet with engraved 'KPN' in a circle on one side	Mebendazole, 100 mg (Roben-2 <sup>®</sup> ) Sulfamethoxazole 400 mg, trimethoprim 80 mg (Strim-side <sup>®</sup> )
White oblong tablet with engraved 'SPM' on one side	Acyclovir, 200 mg (Acyvir <sup>®</sup> ) Spiramycin 1,500,000 IU (Infecin <sup>®</sup> )
White oblong tablet with engraved 'SPM' on one side	Spiramycin 3,000,000 IU (Infecin <sup>®</sup> ) Ciprofloxacin, 500 mg (Sepratis <sup>®</sup> )
Red-pink oblong tablet with engraved 'CDP' on one side	Mefenamicacid, 500 mg (Dofeminal <sup>®</sup> ) Erythromycin, 500 mg (Erythro <sup>®</sup> )
Blue and red capsule with engraved 'T/P'	Piroxicam, 20 mg (Pradong <sup>®</sup> ) Piroxicam, 20 mg (Butacinon forte <sup>®</sup> )

difficult to trace pharmaceutical and medical histories as Lao patients often seek care from multiple providers for a single illness [35, 36]. However, patient recall bias was minimized by using an adapted questionnaire to collect medication history [27] and by retrieving information from record booklets whenever possible, although information appeared to be very limited. In addition, the number of ADR-related hospitalizations may have been

underestimated as hospitalizations due to trauma were not evaluated, potentially excluding medicine-related falls and resulting fractures commonly observed in older people treated by psychotropic, cardiovascular and hypoglycemic medicines [37]. Our study was conducted in a single tertiary hospital of Laos, and, as such, careful considerations should be taken to generalize our findings to different health structures and to other parts of the country.



**Fig. 4** Imprinted look-alike pharmaceutical units containing **a** phenobarbital and **b** prednisolone, and **c** acyclovir and **d** spiramycin

As observed in other studies in L/MICs, NSAIDs were the medicines most frequently involved in ADRs [38, 39]. However, cardiovascular medicines, anticancer chemotherapy and antithrombotics were less frequently involved than in other studies, mostly conducted in high-income and upper- to middle-income countries [25, 26, 40]. In Laos, the therapeutic coverage of cardiovascular diseases is not known, but the low rate of ADR to cardiovascular medicines observed here could be related to low use, as observed in other L/MICs [41]. This is likely to be the case for anticancer medicines as cancer treatment within Laos is extremely limited [42]. More than 10% of patients hospitalized in the study period who had taken MUI(s) in the prior 2 weeks preceding the hospitalization developed serious ADRs. Patients who used MUIs also used more medicines than patients using known medicines only, and thus had a higher risk of developing ADRs [26]. In addition, dispensing errors of medicines could have been involved in ADRs, but the design of this study did not allow the investigation of this. Besides increasing the risk of developing ADR-related hospitalizations, using MUI(s) impairs patients' care, especially in health structures with limited capacities for toxicological or chemical analysis. For example, in our study, a patient developed extensive allergic reaction after taking four different MUIs. Given the risk of severe allergy in case of rechallenge of the culprit medicine or related substances, knowing their identity is essential for subsequent rational prescribing. For another patient, not knowing which antidiabetic medication

(and its strength) was involved in the hypoglycemic coma impaired the tailoring of discharge diabetes treatment. More than one-tenth of the MUIs identified by  $^1\text{H}$  NMR and/or the photograph tool were antibiotics. Not knowing the antibiotic taken prior to admission impairs the choice of appropriate antibiotics by hospital professionals. In addition, inappropriate and subtherapeutic antibiotic use is of particular concern for antimicrobial resistance. This issue has already been raised in a recent study in Laos [24], in which low doses of antibiotics were found in seven of nine yaa chud samples. Measures to ensure medicine labelling at the time of dispensing are required.

A high illiteracy rate and the fact that many medicines are bought by pharmacies in bulk and are not relabelled, were mentioned as reasons for inadequate labelling practices by medicines sellers in private pharmacies in Laos in 2000 [43]. Further investigations are needed to understand the reasons for this risky practice in other health facilities, given that half of the MUIs in our study were provided by health professionals in private clinics, and one-third in public structures.

The Lao regulation stipulates that unlabelled medicines or medicines with unclear labelling should be prohibited. Labels should clearly indicate the name, the dosage, and how to use the medicine. In addition, the mixing of different medicines in the same packaging is prohibited. As the violation of this regulation may be difficult to spot during exposed routine inspections, we suggest that cover inspections by drug inspectors are enhanced.

Identification of solid dosage forms based on their visual characteristics was suggested in the US in the 1960s, encouraged by the American Medical Association [44], and online tools are available in various countries such as Canada, the US, Vietnam and Thailand [45–48]. Almost half of the medicines bought in community pharmacies for the purpose of this study did not bear any imprint, with half of these unimprinted medicines having look-alike units in the collection. Moreover, a substantial minority of the imprinted medicines also had look-alike units. In our study, the misidentifications of MUIs by the photograph tool because of look-alike medicines, questions the global utility of these tools in routine, especially for the identification of unimprinted units. However, in the presence of unknown imprinted medicine, it could be useful as a rapid screening tool, and active pharmaceutical ingredient-specific identification by physicochemical techniques such as thin-layer chromatography should be performed (e.g. with the Global Pharma Health Fund Minilab) [49]. Other devices, such as handheld devices using Raman or near-infrared instrumentation [50], or MS and low-field NMR technologies [51, 52], although more costly, would be of great utility in clinical settings while medicines continue to be unlabelled. However, in L/MICs, such physicochemical identification techniques cannot be implemented easily in health structures and are usually not affordable.

Trademark imprints on tablets or capsules are clearly insufficient for pill identification, and, rather than investing in complicated and expensive chemistry, it would be more preferable if a global standardized imprint identification coding system for tablets/capsules was introduced, as discussed in the early 2010s [53]. Harmonized, internationally accepted coding systems exist for other small products, such as the colour codes to identify electrical resistors [54], but still nothing is in place for pharmaceuticals. A sustainable comprehensive and easily available database of these codes would allow patients and health professionals to rapidly identify the active pharmaceutical ingredient(s) in medicines and abolish MUI. The WHO leads the International Nonproprietary Names system and we suggest that this should be expanded to an international pharmaceutical identity coding system [55].

## 5 Conclusion

The results of this cross-sectional study performed in a teaching hospital of Lao PDR highlighted that exposure to medicines not sold in their original packaging and without written identity is a factor associated with a higher risk of ADR-related hospitalizations. The majority of unimprinted tablets/capsules collected during this study had at least one look-alike unit in the collection of medicines collected for

identification of the medicines through their visual aspect. Therefore, visual identification of the collected medicines was not sufficient and a physicochemical analysis was required.

The hazardous consequences of practices of use of MUIs must be investigated, particularly in developing countries where capacities for drug analysis are limited. Although any pharmaceutical identity coding system would not substitute the need for improvement in good dispensing practices, it is time for patient protection through research for an international unambiguous pharmaceutical unit imprinting.

**Acknowledgements** We are very grateful to the Directors of Mahosot Hospital, Dr. Rattanaphone Phetsouvanh, and staff of the Microbiology Laboratory.

### Compliance with Ethical Standards

**Ethical approval** Oral informed consent was obtained from all participants. Ethical clearance for the study was granted by the National Ethics Committee for Health Research, Ministry of Health of the Lao PDR (No. 43/NECHR).

**Funding** This work was supported by the Pierre Fabre Foundation, The L’Oreal Foundation-Unesco, the French Ministry of Superior Education and Research, and the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM, Project AAP-2012-082). Paul Newton and Mayfong Mayxay are funded by the Wellcome Trust. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

**Conflict of interest** Céline Caillet, Chanvilay Sichanh, Gaëtan Assemat, Myriam Malet-Martino, Agnès Sommet, Haleh Bagheri, Noudy Sengxeu, Niphonh Mongkhonmath, Mayfong Mayxay, Lamphone Syhakhang, Maryse Lapeyre-Mestre, Paul N. Newton and Anne Roussin declare that they have no competing interests.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

1. World Health Organization. WHO Patient Safety Research. 2009. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70145/1/WHO\\_IER\\_PSP\\_2009.10\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70145/1/WHO_IER_PSP_2009.10_eng.pdf). Accessed 14 Feb 2017.
2. Food and Drug Administration. Guidance for Industry and Investigators Safety: Reporting Requirements for INDs and BA/

- BE Studies. 2012. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM227351.pdf>. Accessed 14 Feb 2017.
3. European Medicines Agency. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP)—Annex 1—Definitions (Rev 3). 2012. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/05/WC500143294.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/05/WC500143294.pdf). Accessed 14 Feb 2017.
  4. Akerele JO, Ukoh GC. Aspects of microbial contamination of tablets dispensed in hospitals and community pharmacies in Benin City, Nigeria. *Trop J Pharm Res.* 2002;1(1):23–8.
  5. Gaudiano MC, Di Maggio A, Cocchieri E, et al. Medicines informal market in Congo, Burundi and Angola: counterfeit and sub-standard antimalarials. *Malar J.* 2007;6:22.
  6. Goodman C, Kachur S, Abdulla S, et al. Regulating Tanzania's drug shops: why do they break the rules, and does it matter? *Health Policy Plan.* 2007;22(6):393–403.
  7. Evans L, Coignez V, Barojas A, et al. Quality of anti-malarials collected in the private and informal sectors in Guyana and Suriname. *Malar J.* 2012;11:203.
  8. Naveed Q, Hashmi S, Iqbal A, et al. Analysis of pathogens in nonsterile pharmaceuticals drugs of public hospital of Daman (U.T). *Indian J Pharm Sci.* 2014;4:1–3.
  9. Yong YL, Plançon A, Lau YH, et al. Collaborative health and enforcement operations on the quality of antimalarials and antibiotics in southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(6 Suppl):105–12.
  10. Goodman C, Brieger W, Unwin A, et al. Medicine sellers and malaria treatment in sub-Saharan Africa: what do they do and how can their practice be improved? *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:203–18.
  11. Yeung S, Lawford HLS, Taberner P, et al. Quality of anti-malarials at the epicenter of antimalarial drug resistance: results from an overt and mystery client survey in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(6 Suppl):39–50.
  12. Kamat VR, Nichter M. Pharmacies, self-medication and pharmaceutical marketing in Bombay, India. *Soc Sci Med.* 1998;47(6):779–94.
  13. Bate R, Coticelli P, Tren R, et al. Antimalarial drug quality in the most severely malarious parts of Africa: a six country study. *PLoS One.* 2008;3:e2132.
  14. Bate R, Ayodee T, Tren R, et al. Drug Use in Nigeria—An informal survey of doctors, pharmacists, healthcare workers in Lagos, Ondo, and Ogun, and a pilot quality assessment of essential drugs from Lagos pharmacies. 2009. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.503.2956&rep=rep1&type=pdf>. Accessed 14 Feb 2017.
  15. Hoa NQ, Ohman A, Lundborg CS, et al. Drug use and health-seeking behavior for childhood illness in Vietnam: a qualitative study. *Health Policy.* 2007;82(3):320–9.
  16. Tipke M, Diallo S, Coulibaly B, et al. Substandard anti-malarial drugs in Burkina Faso. *Malar J.* 2008;7:95.
  17. Kaur H, Goodman C, Thompson E, et al. A nationwide survey of the quality of antimalarials in retail outlets in Tanzania. *PLoS One.* 2008;3(10):e3403.
  18. Shrank WH, Agnew-Blais J, Choudhry NK, et al. The variability and quality of medication container labels. *Arch Intern Med.* 2007;167(16):1760–5.
  19. Westenberger BJ, Ellison CD, Fussner AS, et al. Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques. *Int J Pharm.* 2005;306(1–2):56–70.
  20. Veronin M. Packaging and labeling of pharmaceutical products obtained from the internet. *J Med Internet Res.* 2011;13(1):e22.
  21. Stenson B, Syhakhang L, Eriksson B, et al. Real world pharmacy: assessing the quality of private pharmacy practice in the Lao People's Democratic Republic. *Soc Sci Med.* 2001;52:393–404.
  22. Newton PN, Hampton CY, Alter-Hall K, et al. Characterization of 'Yaa Chud' Medicine on the Thailand-Myanmar border: selecting for drug-resistant malaria and threatening public health. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:662–9.
  23. Littrell M, Gatakaa H, Phok S, et al. Case management of malaria fever in Cambodia: results from national anti-malarial outlet and household surveys. *Malar J.* 2011;10:328.
  24. Taberner P, Mayxay M, Culzoni MJ, et al. A repeat random survey of the prevalence of falsified and substandard antimalarials in the Lao PDR: a change for the better. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(6 Suppl):95–104.
  25. Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *Ann Pharmacother.* 2008;42(7):1017–25.
  26. Al Hamid A, Ghaleb M, Aljadhey H, et al. A systematic review of hospitalization resulting from medicine-related problems in adult patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;78(2):202–17.
  27. Roulet L, Asseray N, Foucher N, et al. A questionnaire to document self-medication history in adult patients visiting emergency departments. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2013;22(2):151–9.
  28. World Health Organization Collaborating Center for Drug Statistics Methodology. WHOCC - ATC/DDD Index. 2016. Available at: [http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/). Accessed 14 Feb 2017.
  29. Rozich J, Haraden C, Resar R. Adverse drug event trigger tool: a practical methodology for measuring medication related harm. *Qual Saf Health Care.* 2003;12(3):194–200.
  30. Mehta U, Durrheim DN, Blockman M, et al. Adverse drug reactions in adult medical inpatients in a South African hospital serving a community with a high HIV/AIDS prevalence: prospective observational study. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(3):396–406.
  31. World Health Organization-Uppsala Monitoring Centre. The use of the WHO-UMC system for standardised case causality assessment. Available at: <http://who-umc.org/Graphics/24734.pdf>. Accessed 14 Feb 2017.
  32. Jolivot P-A, Hindlet P, Pichereau C, et al. A systematic review of adult admissions to ICUs related to adverse drug events. *Crit Care.* 2014;18:643.
  33. Syhakhang L, Freudenthal S, Tomson G, et al. Knowledge and perceptions of drug quality among drug sellers and consumers in Lao PDR. *Health Policy Plan.* 2004;19(6):391–401.
  34. Karuppanan M, Kang Nee T, Mohd Ali S, et al. The prevalence of adverse drug event-related admissions at a local hospital in Malaysia. *Arch Pharm Pract.* 2013;4:160.
  35. Alvesson HM, Lindelow M, Khanthaphat B, et al. Coping with uncertainty during healthcare-seeking in Lao PDR. *BMC Int Health Hum Rights.* 2013;13:28.
  36. Nonaka D, Vongseththa K, Kobayashi J, et al. Public and private sector treatment of malaria in Lao PDR. *Acta Trop.* 2009;112(3):283–7.
  37. Chen Y, Zhu L-L, Zhou Q. Effects of drug pharmacokinetic/pharmacodynamic properties, characteristics of medication use, and relevant pharmacological interventions on fall risk in elderly patients. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:437–48.
  38. Major S, Badr S, Bahlawan L, et al. Drug-related hospitalization at a tertiary teaching center in Lebanon: incidence, associations, and relation to self-medicating behavior. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;64(4):450–61.
  39. Zargazadeh AH, Emami MH, Hosseini F. Drug-related hospital admissions in a generic pharmaceutical system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(5–6):494–8.
  40. Chan SL, Ang X, Sani LL, et al. Prevalence and characteristics of adverse drug reactions at admission to hospital: a prospective observational study. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82(6):1636–46.

41. Basu S, Millett C. Social epidemiology of hypertension in middle-income countries: determinants of prevalence, diagnosis, treatment, and control in the WHO SAGE study. *Hypertension*. 2013;62(1):18–26.
42. Chaleunvong K, Kamsa-Ard S, Suwanrungruang K, et al. Retrospective appraisal of cancer patients from Vientiane Capital City, Lao People's Democratic Republic (PDR), seeking treatment in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:5435–40.
43. Stenson B, Syhakhang L, Lundborg CS, et al. Private pharmacy practice and regulation. A randomized trial in Lao P.D.R. *Int J Technol Assess Health Care*. 2001;17:579–89.
44. Hefferren JJ. Identification guide for solid dosage forms. *J Am Med Assoc*. 1959;169:479–84.
45. RxID. Canadian Pill Identifier - Identify a Tablet. RxID.ca. 2013. Available at: [http://canadian-pill-identifier.com/pill-identifier.php?site\\_language=english](http://canadian-pill-identifier.com/pill-identifier.php?site_language=english). Accessed 14 Feb 2017.
46. US National Library of Medicines, National Institutes of Health. Identify or Search for a Pill. Pillbox Rapid Identification Reliable Information. 2016. Available at: <http://pillbox.nlm.nih.gov/>. Accessed 14 Feb 2017.
47. MIMS. Tìm kiếm hình ảnh nâng cao | MIMS.com Vietnam. MIMS—Mon. Available at: <http://www.mims.com/vietnam/image/advancedsearch>. Accessed 14 Feb 2017.
48. Advanced Drug Image Search | MIMS.com Thailand. MIMS—Mon. Available at: <http://www.mims.com/thailand/image/advancedsearch>. Accessed 14 Feb 2017.
49. Global Health Pharma Fund. The GPHF-Minilab™—Fact Sheet. GPHF—2016. Available at: <http://www.gphf.org/minilab/factsheet.htm>. Accessed 14 Feb 2017.
50. Fernandez FM, Hostetler D, Powell K, et al. Poor quality drugs: grand challenges in high throughput detection, countrywide sampling, and forensics in developing countries. *Analyst*. 2011;136(15):3073–82.
51. Pagès G, Gerdova A, Williamson D, et al. Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field <sup>1</sup>H NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances. *Anal Chem*. 2014;86(23):11897–904.
52. Harris GA, Nyadong L, Fernandez FM. Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. *Analyst*. 2008;133(10):1297–301.
53. Schiff GD, Kim S, Seger A, et al. Issues in medication safety. *Am J Health Syst Pharm*. 2007;64(1):22.
54. International Electrotechnical Commission. IEC 60062:2016 Marking codes for resistors and capacitors. 2016. Available at: <https://webstore.iec.ch/publication/25395>. Accessed 14 Feb 2017.
55. World Health Organization. International Nonproprietary Names. 2016. Available at: <http://www.who.int/medicines/services/inn/en/>. Accessed 14 Feb 2017.





## Screening of “spice” herbal mixtures: From high-field to low-field proton NMR



Gaëtan Assemat<sup>a</sup>, Florian Dubocq<sup>a</sup>, Stéphane Balayssac<sup>a</sup>, Catherine Lamoureux<sup>b</sup>, Myriam Malet-Martino<sup>a</sup>, Véronique Gilard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMB (UMR CNRS 5068), Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

<sup>b</sup> SCL—Laboratoire d’Île-de-France, 1 rue Gabriel Vicaire, 75141 Paris Cedex 03, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 February 2017

Received in revised form 26 July 2017

Accepted 7 August 2017

Available online 12 August 2017

#### Keywords:

Spice  
Synthetic cannabinoids  
Quantitative NMR  
Low-field NMR

### ABSTRACT

Forty one samples of herbal spices intended to be introduced into the European market and seized by the French customs were analysed with high-field <sup>1</sup>H NMR. Nine synthetic cannabinoids (MAM-2201, JWH-073, JWH-210, JWH-122, JWH-081, JWH-250, UR-144, XLR-11 and AKB-48-5F) were detected and quantified. The ability of a compact benchtop low-field NMR spectrometer for a rapid screening of the content of herbal blends was then successfully explored for the first time. Even if low-field <sup>1</sup>H NMR spectra are much less resolved than high-field spectra, we demonstrate that they provide valuable clues on the chemical structures of synthetic cannabinoids with the detection of some typical signals.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The “spice” phenomenon appeared around 2006 and gained popularity over the following years [1]. These smokable herbal mixtures are sold on the Internet and in various specialised shops generally as incense and labelled as “not for human consumption” [2]. When smoked, these preparations have effects similar to those of cannabis. Indeed they are composed of an herbal matrix whose composition may vary [2] to which synthetic cannabinoids (SC) are added to ensure the narcotic pharmacologic effect. Forensic or regulatory agencies laboratories must be able to detect and identify these compounds in the herbal mixtures, which is not an easy task because the structures of SC are very diverse and a large number of new psychoactive SC have appeared on the market in recent years [3].

Various studies described the detection and identification of SC added to herbal mixtures [4–8]. The main methods used for their full characterisation were UV and Infrared spectroscopies, mass spectrometry (MS) and high-field (HF) NMR that has been already successfully used as a potent tool for the structural elucidation of new SC [4,9–12]. Beyond their identification, the quantification of added SC was performed in few studies using

gas chromatography-MS (GC-MS) with a deuterated internal standard or liquid chromatography with UV detection (LC-UV) [5,13–17]. Recently, two studies reported the screening and quantification of SC in herbal blends using HF NMR [18,19] and Marino et al. [13] proposed complementary HF <sup>1</sup>H NMR and direct analysis in real time-MS (DART-MS) methods for their rapid identification in herbal incenses.

Although NMR is not so far considered as a routine tool in analytical chemistry mainly because of its high cost, the recent introduction on the market of benchtop cryogen-free low-field (LF) NMR spectrometers could induce a technological breakdown for quality control and in various routine analyses. Indeed, some recent applications of compact NMR spectrometers were described for the control of the quality of various matrices: edible oil [20], meat [21], dietary supplements [22,23] and even raw rubber [24].

In the present study, we first demonstrate the ability of HF <sup>1</sup>H NMR as a screening and quantitative tool in the field of SC determination in complex herbal mixtures. Forty one spice herbal blends intended to be introduced into the European market and seized by the French customs were analysed with HF NMR for the identification and quantitation of the SC they contained. In a second step, a compact LF NMR spectrometer was successfully explored for the first time as a detection method for SC contamination of herbal samples.

\* Corresponding author.

E-mail address: [gilard@chimie-ups-tlse.fr](mailto:gilard@chimie-ups-tlse.fr) (V. Gilard).

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

41 samples of herbal spices coming from customs seizures were submitted for analysis to the SCL laboratory (French Customs). They were analysed with a GC–MS procedure standardized according to UN recommendations [23] and routinely used in this laboratory. The identification of added SC was performed with public [25,26] and in-house data base. Samples with their analytical reports were then transmitted for NMR analysis. Two additional samples in which no SC or other chemicals were found with GC–MS were considered as control samples. MAM-2201, JWH-210 and UR-144 standard compounds were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and dimethyl maleate (DMM) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Preparation of samples for NMR analysis

#### 2.2.1. Samples for HF NMR

Around 40 mg of each herbal mixture were weighted and extracted with  $3 \times 1$  mL of  $\text{CDCl}_3$  containing 0.5 mM of the internal reference DMM. For each extraction the mixture was placed in a stoppered tube, sonicated during 5 min and then magnetically stirred for 5 min. The three supernatants were collected and mixed and 600  $\mu\text{L}$  of the resulting solution were transferred into an NMR tube. To limit the influence of the heterogeneity of the herbal samples on the quantitative data, particularly the uneven coverage of SC on the herbal matrix, each spice sample was prepared and analysed in triplicate.

In a preliminary step, the extraction was repeated 5 times with 1 mL  $\text{CDCl}_3$  on samples 30 and 31. The recoveries of the first three extractions were 98.2%, 98.7% and 99.1% for AKB-48-5F, UR-144 and JWH-210 respectively. We thus decided to consider only 3 successive extractions for simplifying the procedure.

For linearity, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) measurements, solutions of standard JWH-210, MAM-2201 and UR-144 were prepared in  $\text{CDCl}_3$  at concentrations ranging from ca. 0.09 to 1.6 mg/mL (or ca. 0.25 to 4.5 mM). The solutions at highest concentration served for the determination of accuracy.

#### 2.2.2. Samples for LF NMR

Solutions were prepared according to the same protocol except that only one extraction with 1 mL of  $\text{CDCl}_3$  containing the internal reference DMM was done. The same protocol was used for the preparation of sample 33 (MAM-2201) analysed with both HF and LF NMR.

### 2.3. NMR analysis

#### 2.3.1. HF NMR analysis

HF  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed on a Bruker Avance I 500 spectrometer (Bruker Biospin AG, Fallanden, Switzerland) equipped with a 5 mm cryoprobe (cooling with He) at 298 K and a sample jet autosampler. Typical acquisition parameters were as follows: number of scans (NS) 64, pulse width 3.38  $\mu\text{s}$  (flip angle  $30^\circ$ ), acquisition time 2.04 s, spectral width 16 ppm, 32 K data points, and an additional relaxation delay of 7 s; the recording time was thus ca. 10 min. The signal of residual  $\text{CHCl}_3$  set at 7.26 ppm was used as an internal reference for chemical shift measurement.

The concentrations were measured by comparing the signal areas of convenient protons (written in bold in Table 1) of targeted compounds with that of the signal of the equivalent olefinic protons of DMM, the area of each NMR peak being directly proportional to the number of protons giving rise to it. HF  $^1\text{H}$  NMR data were thus processed using the Bruker TopSpin 2.1 software with one level of zero-filling and Fourier transformation after multiplying FIDs by an exponential line-broadening function of 0.3 Hz. After phasing and baseline correction of the spectra, the

**Table 1**

High-field  $^1\text{H}$  NMR characteristics of synthetic cannabinoids detected in this study. NMR data were obtained from real samples spectra in  $\text{CDCl}_3$ . Signals in bold were used for quantification.

H label <sup>a</sup>	MAM-2201		JWH-081		JWH-073		JWH-122		JWH-210		JWH-250		UR-144		XLR-11		AKB-48-5F										
	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>	$\delta^b$	M <sup>c</sup> J <sup>b</sup>									
2	7.37	s	7.41	s	7.36	s	7.36	s	7.37	s	<b>7.87</b>	<b>s</b>	<b>7.66</b>	<b>s</b>	7.65	s											
4	8.50	m	8.45	m	8.48	m	8.48	m	8.49	m	8.41	m	8.40	m	8.40	m	8.38	d	8.1								
5	7.37	m	7.37	m	7.38	m	7.37	m	7.37	m	7.28	m	7.31	m	7.31	m	7.24	m									
6, 7	7.37	m	7.37	m	7.38	m	7.37	m	7.37	m	7.28	m	7.31	m	7.31	m	7.38	m									
1''	4.10	t	7.1	4.09	t	7.3	4.08	t	7.2	4.07	t	7.4	4.13	t	7.2	4.15	t	7.2	4.18	t	7.0	4.38	t	6.9			
2''	1.86	qt	7.5	1.83	qt	7.3	1.79	qt	7.5	1.81	qt	7.3	1.88	qt	7.2	1.89	qt	7.3	2.00	qt	7.1	1.99	qt	7.6			
3''	1.40	qt	7.5	1.30	m		1.31	sx	7.5	1.28	m		1.28	m		1.33	m		1.30	m		1.50	m	1.46	m		
4''	1.66	m		1.30	m		0.90	t	7.4	1.28	m		1.28	m		1.33	m		1.30	m		1.74	m	1.75	m		
5''	<b>4.39</b>	<b>td</b>	<b>47.3</b>	0.86	t	6.9				0.85	t	6.9	0.90	t	7.0	0.90	t	<b>4.44</b>	<b>td</b>	<b>47.4</b>	<b>47.4</b>	<b>4.43</b>	<b>td</b>	<b>47.5</b>	<b>47.5</b>		
			<b>5.9</b>															<b>5.9</b>						<b>5.9</b>	<b>5.9</b>		
2'	7.56	d	7.2	<b>7.65</b>	<b>d</b>	<b>7.8</b>	7.66	dd	7.7	0.8	7.57	m	7.59	d	7.2									<b>2.21</b>	<b>s</b>		
3'	7.37	m		6.84	d	7.9	7.50	m			7.37	m	7.37	m										<b>2.14</b>	<b>s</b>		
4'							<b>7.97</b>	<b>d</b>	<b>8.3</b>																1.75	m	
5'	8.08	d	8.4	8.27	m		<b>7.91</b>	<b>d</b>	<b>8.0</b>	8.07	d	8.4	<b>8.13</b>	<b>d</b>	<b>8.5</b>	6.88	d	8.4									
6'	7.56	m		7.51	m		7.50	m			7.57	m	7.54	m		6.92	t	7.5									
7'	7.48	m		7.51	m		7.50	m			7.48	m	7.46	m		7.30	m										
8'	8.25	d	8.4	8.34	m		8.19	d	8.3	8.24	d	8.3	8.25	d	8.5												
1'															4.17	s		1.94	s		1.95	s					
CH <sub>2</sub>																											
CH <sub>3</sub>	2.78	s								2.78	s		1.44	t	7.5												
O–CH <sub>3</sub>																											
NH				4.08	s																					6.80	s

<sup>a</sup> See Fig. 1 for chemical structures and numbering.

<sup>b</sup>  $\delta$  (ppm), J (Hz).

<sup>c</sup> M: multiplicity; s: singlet; d: doublet; dd: doublet of doublet; t: triplet; td: triplet of doublet; q: quadruplet; qt: quintuplet; sx: sextuplet; m: multiplet.

targeted signals were integrated using the bucketing tool included in the KnowItAll<sup>®</sup> software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The amount of each SC expressed in mg/g of spice sample was determined using the following general equation:

$$\text{Amount(mg/g)} = [\text{REF}] \times \frac{A_x}{A_{\text{REF}}} \times \frac{N_{\text{REF}}}{N_x} \times V \times \frac{M_{W_x}}{W_{\text{sample}}}$$

where [REF] is the concentration of the internal standard,  $A_x$  and  $A_{\text{REF}}$  the integrated signal areas of the targeted SC and the internal reference respectively,  $N_x$  and  $N_{\text{REF}}$  the number of protons giving rise to the signal considered,  $V$  the volume of solution (3 mL),  $M_{W_x}$  the molecular weight of each SC, and  $W_{\text{sample}}$  the mass of spice sample used for the NMR assay. When more than one signal was considered for quantification, the mean value was retained.

T1 of protons selected for quantification of SC and internal reference were measured in samples 5, 8, 17, 21, 30, 34, 35 and 36, by the inversion-recovery pulse sequence method with inversion delays from 0.001 to 50 s. The T1s found were less than 2.5 s (1.6–2.4) for all targeted protons of SC whereas the olefinic protons of DMM have the longest relaxation time (6.5 s). All <sup>1</sup>H resonances were thus considered as fully relaxed since more than 98% of the signal intensity of the proton with the longest T1 (6.5 s) was recovered in the recording conditions used (flip angle of 30° and relaxation delay of 9.04 s).

The linearity of the NMR assay was determined with samples of standard MAM-2201 at five concentrations ranging from 0.1 to 1.6 mg/mL in CDCl<sub>3</sub> which correspond to concentrations found in solutions of real samples. The method was linear with a correlation coefficient of 0.998 ( $y = 1.0211x + 0.0052$ ).

The accuracy of the NMR assay was measured with the MAM-2201 solution at 1.6 mg/mL ( $n = 10$ , each solution having been prepared independently). The mean percent recovery was  $102.4 \pm 2.3\%$  with a percentage relative standard deviation (% RSD) of 2.2%. For standard JWH-210 and UR-144 solutions at 1.5 mg/mL, the mean percent recoveries ( $n = 3$ ) were  $98.3 \pm 2.7\%$  and  $103.9 \pm 1.1\%$  with %RSD of 2.7 and 1.0% respectively.

From the LOD and LOQ values measured with solutions of standard MAM-2201 and UR-144, the LOD of SC in real samples was evaluated at 0.15 mg/g for a methyl signal leading to a singlet, 0.34 for an aromatic proton giving a singlet and 0.75 for an aromatic proton giving a doublet. For the same signals, the LOQs were 0.5, 1.0 and 2.5 mg/g respectively. These LOD and LOQ values were determined for signal-to-noise ratios (SNR) of 3 and 10, respectively, the SNR measured with the TopSpin software being [2.5 (peak height/noise height measured peak to peak)].

The precision of the assay of real samples was estimated from the triplicate solutions for each sample. Among the 52 quantifications of SC performed, 49 had a %RSD < 13% (10 with a %RSD < 5%, 36 with a %RSD comprised between 5% and 10%, and 3 with a %RSD between 10% and 13%) and 3 had a %RSD around 30%.

### 2.3.2. LF NMR analysis

Spectra were acquired on a Pulsar<sup>™</sup> benchtop NMR spectrometer (Oxford Instruments, Abingdon, UK) operating at a frequency of 59.7 MHz for <sup>1</sup>H. The temperature inside the spectrometer was 310 K. The acquisition was performed by using the SpinFlow 1.2.0.1 software (Oxford Instruments) while the processing was done in MNova 11.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela,

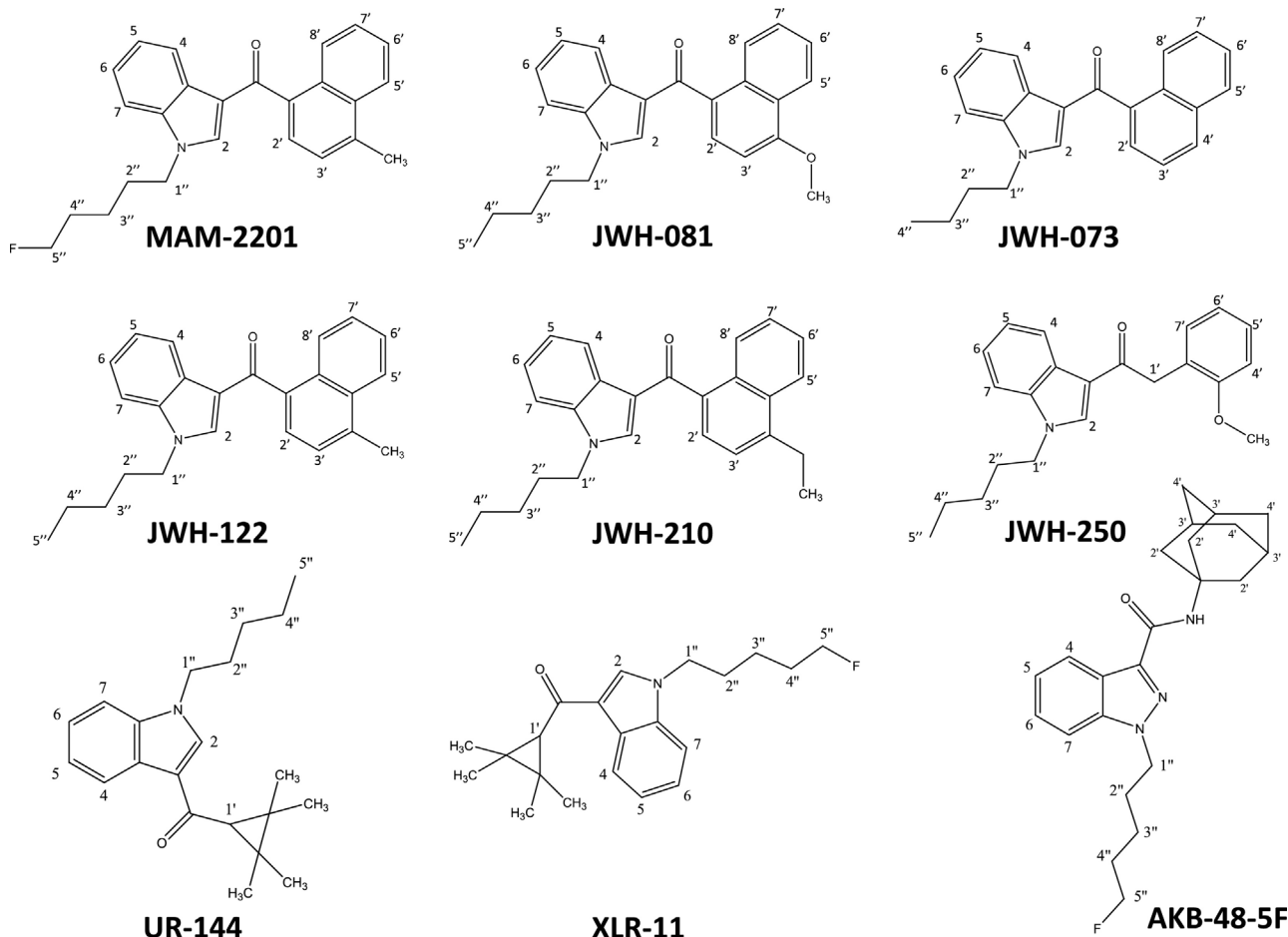


Fig. 1. Chemical structures of the synthetic cannabinoids identified in the herbal spices analyzed.

Spain). Thirteen representative samples (2, 8, 12, 15, 22, 24, 28, 29, 30, 33, 34, 37 and 38) were analysed. FID were recorded with a flip angle of  $90^\circ$ , a spectral width of 5208.6 Hz, and 8 K complex points (acquisition time of 1.57 s). The relaxation delay was set at 2 s, and 128 transients were recorded leading to a total acquisition time of 7.6 min. For the data processing, the FIDs were apodized with an exponential (0.3 Hz) filter and Whittaker smoother for baseline correction has been applied. The number of points was increased to 64 K in the Fourier transform spectra.

For the comparison of HF and LF profiling, the HF  $^1\text{H}$  NMR spectrum was recorded with the following parameters: NS 16, flip angle  $90^\circ$ , acquisition time 2.04 s, spectral width 16 ppm, 32 K data points and relaxation delay 1.53 s. The recording time was thus of ca. 1 min. The SNR was estimated using the SNR peak calculator tool included in the MNova software for both HF and LF data.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. HF NMR experiments

A simple extraction procedure compatible with direct NMR detection and quantification of SC in herbal mixtures was developed. It consists in a ca. 30 min extraction step in  $\text{CDCl}_3$  followed by 10 min of NMR recording. The same recording conditions were applied for obtaining both qualitative and quantitative data. However if only qualitative information is sufficient, the flip angle can be increased and the relaxation delay shortened leading to get a spectrum with a good SNR in ca. 1 min.

Nine SC, whose structures with the numbering of protons are reported in Fig. 1, were found in the 41 samples analyzed in this study: MAM-2201, JWH-073, JWH-210, JWH-122, JWH-081, JWH-250, UR-144, XLR-11 and AKB-48-5F. Some typical spectra are illustrated in Figs. 2 and 3. The chemical shifts are referenced to the signal of residual  $\text{CHCl}_3$  at 7.26 ppm.  $\text{H}_2\text{O}$  is detected by its characteristic signal at 1.56 ppm. The internal standard (DMM) added as a quantitative reference gives two signals at 6.26 and 3.80 ppm. The main signal arising from the natural herbal matrix is observed at 1.25 ppm and corresponds to the methylene groups of fatty acids that naturally occur in most plants, the other signals being very minor and overlapped with the intense signals of the SC. Protons from aromatic, naphthyl, indole and indazole rings resonate in the range 7.2–8.5 ppm and those from methylenic groups adjacent to the nitrogen atom of the indole ring or to fluorine atom appear deshielded at ca. 4 ppm. In the last case, the methylene group gives a characteristic splitting as a triplet of doublet due to the additional  $^2J$  coupling with the fluorine nucleus besides the  $^3J_{\text{HH}}$  with the neighbor methylene. In the upfield region between 0.8 and 2.1 ppm are detected singlets of the methyl groups linked to the cyclopropyl ring in UR-144 or XLR-11 as well as signals corresponding to protons 2'' to 5'' of the alkyl chain. Complete  $^1\text{H}$  assignments for all SC are reported in Table 1. NMR characteristics are in accordance with previous published data [1,7,9,17,26]. A thorough examination of the 7.8–8.7 ppm area of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of spice samples allows to distinguish typical protons of some SC depending on their structures. For example, the signals of the protons of the alkyl chain on the indole ring for

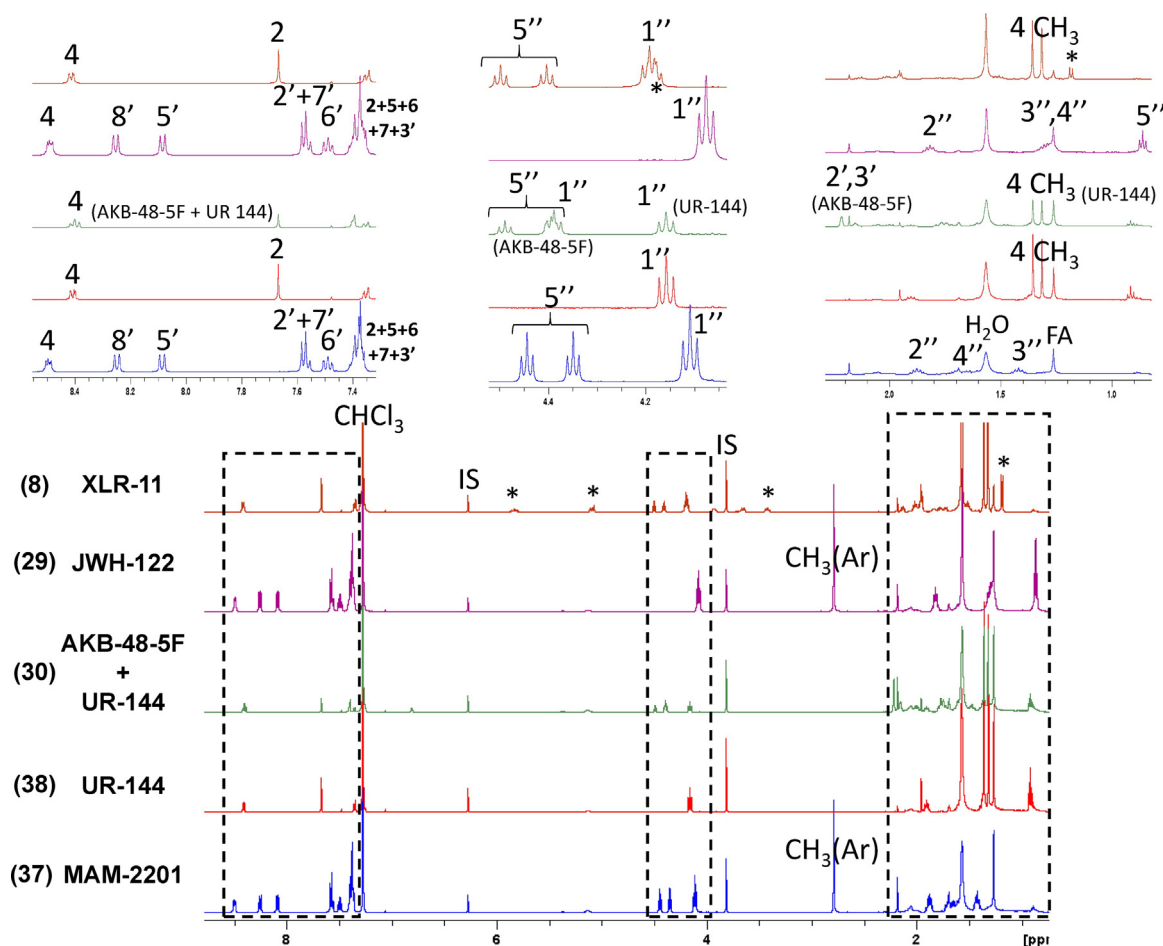


Fig. 2. Characteristic  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded at 500 MHz of five spice samples in  $\text{CDCl}_3$ . The numbering of protons is given in Fig. 1. IS: internal standard (dimethyl maleate); FA: fatty acids. \* signals of an impurity.

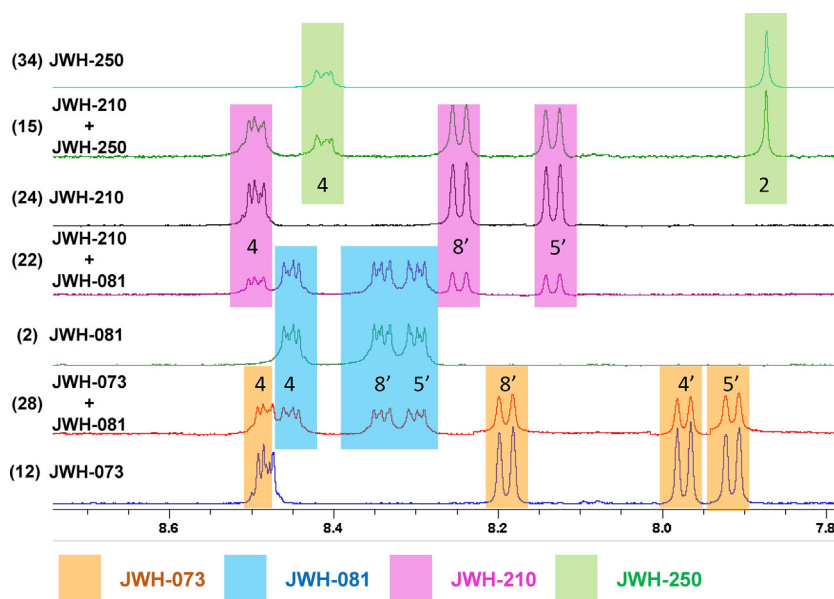


Fig. 3. Characteristic region (7.8–8.75 ppm) of the  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded at 500 MHz of seven spice samples in  $\text{CDCl}_3$ . The numbering of protons is given in Fig. 1.

**Table 2**  
Amounts of synthetic cannabinoids measured by high-field  $^1\text{H}$  NMR and additional compounds detected by GC-MS. Results are expressed as mg/g of spice  $\pm$  SD. All experiments were performed in triplicate. RSD were  $<13\%$  for all samples except for those indicated with \* for which RSD was  $\approx 30\%$ .

Sample	Amount mg/g									Additional SC detected by GC-MS
	MAM-2201	JWH-081	JWH-073	UR-144	JWH-122	JWH-250	JWH-210	AKB-48-5F	XLR-11	
1	81 $\pm$ 4				traces <sup>a</sup>					
2		87 $\pm$ 3								
3		59 $\pm$ 4	10 $\pm$ 1							
4			75 $\pm$ 4							JWH-200
5	86 $\pm$ 3									JWH-122
6			86 $\pm$ 5							
7					64 $\pm$ 5	traces <sup>a</sup>				
8					77 $\pm$ 8				55 $\pm$ 5	
9					72 $\pm$ 5					AB-001
10										JWH-251
11			79 $\pm$ 8							
12			75 $\pm$ 5							
13				110 $\pm$ 4						
14					72 $\pm$ 4					
15					traces <sup>a</sup>	22 $\pm$ 7*	59 $\pm$ 21*			
16					81 $\pm$ 4					
17		70 $\pm$ 7	12 $\pm$ 1							
18		87 $\pm$ 7								JWH-122
19		68 $\pm$ 5	11 $\pm$ 1							
20					85 $\pm$ 6	traces <sup>a</sup>				
21					79 $\pm$ 6					JWH-250
22		56 $\pm$ 3					26 $\pm$ 2			
23	106 $\pm$ 14*									JWH-073
24							83 $\pm$ 8			MAM-2201
25			96 $\pm$ 8							
26		40 $\pm$ 4	25 $\pm$ 2							
27			89 $\pm$ 3							
28		40 $\pm$ 3	41 $\pm$ 2							
29					130 $\pm$ 10					
30				25 $\pm$ 1				30 $\pm$ 2		
31							94 $\pm$ 6			
32		67 $\pm$ 5					34 $\pm$ 3			
33	107 $\pm$ 6									
34						104 $\pm$ 6				
35							95 $\pm$ 7			
36		45 $\pm$ 1						65 $\pm$ 3		
37	103 $\pm$ 3									
38				47 $\pm$ 4						
39		45 $\pm$ 1	40 $\pm$ 3							
40					38 $\pm$ 3					
41	35 $\pm$ 10*				traces <sup>a</sup>					

<sup>a</sup> These SC were detected by NMR but were under the limit of quantification.

JWH-081, JWH-210 and JWH-250 have very close chemical shifts whereas changes in chemical shifts are observed for naphthyl or phenyl protons (Table 1). Even when a sample contains a mixture of two SC, each product gives a typical spectral pattern (Fig. 3). The chemical shift variations possibly due to changes in concentration of SC or induced by the medium are weak and always lower than 0.9 Hz, the signal most sensitive to this change being that of H4.

It should be noted that the identification of SC by HF NMR is consistent with GC–MS data, i.e. the main SC identified were also detected in the previous analysis by GC–MS. However, in 8 samples, additional minor SC were observed with GC–MS but not with HF NMR (Table 2) because their concentrations were below the LOD of the method.

The amounts of SC measured in each spice sample by quantitative  $^1\text{H}$  NMR are reported in Table 2. Results are expressed in mg per gram of sample. Even if there are some overlapped signals, at least one characteristic signal for each SC (written in bold in Table 1) could be considered for quantification. The separate quantification of each SC was possible in the 11 spice samples containing two SC. The contents in SC vary between samples with values ranging from 35 to 130 mg/g and a mean value of  $83 \pm 21$  mg/g when the spice contained only one SC (30 samples) and  $81 \pm 15$  mg/g for the sum of the two SC in the corresponding 11 samples.

Our data are in the range of those published in previous studies on herbal spices. For example, Langer et al. [9] found SC concentrations from 72 to 303 mg/g in the 8 smoking blend samples they analysed by GC–MS, and Uchiyama et al. [17] 26–100 mg/g in the 20 products they quantified by LC–MS. Using NMR, Dunne et al. [19] measured concentrations from 13 to 84 mg/g in the 63 herbal blends quantified and Fowler et al. [18] 1.5–119 mg/g in the 12 spice products analysed. In agreement with these studies, it is not surprising to observe great variation in the contents of added banned SC.

### 3.2. LF NMR experiments

The ability of a compact benchtop NMR spectrometer for a rapid screening of the content of herbal blends was then explored. The sample preparation was kept as simple as possible with only one extraction step by 1 mL of  $\text{CDCl}_3$ .

Fig. 4 compares the spectra of the same solution of sample 33 containing MAM-2201 recorded in the same NMR tube at both 500 and 60 MHz. Decreasing the spectrometer magnetic field decreases the SNR per unit time, measured on the methyl signal at 2.78 ppm, by a factor of ca. 50 in our recording and processing conditions. As the coupling constants are independent of the magnetic field, the signals appeared much more spread in the spectrum at LF than at HF. For instance, the triplet of doublet (td) for the  $\text{CH}_2$  5'' of MAM-2201 is obvious at 500 MHz but cannot be as readily observed in the spectrum recorded at 60 MHz. Indeed, due to the high coupling constant with fluorine ( $J_{\text{H}5''\text{F}} = 47.3$  Hz), only the left part of the td is clearly visible at 4.78 ppm while the right part is overlapped with the triplet of  $\text{CH}_2$  1''. In the 500 MHz spectrum, the chemical shift region of the naphthyl and indole protons is rather clearly resolved which is not the case at 60 MHz. Indeed, the characteristic signals of protons 4, 8' and 5' are distinguishable at 500 MHz but are overlapped at 60 MHz. In both spectra, the methyl singlet at 2.78 ppm is isolated and easily detected. It thus appears that although the LF NMR spectrum is more crowded, characteristic signals of MAM-2201 can nevertheless be observed. This encouraging result led us to continue the evaluation of the herbal samples with the benchtop LF NMR spectrometer.

Thirteen representative samples were thus reanalyzed at 60 MHz. The LF  $^1\text{H}$  NMR data for characteristic signals of each SC are reported in Table 3 and the superimposition of characteristic parts of LF  $^1\text{H}$  NMR spectra from solutions of herbal samples containing only one SC with those of samples containing two SC is

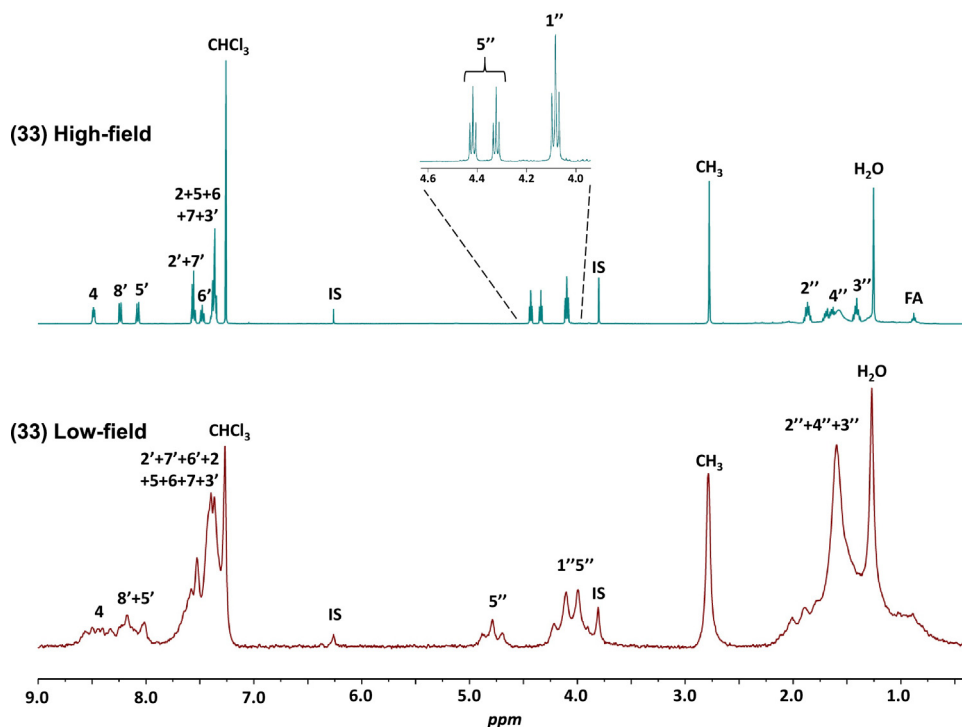
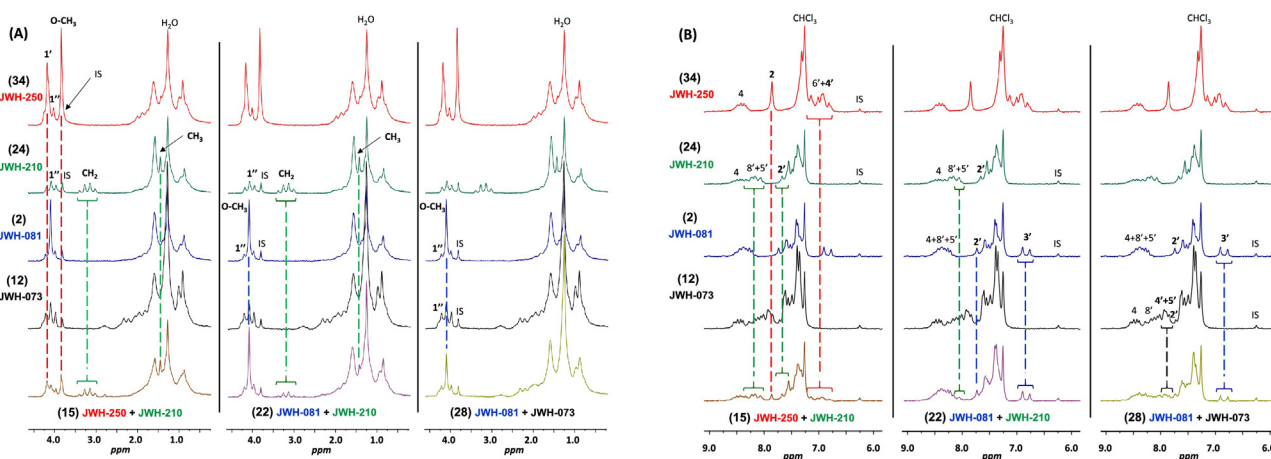


Fig. 4. Comparison of high-field (500 MHz) and low-field (60 MHz)  $^1\text{H}$  NMR spectra of sample 33 containing MAM-2201 in  $\text{CDCl}_3$ . The numbering of protons is given in Fig. 1. IS: internal standard (dimethyl maleate); FA: fatty acids.

**Table 3**Low-field  $^1\text{H}$  NMR (60 MHz) characteristic signals (in  $\text{CDCl}_3$ ) of synthetic cannabinoids detected in this study.

H label <sup>a</sup>	MAM-2201 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	JWH-081 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	JWH-073 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	JWH-122 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	JWH-210 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	JWH-250 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	UR-144 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	XLR-11 $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )	AKB-48-5F $\delta^b$ ( $M^c$ , $J^b$ )
2						7.87 (s)	7.66 (s)	7.66 (s)	
1''	4.10 (t, 6.8)	4.21 (lpt)	4.09 (t, 7.4)	4.07 (t, 7.1)	4.07 (t, 7.3)	4.14 (ct)	4.15 (t, 7.3)	4.18 (t, 6.9)	4.39 (t, 7.0)
5''	4.39 (td, 47.5; 5.6)							4.45 (td, 47.5; 5.6)	4.44 (td, 47.5; 5.7)
2'		7.75 (lpd)	7.73 (lpdd)		7.68 (lpd)				2.21 (s)
3'		6.84 (d, 7.9)							
4'						6.95 <sup>d</sup> (m)			
5'			7.90 (bm)						
8'	8.09 (m)			8.09 (m)					
1'						4.17 (s)	1.95 (s)	1.95 (s)	
CH <sub>2</sub>					3.20 (q, 7.4)				
CH <sub>3</sub>	2.78 (s)			2.78 (s)	1.45 (ct)		1.35 (s)	1.35 (s)	
O-CH <sub>3</sub>		4.09 (s)				3.83 (s)	1.32 (s)	1.32 (s)	
NH									6.79 (s)

NMR data were obtained from real samples spectra. Coupling constants are given only when measurable.

<sup>a</sup> See Fig. 1 for chemical structures and numbering.<sup>b</sup>  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz).<sup>c</sup> M: multiplicity; s: singlet; d: doublet; t: triplet; q: quadruplet; td: triplet of doublet; lpd: left part of doublet; lpdd: left part of doublet of doublet; ct: center of triplet; lpt: left part of triplet; m: multiplet; bm: broad multiplet.<sup>d</sup> Overlapped signal with 6'.**Fig. 5.** Superposition of characteristic parts of low-field  $^1\text{H}$  NMR spectra of samples 15, 22 and 28 containing two synthetic cannabinoids with those of samples 34, 24, 2 and 12 containing only one. (A) Zoom on the 0.5–4.5 ppm region; (B) Zoom on the 6.0–9.0 ppm region. IS: internal standard (dimethyl maleate).

illustrated in Fig. 5. For each compound studied, it is possible to find a signal or a couple of signals whose chemical shift and pattern are typical. For instance, the presence of JWH-250 in a mixture can be deduced from the two singlets at 4.17 and 7.87 ppm corresponding to the methyl signals from protons 1' and 2, respectively. The quadruplet at 3.20 ppm is typical of the presence of JWH-210 also confirmed by a complex pattern of protons 5' and 8' between 8.0 and 8.1 ppm. JWH-081 presents an association of three typical signals: a signal at 7.75 ppm which is the left part of the doublet of proton H2', a doublet at 6.84 ppm for the proton H3', and a singlet for the methoxy protons at 4.09 ppm. JWH 073 is more difficult to detect, the only characteristic signal being a complex multiplet at ca. 7.7–7.9 ppm for protons 4', 5' and 2'.

These results highlight that although a complete structural determination of SC is not possible with LF  $^1\text{H}$  NMR, the detection of some characteristic signals can efficiently reveal their presence in spice samples.

#### 4. Conclusion

In this study, we demonstrated that detection and quantification of SC in spice herbal blends can be readily performed with HF

$^1\text{H}$  NMR. The main advantage of NMR is that no specific standard for quantification is required and all compounds can be quantified with a sole internal reference. We also showed that LF NMR is a suitable method for a rapid screening of the herbal mixtures content as, after a very simple and rapid sample preparation, less than 8 min of NMR recording are sufficient to uncover the added SC. Even if HF NMR spectroscopy and/or mass spectrometric methods are required for their unambiguous structural identification, LF NMR experiments provide valuable clues on their chemical structure with the detection of some typical signals. The limits of LF NMR will be reached in the case of very complex mixtures, for example if several SC or a mixture of SC and other illicit drugs of different classes are present. In such cases, the method would permit the detection of unexpected substances but would not allow their precise identification. The fact that NMR is intrinsically an insensitive method is not a real limitation for the analysis of "spice-like" herbal mixtures because the concentration of at least one added SC is usually substantial. The recent commercialization of benchtop NMR spectrometers from different suppliers should thus contribute to generalize the use of LF NMR as a first rapid screening method for the analysis of herbal blends in which the presence of SC is suspected.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Corinne Routaboul, Killian Barry and Sébastien Guilbaud for their experimental help.

## References

- [1] R. Lindigkeit, A. Boehme, I. Eiserloh, M. Luebbecke, M. Wiggermann, L. Ernst, T. Beuerle, Spice: a never ending story? *Forensic Sci. Int.* 191 (1–3) (2009) 58–63.
- [2] Understanding the 'spice' phenomenon, <http://www.emcdda.europa.eu>.
- [3] J. Znalezionia, P. Ginterova, J. Petr, P. Ondra, I. Valka, J. Sevcik, J. Chrastina, V. Maier, Determination and identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques—a review, *Anal. Chim. Acta* 874 (2015) 11–25.
- [4] R. Denooz, J.C. Vanheugen, M. Frederich, P. de Tullio, C. Charlier, Identification and structural elucidation of four cannabimimetic compounds (RCS-4, AM-2201, JWH-203 and JWH-210) in seized products, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2) (2013) 56–63.
- [5] K. Simolka, R. Lindigkeit, H.M. Schiebel, U. Papke, L. Ernst, T. Beuerle, Analysis of synthetic cannabinoids in spice-like herbal highs: snapshot of the German market in summer 2011, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (1) (2012) 157–171.
- [6] S. Kneisel, F. Westphal, P. Bisel, V. Brecht, S. Broecker, V. Auwarter, Identification and structural characterization of the synthetic cannabinoid 3-(1-adamantoyl)-1-pentylindole as an additive in 'herbal incense', *J. Mass Spectrom.* 47 (2) (2012) 195–200.
- [7] L. Ernst, H.M. Schiebel, C. Theuring, R. Lindigkeit, T. Beuerle, Identification and characterization of JWH-122 used as new ingredient in spice-like herbal incenses, *Forensic Sci. Int.* 208 (1–3) (2011) e31–e35.
- [8] S. Dresen, N. Ferreiros, M. Putz, F. Westphal, R. Zimmermann, V. Auwarter, Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds, *J. Mass Spectrom.* 45 (10) (2010) 1186–1194.
- [9] N. Langer, R. Lindigkeit, H.M. Schiebel, L. Ernst, T. Beuerle, Identification and quantification of synthetic cannabinoids in 'spice-like' herbal mixtures: a snapshot of the German situation in the autumn of 2012, *Drug Test. Anal.* 6 (1–2) (2014) 59–71.
- [10] N. Langer, R. Lindigkeit, H.M. Schiebel, U. Papke, L. Ernst, T. Beuerle, Identification and quantification of synthetic cannabinoids in spice-like herbal mixtures: update of the German situation for the spring of 2015, *Forensic Toxicol.* 34 (1) (2016) 94–107.
- [11] J. Lobo Vicente, H. Chassaigne, M.V. Holland, F. Reniero, K. Kolar, S. Tirendi, I. Vandecasteele, I. Vinckier, C. Guillou, Systematic analytical characterization of new psychoactive substances: a case study, *Forensic Sci. Int.* 265 (2016) 107–115.
- [12] N. Langer, R. Lindigkeit, H.M. Schiebel, U. Papke, L. Ernst, T. Beuerle, Identification and quantification of synthetic cannabinoids in spice-like herbal mixtures: update of the German situation for the spring of 2016, *Forensic Sci. Int.* 269 (2016) 31–41.
- [13] M.A. Marino, B. Voyer, R.B. Cody, A.J. Dane, M. Veltri, L. Huang, Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal incenses with DART-MS and NMR, *J. Forensic Sci.* 61 (2016) S82–S91.
- [14] J. Nakajima, M. Takahashi, T. Seto, J. Suzuki, Identification and quantitation of cannabimimetic compound JWH-250 as an adulterant in products obtained via the internet, *Forensic Toxicol.* 29 (1) (2010) 51–55.
- [15] L. Ernst, K. Kruger, R. Lindigkeit, H.M. Schiebel, T. Beuerle, Synthetic cannabinoids in spice-like herbal blends: first appearance of JWH-307 and recurrence of JWH-018 on the German market, *Forensic Sci. Int.* 222 (1–3) (2012) 216–222.
- [16] B.K. Logan, L.E. Reinhold, A. Xu, F.X. Diamond, Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States, *J. Forensic Sci.* 57 (5) (2012) 1168–1180.
- [17] N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda, Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products, *Forensic Toxicol.* 29 (1) (2010) 25–37.
- [18] S.J. Dunne, J.P. Rosengren-Holmberg, Quantification of synthetic cannabinoids in herbal smoking blends using NMR, *Drug Test. Anal.* 9 (5) (2017) 734–743, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/dta.2032>.
- [19] F. Fowler, B. Voyer, M. Marino, J. Finzel, M. Veltri, N.M. Wachter, L. Huang, Rapid screening and quantification of synthetic cannabinoids in herbal products with NMR spectroscopic methods, *Anal. Methods* 7 (2015) 7907–7916.
- [20] T. Parker, E. Limer, A.D. Watson, M. Defernez, D. Williamson, E.K. Kemsley, 60 MHz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for the analysis of edible oils, *Trends Anal. Chem.* 57 (100) (2014) 147–158.
- [21] W. Jakes, A. Gerdova, M. Defernez, A.D. Watson, C. McCallum, E. Limer, I.J. Colquhoun, D.C. Williamson, E.K. Kemsley, Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, *Food Chem.* 175 (2015) 1–9.
- [22] G. Pages, A. Gerdova, D. Williamson, V. Gilard, R. Martino, M. Malet-Martino, Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field H-1 NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances, *Anal. Chem.* 86 (23) (2014) 11897–11904.
- [23] <http://www.process-nmr.com/WordPress/?p=443>. (Accessed 26 July 2017).
- [24] K. Singh, B. Blümich, Desktop NMR spectroscopy for quality control of raw rubber, *Macromol. Symp.* 365 (1) (2016) 191–193.
- [25] <https://www.caymanchem.com>. (Accessed 26 July 2017).
- [26] <http://www.swgdrug.org/>. (Accessed 26 July 2017).



## RMN haut champ et bas champ pour l'analyse de produits de santé

L'objectif de ces travaux a été de démontrer l'intérêt d'appliquer la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à des problématiques analytiques dans le domaine des produits de santé. Deux axes principaux ont été abordés.

Le premier cible principalement les compléments alimentaires adultérés. Les études ont été menées par RMN à haut champ. Diverses expériences de RMN mono et bidimensionnelles ont permis de mettre en évidence la présence illicite, dans des compléments alimentaires déclarés comme naturels, de médicaments à visée érectile et/ou de leurs analogues structuraux. Ces substances actives peuvent induire, à l'insu du consommateur, des risques importants pour sa santé. De plus, des analyses menées par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont permis de révéler des cas d'adultération de compléments alimentaires pour sportifs par des substances considérées comme dopantes par la réglementation en vigueur.

Le second axe a été mené en explorant les potentialités de la RMN à bas champ pour l'analyse de médicaments. Cette technique, moins onéreuse et plus adaptée à des analyses de routine que la RMN à haut champ, s'est avérée très efficace pour mettre en évidence des cas de médicaments falsifiés par de simples expériences RMN  $^1\text{H}$  monodimensionnelles. Des expériences bidimensionnelles de diffusion (DOSY : Diffusion Ordered SpectroscopY), qui permettent d'obtenir la séparation virtuelle des constituants d'un mélange complexe, ont été mises au point et appliquées, pour la première fois, à la dé-formulation d'un médicament.

**Mots clés :** RMN haut champ, RMN bas champ, DOSY, médicaments falsifiés, compléments alimentaires, adultération.

## Low and High Field NMR for the analysis of health products

The purpose of this research was to demonstrate the interest of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to deal with analytical issues in the field of health products. The studies focused on two main axes.

The first one targeted adulterated dietary supplements and the studies were conducted with high-field NMR. Various mono and bidimensional experiments revealed the illegal presence in dietary supplements claimed as natural, of erectile drugs and/or their structural analogues. These active substances can induce, without the consumer's knowledge, significant risks to his health. Moreover, analyses conducted with  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, highlighted cases of adulteration of dietary supplements for exercise and athletic performance with doping substances.

The second axis explored the potential of low-field NMR for drug analysis. This technique, which is less expensive and more suitable for routine analyses than high-field NMR, has proved very effective in detecting cases of falsified medicines by simple one-dimensional  $^1\text{H}$  NMR experiments. Two-dimensional diffusion experiments (DOSY: Diffusion Ordered Spectroscopy), which provide virtual separation of the constituents of a complex mixture, were developed and applied for the first time to the de-formulation of a drug.

**Key words:** high-field NMR, low-field NMR, DOSY, falsified medicines, dietary supplements, adulteration.