



**HAL**  
open science

# Outils analytiques dédiés aux Cyclodextrines : de l'analyse des complexes d'inclusion à la caractérisation d'isomères

Sébastien Rigaud

► **To cite this version:**

Sébastien Rigaud. Outils analytiques dédiés aux Cyclodextrines : de l'analyse des complexes d'inclusion à la caractérisation d'isomères. Chimie analytique. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0052 . tel-04079616

**HAL Id: tel-04079616**

**<https://theses.hal.science/tel-04079616>**

Submitted on 24 Apr 2023

**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 de Doctorat

*Mention Chimie*  
*Spécialité Chimie théorique, physique, analytique*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

**Sébastien Rigaud**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Outils analytiques dédiés aux Cyclodextrines : de l'analyse des complexes d'inclusion à la caractérisation d'isomères***

Soutenue le 05 décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M<sup>me</sup> Nathalie Azaroual, Professeure, Université de Lille  
M. François Estour, Professeur, Université de Rouen  
M<sup>me</sup> Kawthar Bouchemal, Professeure, ENS Chimie Paris  
M. Serge Pilard, Ingénieur de Recherche – HDR, UPJV  
M<sup>me</sup> Florence Djedaïni-Pilard, Professeure, UPJV  
M. Frédéric Marçon, MCU – PH, UPJV

Rapporteuse  
Rapporteur  
Présidente  
Examineur  
Directrice de thèse  
Co-encadrant





# Remerciements

Je remercie le Conseil Régional des Hauts de France et l'Université de Picardie Jules Verne pour avoir financé ce projet de thèse. J'adresse également mes remerciements au professeur José Kovensky, *directeur du Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources (LG2A)*, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire.

Je souhaite remercier Nathalie Azaroual, *professeure de l'Université de Lille (laboratoire GRITA)*, et François Estour, *professeur à l'Université de Rouen Normandie (laboratoire COBRA)*, pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse. J'adresse également mes remerciements à Kawthar Bouchemal, *professeure à l'Ecole Normale Supérieure (ENS Chimie Paris)*, et à Serge Pilard, *Ingénieur de recherche à la plateforme analytique de l'UPJV* pour avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à mes encadrants, Florence Djedaïni-Pilard, *professeure au laboratoire LG2A*, et Frédéric Marçon, *MCU-PH au laboratoire AGIR*, pour leur pédagogie remarquable sur le plan scientifique et humain, leur confiance, leur objectivité et leur bienveillance constante. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance pour ces trois années.

Je tiens à remercier Serge Pilard, d'une part pour m'avoir donné l'envie de me lancer dans cette aventure, et d'autre part pour m'avoir offert un cadre de travail idéal par sa confiance concernant l'exploitation des appareils présents à la PFA. Je remercie également David Mathiron, *ingénieur d'étude à la PFA*, pour m'avoir apporté un soutien sans faille à travers le partage de son expérience. Je remercie également Dominique Cailleu, *ingénieur de recherche à la PFA*, pour sa disponibilité et nos échanges concernant la RMN.

Je souhaite également remercier les différentes personnes ayant contribué à ces travaux de thèse, notamment David Landy, *professeur de l'Université du Littoral Côte d'Opale (laboratoire UCEIV)*, Christine Cézard, *maître de conférence au LG2A*, ainsi que Xavier Trivelli et François-Xavier Cantrelle, *ingénieurs de recherche à l'Université de Lille (Institut Chevreul, pôle RMN)*. Ce fût un réel plaisir de pouvoir collaborer et échanger sur ce sujet de thèse. Merci aux étudiants de l'ULCO et leur accueil lors de mon séjour à Dunkerque. Je remercie David Lesur, *ingénieur d'étude au LG2A*, et Roland Moliné, *maître de conférence à BIOPI*, pour leur aide concernant respectivement la purification et les analyses multivariées.

Plus généralement, je souhaite remercier tous les membres du LG2A, d'AGIR et du bâtiment Serres-Transfert pour leur accueil et leur gentillesse. Je remercie particulièrement les doctorants du LG2A avec qui j'ai partagé ma dernière année de thèse, ils ont été un soutien précieux. Je tiens également à remercier mes proches, qui se reconnaîtront, à qui je dois la réussite de ces études.





# Sommaire

<b>Introduction Générale</b> .....	<b>11</b>
<b>I. Etude Bibliographique</b> .....	<b>15</b>
<b>I.1. Partie 1 : Les cyclodextrines</b> .....	<b>17</b>
I.1.1. Généralités .....	17
I.1.2. Les complexes d'inclusion .....	20
I.1.3. Application au domaine pharmaceutique .....	23
I.1.3.1. Toxicité des CDs .....	23
I.1.3.2. Intérêts pharmaceutiques des CDs .....	25
I.1.3.2.1. Effet protecteur des CDs.....	25
I.1.3.2.2. Effet sur la solubilité et la biodisponibilité .....	27
I.1.3.2.3. Effet sur le goût des substances actives (SAs) .....	29
I.1.4. Caractérisation des complexes .....	31
I.1.4.1. Caractérisation des complexes en phase solide.....	31
I.1.4.2. Caractérisation des complexes en phase liquide .....	33
I.1.4.2.1. Techniques d'analyses des complexes d'inclusion en phase liquide.....	34
I.1.4.2.1.1. Techniques spectroscopiques .....	34
I.1.4.2.1.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	35
I.1.4.2.1.3. Titration calorimétrique isotherme (ITC) .....	39
I.1.4.2.2. Méthodes développées pour l'analyse des complexes d'inclusion .....	41
I.1.4.2.2.1. Diagrammes de solubilité de phase .....	41
I.1.4.2.2.1. Constante d'association et stœchiométrie des complexes .....	44
I.1.4.3. Caractérisation des complexes par spectrométrie de masse (phase gazeuse).....	48
I.1.4.3.1. Observation des complexes d'inclusion en phase gazeuse .....	48
I.1.4.3.2. Les techniques de dissociation .....	49
I.1.4.3.3. La mobilité ionique .....	51
I.1.5. Conclusion .....	53
<b>I.2. Partie 2 : Analyse des cyclodextrines</b> .....	<b>55</b>
I.2.1. Analyse des CDs purifiées .....	55
I.2.1.1. Analyse des CDs naturelles .....	55
I.2.1.2. Analyse des CDs modifiées sélectivement .....	60
I.2.2. Analyse des CDs en mélange, modifiées non-sélectivement .....	63
I.2.2.1. Analyse par RMN.....	64
I.2.2.2. Analyse par des techniques séparatives .....	67
I.2.2.3. Analyse par spectrométrie de masse .....	71
I.2.2.3.1. Analyse directe .....	71
I.2.2.3.2. Couplage à une méthode séparative .....	73

# Sommaire

I.2.3. Conclusion .....	76
<b>II. Résultats et discussion .....</b>	<b>77</b>
<b>II.1. Apport des cyclodextrines à une formulation orale liquide du carvedilol .....</b>	<b>79</b>
II.1.1. Introduction.....	79
II.1.2. Solubilité en milieu aqueux .....	81
II.1.2.1. Méthode de préparation des échantillons.....	81
II.1.2.2. Choix de la méthode de dosage du carvedilol .....	84
II.1.2.3. Essais préliminaires de milieux en absence de CDs .....	87
II.1.2.4. Apport des CDs sur la solubilité du carvedilol .....	90
II.1.2.4.1. Comparaison de l'effet solubilisant des CDs.....	90
II.1.2.4.2. Diagrammes de solubilité de phase.....	93
II.1.3. Etude des interactions CDs-Carvedilol .....	99
II.1.3.1. Auto-association du carvedilol.....	99
II.1.3.2. Analyse du complexe carvedilol/CD.....	106
II.1.3.2.1. Caractérisation des complexes par RMN.....	106
II.1.3.2.2. Détermination des paramètres thermodynamiques par ITC.....	122
II.1.3.2.3. Analyse des complexes par MS.....	127
II.1.4. Photostabilité en présence de $\gamma$ CD ou de RAMEB.....	132
II.1.4.1. Dosage de la teneur en carvedilol.....	132
II.1.4.2. Analyses des produits de dégradation (UHPLC-UV-HRMS) à M9.....	135
II.1.4.2.1. Analyse des phases liquide et solide .....	135
II.1.4.2.2. Identification des masses et hypothèses de structures des produits de dégradation .....	143
II.1.5. Conclusion .....	152
<b>II.2. Mise en place d'une approche de caractérisation des mélanges de dérivés de CDs.....</b>	<b>155</b>
II.2.1. Introduction.....	155
II.2.2. Etude expérimentale par le couplage UHPLC-IMS-MS/HRMS.....	156
II.2.2.1. Le modèle des Lip $\beta$ CD .....	156
II.2.2.2. Chromatographie liquide (UHPLC) .....	157
II.2.2.3. La fragmentation MS/HRMS .....	159
II.2.2.4. La mobilité ionique (IMS) .....	163
II.2.3. Etude théorique par modélisation moléculaire.....	164
II.2.3.1. Génération des structures et des CCS théoriques .....	164
II.2.3.2. Attribution des isomères de position sur la $\beta$ CD .....	167
II.2.4. Validation de la méthode : des conditions expérimentales à l'attribution .....	171
II.2.4.1. Purification des isomères .....	171

# Sommaire

II.2.4.2. Validation des conditions expérimentales : Influence de la nature du solvant sur la mobilité ionique .....	173
II.2.4.3. Validation de l'attribution par RMN.....	182
II.2.4.3.1. Similarités des spectres RMN <sup>1</sup> H.....	182
II.2.4.3.2. Identifications des signaux et attribution des régioisomères.....	184
II.2.5. Caractérisation approfondie : Positions de greffage et conformations .....	190
II.2.5.1. Position de greffage sur l'oléate de méthyl .....	190
II.2.5.2. Conformations 3D des isomères de LipβCD et si .....	193
II.2.5.2.1. Etudes des constantes de couplage.....	193
II.2.5.2.2. Analyses conformationnelles par ROESY .....	198
II.2.5.2.3. Structures théoriques représentatives .....	201
II.2.6. Conclusion .....	204
<b>III. Partie Expérimentale.....</b>	<b>207</b>
<b>III.1. Apport des cyclodextrines à une formulation orale liquide du carvédilol .....</b>	<b>209</b>
<b>III.2. Mise en place d'une approche de caractérisation des mélanges de dérivés de CDs.....</b>	<b>213</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>219</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>225</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>241</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>244</b>
<b>Annexe 3 .....</b>	<b>246</b>
<b>Annexe 4 .....</b>	<b>249</b>



# Liste des abréviations

<b>AA</b> : Acide Aminé	<b>HRMS</b> : High Resolution Mass Spectrometry
<b>ACN</b> : Acétonitrile	<b>HSQC</b> : Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>ACP</b> : Analyse en Composantes Principales	<b>ICH</b> : International Council for Harmonisation
<b>APCI</b> : Atmospheric Pressure Chemical Ionization	<b>IMS</b> : Ion Mobility Spectrometry
<b>BCS</b> : Biopharmaceutics Classification System	<b>IR</b> : Infra-Rouge
<b>BPI</b> : Based Peak Intensity	<b>ITC</b> : Isothermal Titration Calorimetry
<b>CCS</b> : Collision Cross Section (Section efficace de collision)	<b>IV</b> : Intra-Veineuse
<b>CD(s)</b> : Cyclodextrine(s)	<b>LC</b> : Liquid Chromatography
<b>CE</b> : Efficacité de Complexation	<b>Lip<math>\beta</math>CD</b> : Lipidyl $\beta$ -Cyclodextrine
<b>CID</b> : Collision Induced Dissociation	<b>m/z</b> : Rapport masse/charge
<b>CMC</b> : Concentration Micellaire Critique	<b>MALDI</b> : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
<b>COSY</b> : COrelated Spectroscopy	<b>Me</b> : Méthyle
<b>CP</b> : Composante Principale	<b>Me(<math>\alpha\beta\gamma</math>)CD</b> : Méthyle-( $\alpha\beta\gamma$ )-Cyclodextrine
<b>CRYSMEB</b> : $\beta$ -Cyclodextrine faiblement méthylée	<b>MEB</b> : Microscopie Electronique à Balayage
<b>DEDL</b> : Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière	<b>MS</b> : Spectrométrie de Masse
<b>DEPT</b> : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	<b>NOE</b> : Nuclear Overhauser Effect
<b>DIMEB</b> : Dimethylated $\beta$ CD (heptakis-(2, 6 di-O-méthyl)- $\beta$ -Cyclodextrine)	<b>NOESY</b> : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>DL50</b> : Dose Létale (50%)	<b>PA</b> : Projection Approximation
<b>DMSO</b> : DiMethylSulfOxyde	<b>PE</b> : Pharmacopée Européenne
<b>DOSY</b> : Diffusion Ordered Spectroscopy	<b>PVDF</b> : PolyVinylidene Fluoride
<b>DP</b> : Produits de dégradation	<b>RAMEB</b> : Randomly Methylated $\beta$ -Cyclodextrine
<b>DRX</b> : Diffracton des Rayons X	<b>rg</b> : rayon de giration
<b>DS</b> : Degré de Substitution	<b>RIC</b> : Courant Ionique Reconstitué
<b>DSC</b> : Differential Scanning Calorimetry	<b>RMN</b> : Résonance Magnétique Nucléaire
<b>Dt</b> : Drift time (Temps de de dérive)	<b>ROE</b> : Rotating-frame Overhauser Effect
<b>DTIMS</b> : Drift Tube Ion Mobility Spectrometry	<b>ROESY</b> : Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
<b>ECD</b> : Electron Collision Dissociation	<b>SA(s)</b> : Substance(s) Active(s)
<b>ESI</b> : Electrospray Ionization	<b>SBE(<math>\alpha\beta\gamma</math>)CD</b> : Suflobutyléther-( $\alpha\beta\gamma$ )-Cyclodextrine
<b>FDA</b> : Food and Drug Administration	<b>SP</b> : Spironolactone
<b>FIA</b> : Flow Injection Analysis	<b>t<math>_{1/2}</math></b> : Temps de demi-vie
<b>FTIR</b> : Fourier-Transform Infrared Spectroscopy	<b>TIMS</b> : Trapped Ion Mobility Spectroscopy
<b>FWHM</b> : Full Width at Half Maximum	<b>TM</b> : Trajectory Method
<b>GC</b> : Chromatographie Gazeuse	<b>TOCSY</b> : TOtal Correlation Spectroscopy
<b>Glc</b> : Glucose	<b>TRIMEB</b> : Trimethylated $\beta$ -Cyclodextrine
<b>HCD</b> : High Collision Dissociation	<b>TWIMS</b> : Travelling Wave Ion Mobility Spectroscopy
<b>HILIC</b> : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	<b>UHPLC</b> : Ultra High Performance Liquid Chromatography
<b>HMBC</b> : Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	<b>uma</b> : Unité de masse atomique
<b>HP</b> : Hydroxypropyle	<b>USP</b> : United States Phamarmacopeia
<b>HP(<math>\alpha\beta\gamma</math>)CD</b> : Hydroxypropyle-( $\alpha\beta\gamma$ )-Cyclodextrine	<b>UV</b> : Ultra-Violet
<b>HPLC</b> : High Performance Liquid Chromatography	<b><math>\delta</math></b> : Déplacement chimique (RMN)



# **Introduction Générale**





Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques, naturels et connus pour leur capacité à encapsuler des molécules ou groupements plus petits de nature hydrophobe. Leur face externe hydrophile et leur cavité hydrophobe permettent la formation de cet équilibre dynamique dans l'eau, pouvant générer des effets bénéfiques sur le composé inclus en terme de solubilité aqueuse, de stabilité, de biodisponibilité ou de propriétés organoleptiques. Ces modulations de propriétés physico-chimiques intéressent de nombreux domaines d'application et particulièrement le secteur pharmaceutique. Déterminées comme étant peu toxiques, les CDs sont en partie autorisées par différentes pharmacopées, facilitant leur utilisation au sein de formulations pharmaceutiques. Parallèlement, l'Agence européenne des médicaments a reporté un manque de développement de formulations pharmaceutiques à destination pédiatrique, une cible nécessitant pourtant des précautions particulières. Parmi les formes galéniques appropriées, les solutions buvables représentent un des moyens d'administration les plus acceptables. De nombreuses substances actives ne disposent d'aucune spécialité commerciale adaptée à l'enfant, menant à l'utilisation de spécialités en dehors de leur autorisation de mise sur le marché (hors-AMM). L'utilisation de spécialités hors-AMM peut générer des effets indésirables, parfois toxiques, en raison des excipients utilisés ou des paramètres pharmacocinétiques méconnus. Regroupées dans les European Pediatric Needs, certaines substances actives concernées sont classées II et IV, selon le système de classification biopharmaceutique (BCS), indiquant leur faible solubilité. Cette faible solubilité peut être un facteur limitant à une bonne biodisponibilité orale.

Largement étudiées afin de pallier spécifiquement ces limites de solubilité et de biodisponibilité, les CDs apparaissent comme étant des excipients intéressants pour la formulation de solutions buvables à destination pédiatrique. Néanmoins, leur utilisation peut parfois générer les effets opposés de ceux recherchés, comme la formation de complexes insolubles ou la dégradation accélérée de la substance incluse. Dans ce contexte, la caractérisation détaillée des phénomènes impliqués dans les mécanismes d'inclusion représente une composante de recherche importante lors du développement de nouvelles formulations à base de CDs. Que les effets observés soient favorables à leur utilisation ou non, la compréhension des paramètres structuraux et physico-chimiques responsables offre une meilleure appréhension des adéquations structurales générant les effets recherchés. Les géométries d'inclusion, leurs stœchiométries et leurs constantes d'inclusion sont autant de paramètres descriptifs dont la détermination permet d'orienter les recherches applicatives.

Afin d'améliorer leurs propriétés de solubilisation ou de vectorisation, la modification chimique des CDs naturelles a mené à l'utilisation de différents dérivés plus intéressants pour répondre à ces objectifs de formulations. Pour des raisons de coûts de production principalement, ces dérivés de CDs sont le plus souvent obtenus sous forme de mélange par des synthèses non-sélectives. Certains de ces

mélanges, tels que l'HP $\beta$ CD (Hydroxypropyl- $\beta$ CD) et la SBE $\beta$ CD (Sulfobutylether- $\beta$ CD), sont d'ores et déjà autorisés par certaines pharmacopées. D'un point de vue applicatif, ces dérivés sont plus efficaces car ils sont intrinsèquement plus solubles dans l'eau, possèdent une affinité membranaire supérieure et des groupements à l'origine d'interactions plus nombreuses avec les substances actives. Néanmoins, leur voie de synthèse non-sélective génère une hétérogénéité de structures, en terme de degré de substitution (DS) et d'isomérisation, rendant la caractérisation de ces mélanges particulièrement délicate. Pourtant, la nature des composants de ces mélanges a une influence directe sur leur efficacité, en lien avec des propriétés physico-chimiques dépendantes de leurs structures. De plus, la méconnaissance de ces compositions accentue la difficulté de caractérisation des interactions avec les substances incluses, et donc la compréhension des mécanismes impliqués.

Afin de répondre aux différentes problématiques exposées, ces travaux de thèse seront articulés en deux parties. D'une part, pour répondre à la problématique du manque de formulation pédiatrique, l'apport des CDs au carvédilol, une substance active classée BCS II (Biopharmaceutics Classification System), sera étudié. Cette substance active est intéressante de par sa présence dans les European Pediatric Needs, son utilisation recommandée chez l'enfant pour les insuffisances cardiaques d'origine cardiomyopathique, sa faible solubilité aqueuse et sa faible biodisponibilité qui en découle. De plus, son caractère racémique, la présence de plusieurs sites aromatiques distants et sa basicité font de cette structure un modèle en terme de caractérisation des interactions avec les CDs. Pour ces raisons, le carvédilol regroupe un intérêt autant applicatif que fondamental, c'est pourquoi son étude sera développée en détail dans le premier chapitre de ce manuscrit. D'autre part, le second chapitre sera consacré au développement d'une approche analytique visant à améliorer le niveau de caractérisation des mélanges de CDs. L'apport de la mobilité ionique couplée à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse sera étudié. Pour cela, un mélange de dérivés amphiphiles, obtenu par une synthèse non-sélective précédemment développée au laboratoire, sera utilisé comme modèle. L'objectif de ce chapitre sera d'évaluer le niveau de caractérisation atteignable par l'analyse de ce mélange, sans étape de purification.

# **I. Etude Bibliographique**



## I.1. Partie 1 : Les cyclodextrines

### I.1.1. Généralités

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques, naturellement issus de la dégradation de l'amidon par voie enzymatique et découvertes pour la première fois en 1891 par Villiers, sans détermination de leur structure [1]. Composées de 6, 7 ou 8 unités glucosidiques liées en  $\alpha(1\rightarrow4)$ , respectivement nommées  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD ou  $\gamma$ CD, la structure de ces molécules a été identifiée en 1911 ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD) et 1948 ( $\gamma$ CD) par Schardinger et Cramer, respectivement [2,3]. C'est en 1950 que leur structure cyclique a été démontrée à travers l'analyse des cristaux par diffraction de rayon-X, menant à l'appellation de « cycloamylose » qui deviendra « cyclodextrine » quelques années plus tard [4]. La conformation des CDs a ensuite été investiguée, mettant en évidence une conformation chaise  ${}^4C_1$  des unités glucopyranose, induisant une géométrie particulière. En effet, les contraintes stériques générées par cette conformation  ${}^4C_1$  associées aux liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  imposent aux CDs l'adoption d'une forme de cône tronqué. Cette conformation globale est en grande partie stabilisée par la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les OH portés en C2 et ceux portés en C3 de l'unité glucosidique adjacente. Il est à noter que la structure cristalline de la  $\beta$ CD suppose également l'implication des groupements  $CH_2$  et de l'oxygène inter-glycosidique O4 dans la formation de liaisons hydrogènes moins énergétiques [5,6]. Les groupements alcool sont donc orientés vers l'extérieur de la cavité, ce qui entraîne une hydrophilie de la partie externe et une hydrophobicité de l'intérieur de la cavité (Schéma 1). Cette orientation des groupements polaires (OH) vers l'extérieur et les groupements apolaires (CH) vers l'intérieur de la cavité confère aux CDs une certaine solubilité aqueuse tout en conservant un espace interne hydrophobe.

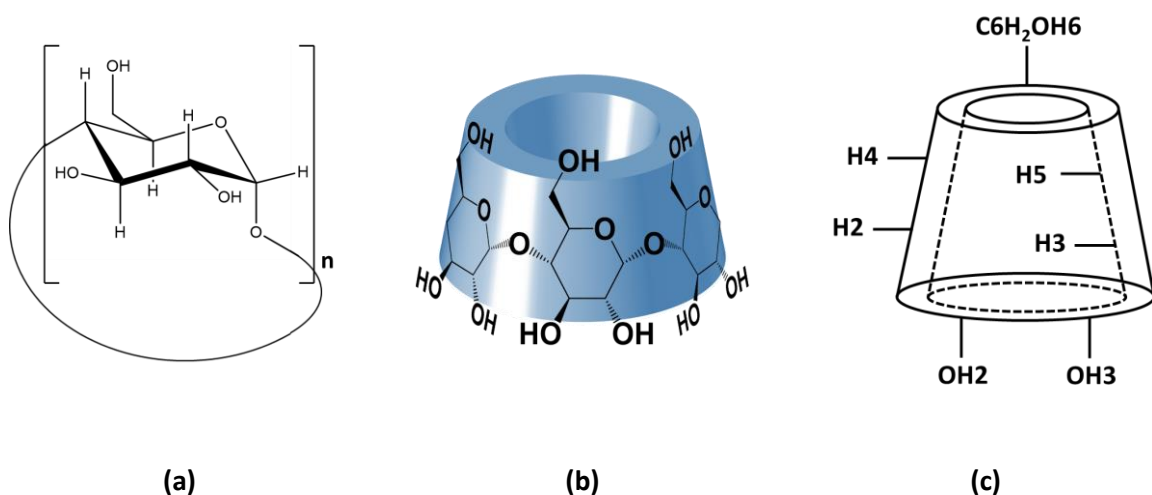


Schéma 1: (a) Structure générale des cyclodextrines naturelles avec  $n = 6, 7, 8$  correspondant respectivement à l' $\alpha$ CD, la  $\beta$ CD et le  $\gamma$ CD. (b) Représentations schématiques de la structure tridimensionnelle des CDs naturelles. (c) Orientation schématique des différents groupements.

Néanmoins, la différence du nombre d'unités glucopyranoses entre les CDs induit des différences de propriétés physicochimiques telles que le volume de la cavité, le nombre de liaisons hydrogène intramoléculaires, la solubilité aqueuse, la rigidité, etc... (Tableau 1). La  $\beta$ CD est la plus rigide des trois CDs naturelles en raison de son réseau de liaisons hydrogène particulièrement coordonnées, permettant la présence de 7 liaisons hydrogène sur la face secondaire, ce qui implique l'ensemble des alcools de cette face. Ce réseau confère à la  $\beta$ CD une structure cyclique et symétrique mais l'implication de tant de groupements polaires – en partie responsables de la solubilité aqueuse des CDs – dans des liaisons hydrogène intramoléculaires diminue significativement sa solubilité aqueuse [7]. L' $\alpha$ CD est également une structure rigide en raison des contraintes stériques générées par son caractère cyclique associé au nombre de six unités glucosidiques. Ces contraintes stériques sont à l'origine d'une légère distorsion de l'une des unités glucose, limitant à quatre le nombre de liaisons hydrogène simultanées sur la face secondaire. La plus faible implication des alcools dans la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires explique en partie la plus haute solubilité aqueuse de l' $\alpha$ CD en comparaison de la  $\beta$ CD [7]. Concernant la  $\gamma$ CD, le nombre de huit unités glucose augmente le degré de liberté conformationnelle de cette CD, lui accordant une souplesse de sa structure tridimensionnelle. Il en résulte un réseau de liaisons faibles intramoléculaires dont la force globale est inférieure aux autres CDs, lui procurant notamment la plus haute solubilité aqueuse des trois CDs naturelles et une capacité d'adaptation supérieure. La force de ces liaisons hydrogène a été comparée pour chacune de ces CDs grâce à la mise en œuvre d'une expérience de cinétique d'échange hydrogène/deutérium (H/D). Cette expérience a montré que la force (i.e. la distance O2---O3) de ces liaisons faibles augmente avec le nombre d'unités glucose :  $\alpha$ CD <  $\beta$ CD <  $\gamma$ CD [6]. Enfin, la cavité des CDs solubilisées dans l'eau contient, malgré son caractère hydrophobe, un nombre de molécules d'eau variable en fonction de sa taille. Il est à noter que cette présence d'eau génère également la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires participant à la solubilité et à la stabilisation des conformations des CDs [6].

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des CDs naturelles  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD et  $\gamma$ CD [5,6,8,9].

	$\alpha$ CD	$\beta$ CD	$\gamma$ CD
<b>Unité Glucopyranose</b>	6	7	8
<b>Formule brute</b>	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
<b>Masse molaire (g/mol)</b>	972.9	1135.0	1297.1
<b>Diamètre externe / interne (Å)</b>	5.3 / 4.7	6.5 / 6.0	8.3 / 7.5
<b>Hauteur (Å)</b>	7.9	7.9	7.9
<b>Volume de la cavité (Å<sup>3</sup>)</b>	174	262	427
<b>Nombre de liaisons hydrogène</b>	4	7	N.D.
<b>Solubilité aqueuse à 20°C (g/L)</b>	145	18.5	232
<b>Nombre de molécules d'eau dans la cavité</b>	6-8	11-12	13-17
<b>pKa</b>	12.3	12.2	12.1
<b>K moyen (M<sup>-1</sup>)</b>	130 ± 8	490 ± 8	350 ± 9
<b>Prix indicatif (\$US/kg)</b>	45	5	80

De plus, les CDs naturelles s'auto-associent menant à la formation d'agrégats plus ou moins solubles en phase liquide (Schéma 2, [10]). L'agencement de ces associations est dépendant des CDs comme observé en phase solide par l'analyse des cristaux. Les concentrations micellaires critiques (CMC) des CDs naturelles sont de 27, 7 et 7 mM pour l' $\alpha$ CD, la  $\beta$ CD et la  $\gamma$ CD (26, 8 et 9 mg/mL). Leur diamètre est compris entre 20 et 200 nm en fonction de la concentration. Il est intéressant de noter que malgré sa plus haute solubilité aqueuse parmi les 3 CDs naturelles, la  $\gamma$ CD possède une CMC faible, indiquant que les agrégats formés sont solubles [11].

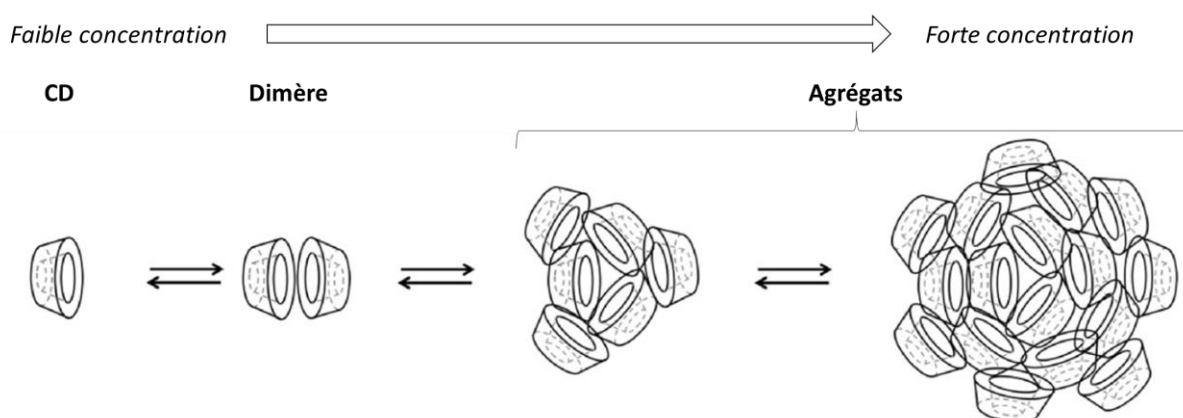


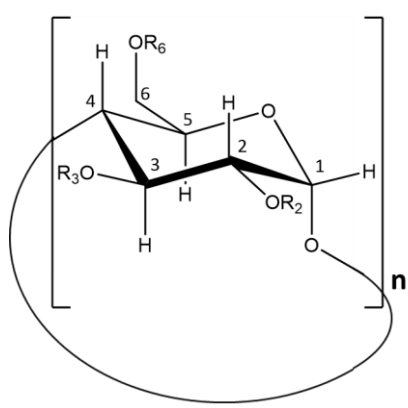
Schéma 2 : Exemple de représentation des auto-associations non-covalentes des CDs. D'après [12].

Afin de pallier cette limite de solubilité, la modification chimique des CDs a été largement investiguée. Disposant de trois groupements hydroxyles libres par glucose, différentes stratégies de synthèse ont été mise en place, sélectives ou non-sélectives [13,14]. Les voies de synthèse sélectives sont utilisées



afin de greffer un motif moléculaire sur une position précise pour une application recherchée. Les synthèses non-sélectives mènent à l'obtention de mélanges de dérivés de CDs dont le degré de substitution (DS) varie et dont l'utilisation peut être multiple. Parmi les modifications non-sélectives couramment observées, l'ajout de groupements méthyle (MeCD), hydroxypropyle (HPCD) ou sulfobutyl-ether (SBECD) permet d'augmenter considérablement la solubilité aqueuse des CDs (Tableau 2). L'ajout de ces fonctions modifie également leur propriétés d'auto-association, comme le démontre la CMC de l'HP $\beta$ CD, de 84 mM (118 mg/mL) contre 7 mM pour la  $\beta$ CD naturelle [11].

Tableau 2 : Structure générale des CDs modifiées les plus courantes, obtenues par voie de synthèse non-sélectives [12].

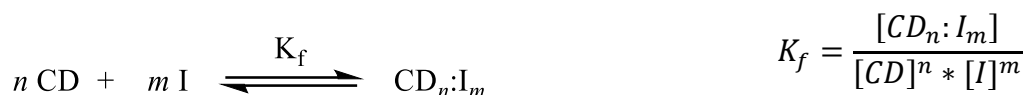
	n	R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>6</sub>	Nom	S (g/L)
	6	H	$\alpha$ CD	130
	7	H	$\beta$ CD	18.5
	8	H	$\gamma$ CD	250
	7	H ou CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	HP $\beta$ CD	> 600
	8	H ou CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	HP $\gamma$ CD	> 500
	7	H or CH <sub>3</sub>	RAMEB	> 600
	7	H ou CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na	SBE $\beta$ CD	> 500

La rigidité des conformations des CDs naturelles étant liée en partie aux liaisons hydrogène intramoléculaires entre les hydroxyles libres, leur substitution peut également générer une diminution de la rigidité du cycle. Par exemple, la  $\beta$ CD tri-méthylée (TRIMEB), dont tous les OH libres sont méthylés, voit fréquemment sa structure distordue et sa forme cristalline monohydrate présente souvent l'inversion de la conformation chaise d'une unité glucose de <sup>4</sup>C<sub>1</sub> vers une <sup>1</sup>C<sub>4</sub> [6].

### 1.1.2. Les complexes d'inclusion

La géométrie particulière des CDs et l'espace hydrophobe de leur cavité leur offre la capacité d'inclure des molécules ou groupements apolaires de plus petites tailles. Cette capacité d'inclusion combinée à leur solubilité aqueuse fait des CDs une famille de molécules aux propriétés intéressantes pour l'encapsulation de composés en milieu aqueux, notamment de composés apolaires peu solubles. L'inclusion de molécules dans les CDs génère une modification de leurs propriétés physico-chimiques, telles que la solubilité aqueuse, la stabilité ou la réactivité au travers de la formation d'un complexe d'inclusion. Régis par une constante de formation K<sub>f</sub>, ces derniers sont des équilibres gouvernés par des interactions faibles dont la cinétique est généralement rapide, entre les formes libres (CD ; Invité, I) et complexées (CD:I) des espèces impliquées (équation 1) [15].

Équation 1 : Exemple d'équilibre générale de formation d'un complexe d'inclusion de stœchiométrie  $n:m$  (CD :I) et sa constante de formation  $K_f$



Les complexes d'inclusion sont donc des agencements supramoléculaires non-covalents, caractérisés par l'inclusion d'une ou plusieurs molécules invitées à l'intérieur de la cavité d'une ou plusieurs cyclodextrines. En fonction de la nature des invités et des CDs, plusieurs stœchiométries de complexes (CD:I) peuvent exister dont les principales sont 1:1, 2:1, 1:2 ou 2:2 (Figure 1). Les interactions impliquées dans la formation des complexes d'inclusion sont principalement les forces de Van Der Waals, les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène. Ce sont donc des interactions faibles, d'où le caractère réversible de la formation de ces assemblages supramoléculaires [16].

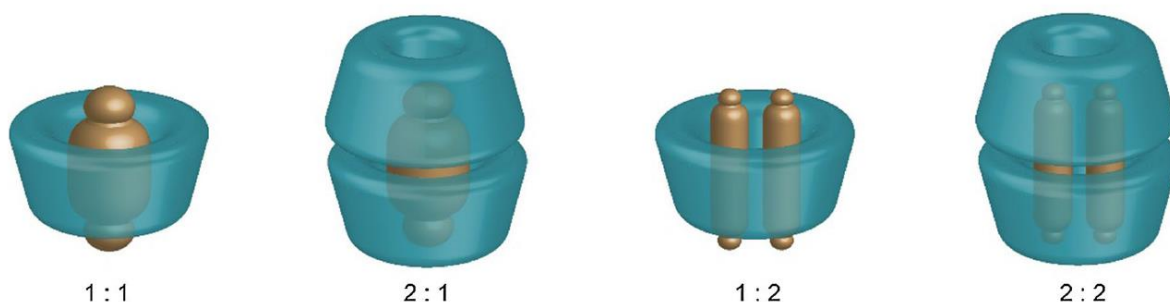


Figure 1 : Représentations des stœchiométries des complexes les plus fréquemment observés. Issu de [17].

Une des forces motrices de la formation des complexes d'inclusion en solution aqueuse est l'expulsion par l'invité des molécules d'eau localisées à l'intérieur de la cavité. Le mouvement de ces molécules d'eau, de haute énergie en raison de leur localisation dans un espace hydrophobe, est en partie responsable des chaleurs de réaction de formation des complexes. Il en résulte la formation d'interactions apolaires – apolaires et une diminution de la surface de contact entre les groupements apolaires (intérieur de la cavité des CDs et les groupements inclus) et les molécules d'eau. La résultante de ce réarrangement est la formation d'une organisation moléculaire plus stable [18,19]. En effet, l'enthalpie générée par ces mouvements d'eau associée aux nouvelles interactions électrostatiques formées entre l'invité et les CDs est favorable à la formation spontanée des complexes d'inclusion. Néanmoins, cette enthalpie favorable est partiellement compensée par une entropie de formation défavorable en raison de la création d'un système plus ordonné [20]. La formation des complexes d'inclusion basés sur les CDs nécessite donc un milieu aqueux afin de générer l'enthalpie de formation favorable en partie liée aux mouvements de molécules d'eau.

Le volume de la cavité des CDs naturelles étant différent (Tableau 1), l'adéquation des molécules pour la cavité est également variable : l' $\alpha$ CD forme préférentiellement des complexes avec des petites

molécules disposant de chaînes aliphatiques [21]; la taille de cavité de la  $\beta$ CD est en bonne adéquation avec les composés aromatiques ; la  $\gamma$ CD offre la possibilité de complexer des composés de plus haut poids moléculaire tels que des macrocycles ou des stéroïdes [22]. Il en découle que chaque taille de CDs naturelles ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD et  $\gamma$ CD) a une affinité davantage marquée pour une famille de groupements, permettant d'anticiper quelle CD serait la plus appropriée pour une molécule étudiée. Néanmoins, la  $\beta$ CD est la CD la plus utilisée en raison de son bas coût de production et de sa taille intermédiaire (Tableau 1) [22,23]. En effet, le volume de la cavité de l' $\alpha$ CD est trop étroit pour accueillir un groupement aromatique, limitant ainsi son utilisation. A l'inverse la taille de la  $\gamma$ CD et sa flexibilité permettent l'inclusion de groupements aromatiques mais l'affinité (i.e.  $K_f$ ) est généralement plus faible qu'avec la  $\beta$ CD en raison du plus haut degré de liberté conformationnelle liée à une inclusion moins spécifique. Sur l'ensemble des données collectées par Connors en 1995, les constantes d'associations moyennes avec l' $\alpha$ CD, la  $\beta$ CD et la  $\gamma$ CD sont de 129, 490 et 355  $M^{-1}$  respectivement [24]. Il est à préciser que les chiffres de cette étude se basent sur un grand nombre de publications antérieures à 1995, correspondant à la période durant laquelle la  $\beta$ CD était la plus accessible et donc plus investiguée. Malgré des interactions plus efficaces avec la  $\beta$ CD, sa faible solubilité aqueuse freine son utilisation. En effet, lors de l'utilisation des CDs pour augmenter la solubilité aqueuse d'un composé par la formation d'un complexe d'inclusion, la solubilité dudit complexe est limitée par la solubilité de la CD seule. Il est néanmoins possible d'observer des complexes d'inclusion dont la solubilité est supérieure à celle de la CD seule. L'inclusion dans la cavité peut, en fonction de la conformation du complexe, modifier le réseau de liaisons faibles intramoléculaire de la CD et impacter sa solubilité, positivement ou négativement. L'utilisation des CDs modifiées offre l'avantage d'augmenter les limites de solubilité des complexes formés, grâce à leur solubilité intrinsèque supérieure à celle des CDs naturelles. De plus, la présence de groupements supplémentaires peut être la source d'interactions de complexation différentes, telles que des interactions hydrophobes, des forces électrostatiques ou des liaisons hydrogène. Principalement pour des raisons de coûts de production, les CDs les plus couramment utilisées sont les trois CDs naturelles et les mélanges de dérivés précités (Tableau 2), obtenus par voies non-sélectives avec peu d'étapes de synthèse [25].

La formation de complexes d'inclusion entre CDs et une molécule cible représente un domaine de recherche à part entière [17]. En effet, l'encapsulation par les CDs a aujourd'hui été largement étudiée et exploitée dans de nombreux domaines d'application tels que l'industrie du textile, cosmétique, de biotechnologie ou dans l'industrie chimique [18]. Dans l'industrie agroalimentaire, les CDs sont utilisées pour augmenter la durée de vie des produits, stabiliser les arômes, les vitamines, colorants, et autres additifs dont la structure est en adéquation avec la cavité des CDs [26]. Ayant également la capacité d'augmenter la solubilité aqueuse de certaines substances, de protéger de l'oxydation, de la

décomposition à la lumière et des variations de chaleur, les industries de cosmétique et pharmaceutiques exploitent les CDs comme excipients [27].

### I.1.3. Application au domaine pharmaceutique

#### I.1.3.1. Toxicité des CDs

Concernant la toxicité des CDs, il est nécessaire de dissocier les voies d'administration. En effet, des formulations de substances actives en présence de CDs existent sous différentes formes galéniques pour différentes voies d'administration. Concernant la voie parentérale, il a été montré que 90 % de l' $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, RAMEB et SBE $\beta$ CD sont excrétés inchangés dans l'urine chez le rat. L'utilisation de la  $\beta$ CD par cette voie d'administration est à éviter en raison de sa recristallisation dans l'organisme liée à sa faible solubilité aqueuse [9,28].

Les CDs ne sont globalement pas toxiques lors d'une administration par voie orale en raison de leur non-absorption dans le tractus gastro-intestinal [22]. Leur structure cyclique et rigide leur offre une résistance aux dégradations enzymatiques, notamment celles provoquées par les amylases qui dégradent rapidement leurs homologues linéaires [18]. La  $\gamma$ CD est la moins stable en raison de sa plus haute flexibilité facilitant l'accès des amylases tandis que les dérivés de CDs sont quant à eux plus résistants aux enzymes et à l'hydrolyse que leurs homologues naturels. Leur métabolisation principale est réalisée par les bactéries se trouvant dans le côlon [12]. Certains paramètres pharmacocinétiques sont repris dans le Tableau 3, dont la DL<sub>50</sub> orale qui est de l'ordre du g/kg chez le rat, mettant en évidence la faible toxicité de ces molécules. Les cyclodextrines ont de très faibles biodisponibilités lors de leur administration par voie orale, s'expliquant par la loi de Lipinski à travers leur nombre d'alcools libres (donneur + accepteur d'hydrogènes) et de leur haut poids moléculaire (supérieur à 500 Da) [29,30]. Il en découle que leur biodisponibilité lors d'une administration par voie orale est inférieure à 3% ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, HP $\gamma$ CD, SBE $\beta$ CD) et à 12% pour les CDs les plus lipophiles (RAMEB) [31]. Cependant, il est à noter qu'à hautes concentrations les CDs ont, *in-vitro*, un léger effet hémolytique sur les membranes ( $\gamma$ CD <  $\alpha$ CD < HP $\beta$ CD <  $\beta$ CD < TRIMEB < DIMEB), lié à leur interaction avec les constituants membranaires tels que les phospholipides, le cholestérol ou les protéines. Cela constitue en soi une preuve de la présence d'interactions entre les CDs et les constituants membranaires. [21]

Tableau 3 : Pharmacocinétique des CDs naturelles et des CDs modifiées utilisées [12,22,28,32].

CD	Pharmacocinétique (rat)			Toxicité aiguë (rat) LD <sub>50</sub> (g/kg)	
	t <sub>1/2</sub> IV (min)	Fraction urine inchangée IV (%)	Biodisponibilité orale (%)	IV	Oral
αCD	25	90	2-3	0.5-0.8	>10
βCD	20	90	1-2	1	19
HPβCD	20	90	< 3	10	>2
SBEβCD	-	-	-	>15	>10
RAMEB	18	95	0.5-12	1.5-2.1	>8
γCD	20	90	<0.02	4	>8
HPγCD	-	-	-	-	>2

Certaines CDs sont d'ores et déjà autorisées par différentes pharmacopées, facilitant leur utilisation au sein de formulations pharmaceutiques. En effet, la Pharmacopée américaine autorise le plus de CDs listant les naturelles (αCD, βCD et γCD) et deux dérivés de la βCD (HPβCD, SBEβCD). La pharmacopée japonaise autorise uniquement les trois CDs naturelles et la Pharmacopée européenne l'αCD, la βCD, la γCD et l'HPβCD. De plus, les CDs naturelles sont aujourd'hui couramment utilisées en tant qu'additifs alimentaires, autorisées par la Food and Drug Administration (FDA) et reconnues sans danger pour la santé. Néanmoins, certaines nuances de législation existent selon les continents [12,33]. A titre indicatif, le Tableau 4 reprend les quantités admissibles par différentes voies d'administration pour lesquelles aucun effet négatif n'est attendu.

Tableau 4 : Valeurs seuils recommandées pour éviter l'observations d'effets négatifs liés aux CDs. D'après [34].

	αCD	βCD	γCD	RAMEB	HPβCD/SBEβCD
<b>Voie Orale (mg/kg/jour)</b>					
Adulte	120	10	200	-	160
Nouveau-né	12	10	20	-	16
<b>Voie Nasale (solution, % w/v)</b>					
Adulte	-	1.5	-	10	10
Nouveau-né	-	0.15	-	1	1
<b>Voie Oculaire (solution, % w/v)</b>					
Adulte	1	1	-	1	10
Nouveau-né	0.1	0.1	-	0.1	1
<b>Voie Parentérale (mg/kg/jour)</b>					
Adulte	0.2	-	0.8	-	300
Nouveau-né	0.02	-	0.08	-	10

### I.1.3.2. Intérêts pharmaceutiques des CDs

#### I.1.3.2.1. Effet protecteur des CDs

La capacité des CDs à offrir un effet protecteur sur le composé inclus est fréquemment recherchée dans le domaine pharmaceutique. En effet, une revue publiée par Loftsson *et coll.* reprend un grand nombre d'études visant à étudier cet effet protecteur [16]. L'analyse des cinétiques de dégradation d'une substance et l'obtention des constantes de dégradation en présence ( $k_c$ ) ou en absence ( $k_f$ ) de CDs mène à l'obtention d'une grandeur ( $k_c/k_f$ ) permettant la comparaison de l'efficacité de la protection engendrée par la complexation (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemples de l'effet de la complexation par les CDs sur la stabilité de substances actives incluses. D'après [16].

Substance active	CD	pH	T (°C)	$K_{1:1}$ (M <sup>-1</sup> )	$k_f$ (h <sup>-1</sup> )	$k_c$ (h <sup>-1</sup> )	$k_c/k_f$	Ref
<b>Effet catalytique</b>								
Cefotaxime (hydrolyse)	$\beta$ CD	3.50	25	18	$2.98 \cdot 10^{-3}$	$6.15 \cdot 10^{-3}$	2.06	[35]
		7.50		9	$2.81 \cdot 10^{-3}$	$28.41 \cdot 10^{-3}$	10.11	
	DIMEB	3.50		26	$2.98 \cdot 10^{-3}$	$2.95 \cdot 10^{-3}$	0.99	
		7.50		35	$2.81 \cdot 10^{-3}$	$24.59 \cdot 10^{-3}$	8.75	
	HP $\beta$ CD	3.50		30	$2.98 \cdot 10^{-3}$	$4.58 \cdot 10^{-3}$	1.54	
		7.50		47	$2.81 \cdot 10^{-3}$	$14.78 \cdot 10^{-3}$	5.26	
	RAMEB	3.50		37	$2.98 \cdot 10^{-3}$	$3.17 \cdot 10^{-3}$	1.06	
		7.50		51	$2.81 \cdot 10^{-3}$	$3.69 \cdot 10^{-3}$	3.45	
D-Carbenicillin (isomérisation)	$\alpha$ CD	7.40	37	69	$2.93 \cdot 10^{-2}$	$4.25 \cdot 10^{-2}$	1.45	[36]
	$\beta$ CD			48		$7.20 \cdot 10^{-2}$	2.46	
	$\gamma$ CD			34		$1.52 \cdot 10^{-1}$	5.18	
<b>Effet stabilisant</b>								
Amoxicillin (hydrolyse)	$\alpha$ CD	1.20	37	10	$1.32 \cdot 10^{-1}$	$1.29 \cdot 10^{-1}$	0.98	[37]
	$\beta$ CD					$7.57 \cdot 10^{-2}$	0.58	
	$\gamma$ CD					$1.16 \cdot 10^{-1}$	0.88	
Benzylpenicillin (hydrolyse)	RAMEB	1.20	37	450	$3.46 \cdot 10^1$	1.94	0.06	[38]
		2.40		150	2.28	$4.13 \cdot 10^{-2}$	0.02	
		4.60		190	$5.08 \cdot 10^{-2}$	$1.44 \cdot 10^{-2}$	0.28	
		7.30		190	$2.27 \cdot 10^{-3}$	$6.00 \cdot 10^{-3}$	2.6	
		9.60		85	$8.22 \cdot 10^{-2}$	$5.48 \cdot 10^{-2}$	0.67	
Melphalan (hydrolyse)	SBE $\beta$ CD	7.40	25	360	$2.00 \cdot 10^{-1}$	$1.78 \cdot 10^{-3}$	0.01	[39]
			37	307	$8.10 \cdot 10^{-1}$	$8.57 \cdot 10^{-3}$	0.01	
	HP $\beta$ CD		25	382	$2.00 \cdot 10^{-1}$	$1.01 \cdot 10^{-2}$	0.05	
			37	283	$8.10 \cdot 10^{-1}$	$4.70 \cdot 10^{-2}$	0.06	
D-Ethiazide (isomérisation)	DIMEB	7.40	37	72	$3.65 \cdot 10^{-1}$	$5.71 \cdot 10^{-2}$	0.16	[36]

A titre illustratif de cet effet observable par la formation des complexes d'inclusion, la Figure 2 reprend les résultats d'une cinétique de dégradation du midazolam en absence de CDs, en présence de  $\gamma$ CD ou de RAMEB [40]. Il est observable que sur une durée de 3 mois à 40°C, cette substance active se dégrade

à hauteur de 20% en absence de CDs alors que la  $\gamma$ CD et la RAMEB permettent respectivement de limiter cette dégradation à 15% et 5%. Ce plus fort effet stabilisant des CDs modifiées est généralement observé, dont l'origine supposée est la substitution des OH libres susceptibles de former des liaisons hydrogène avec l'invité, catalysant les réactions de coupures.

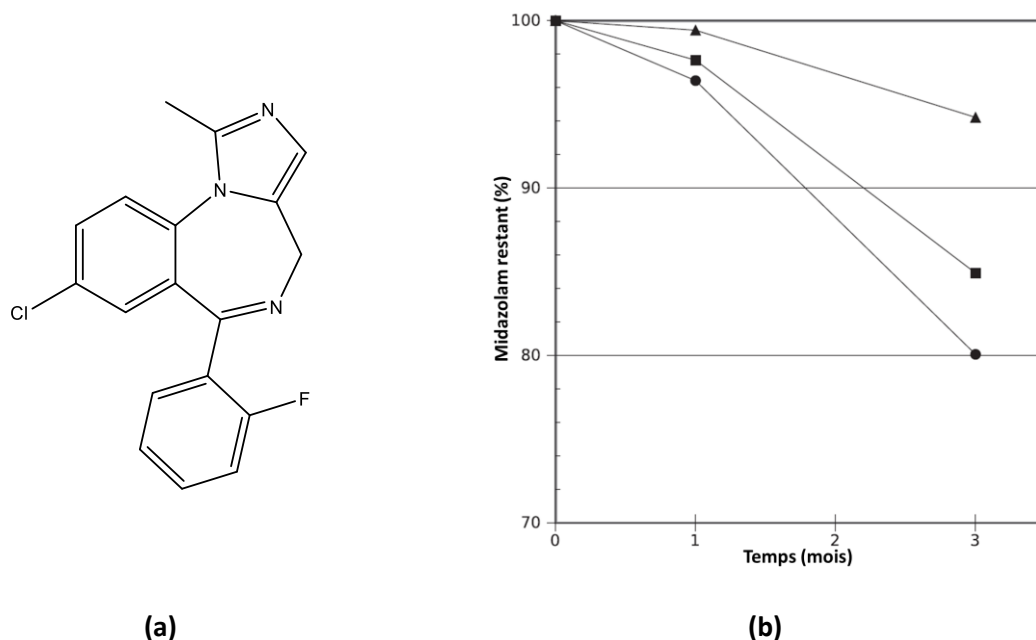


Figure 2 : Exemple de l'effet protecteur des CDs sur le midazolam. (a) structure du midazolam. (b) Pourcentage de midazolam résiduel en fonction du temps, en absence de CDs (rond), en présence de  $\gamma$ CD (carré) ou de RAMEB (triangle). D'après [40].

En effet, l'inclusion d'un composé dans la cavité des CDs peut également avoir un effet catalytique sur ce dernier. Comme observé dans le Tableau 5, certains rapports  $k_c/k_f$  sont supérieurs à 1, signifiant que la dégradation du composé étudié a été accélérée en présence de CDs. Wouessidjewe et coll. ont étudié le cas de la spironolactone (SP) en présence de  $\beta$ CD, formant un complexe de stœchiométrie 2:1 (CD:SP) qui catalyse la désacétylation de la SP [41]. Il est également observé que la taille de la cavité des CDs peut orienter son influence sur la stabilité d'un composé. Il a été montré, pour la (S)-scopolamine et la (S)-hyoscyamine, que l' $\alpha$ CD catalyse leur racémisation et leur hydrolyse alors que les dérivés  $\beta$ CD et la  $\gamma$ CD stabilisent l'énantiomère (S) [42]. Un autre exemple de l'effet catalytique que peuvent avoir les CDs porte sur l'hydrolyse de la benzylpénicilline. En conditions acides (pH 1.2), la RAMEB montre un effet protecteur significatif alors qu'en conditions neutres (pH 7.4) un effet catalytique de cette hydrolyse est observé [38]. Ces exemples permettent de mettre en évidence qu'il est démontré que les CDs (modifiées ou non) peuvent avoir un effet sur la stabilité des molécules incluses mais que l'aspect protecteur ou catalytique ne peut être déterminé qu'expérimentalement.

### I.1.3.2.2. Effet sur la solubilité et la biodisponibilité

Afin de catégoriser les nombreuses substances actives existantes, le système de classification biopharmaceutique (BCS) a été mis en place (Tableau 6). Les substances actives de classe I présentent une bonne résorption gastro-intestinale et une bonne dissolution, leur conférant généralement une bonne biodisponibilité lors d'une administration par voie orale. La classe II regroupe les substances ayant une faible solubilité mais une bonne perméabilité gastro-intestinale. Sachant que la vitesse de dissolution (i.e. liée à la solubilité) est l'étape limitante pour une bonne résorption, l'amélioration de ce paramètre est à privilégier pour une formulation en solution aqueuse. La classe III correspond aux substances solubles dans l'eau avec une faible perméabilité membranaire. Enfin, la classe IV regroupe les substances actives dont la solubilité et la perméabilité membranaire sont faibles [43].

Tableau 6 : Classification biopharmaceutique des substances actives. D'après [43].

<b>Classe I</b>		<b>Classe II</b>	
Très soluble		Peu soluble	
Très perméable		Très perméable	
<b>Classe III</b>		<b>Classe IV</b>	
Très soluble		Peu soluble	
Peu perméable		Peu perméable	

De nombreuses techniques ont été investiguées avec l'objectif d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité des substances de classes II et IV pour une administration par voie orale : La micro-ionisation et nano-formulation [44], la formation de sels [45], la dérivation [46], la co-solvation [47], l'utilisation de surfactant [48], la modification de forme cristalline [9], la dispersion des solides [49]. Afin d'augmenter la perméabilité membranaire de certaines substances actives, la co-solvation et l'utilisation de surfactants peuvent être utilisés. Néanmoins, cette approche génère une augmentation de la perméabilité de la membrane en raison des interactions générées avec les solvant organiques, surfactant ou acides gras utilisés.

A l'inverse, les CDs permettent également l'augmentation de la perméabilité membranaire vis-à-vis de molécules lipophiles essentiellement, mais leur caractère hydrophile limite les modifications structurales des membranes. Le rôle des CDs est dans ce cas de véhiculer les substances incluses jusqu'à la membrane pour leur permettre de la traverser grâce à leur caractère lipophile et leur bonne affinité membranaire, ce qui représente une approche moins invasive que l'utilisation de co-solvants (Schéma 3) [50]. L'intérêt des CDs est maximal pour les substances catégorisées de classe II, avec l'objectif d'augmenter leur solubilité aqueuse et leur biodisponibilité. Leur utilisation est également



intéressante avec les classe IV. L'objectif de l'utilisation des CDs est donc de conférer, par la formation de complexe d'inclusion, les propriétés de la classe I aux substances actives de classes II et IV au sein de solutions aqueuses administrées par voie orale. En raison des propriétés des substances de classes III et I, l'intérêt des cyclodextrines porte sur l'augmentation de la stabilité et de la palatabilité de ces SAs. Leur capacité d'inclusion peut, dans le cas des substances de classes I, générer une diminution de la biodisponibilité liée à une compétition d'interactions impliquant les récepteurs biologiques et les CDs utilisées [43].

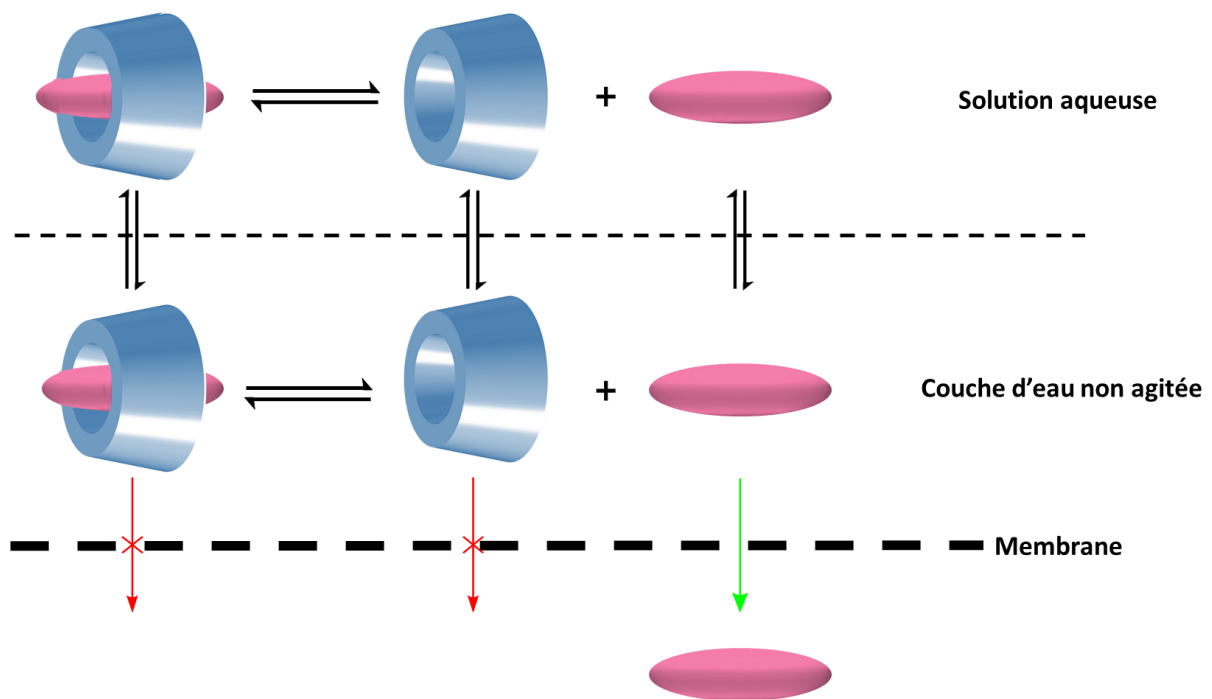


Schéma 3 : Illustration des équilibres impliqués lors de l'approche d'un complexe d'inclusion vers une membrane biologique, menant à l'augmentation de la biodisponibilité de la substance active incluse dans la CD. D'après [31].

Lors de l'administration par voie orale d'une solution de complexes d'inclusion, la valeur de constante d'association ne doit pas dépasser  $5000 \text{ M}^{-1}$  pour permettre un relargage correct de la substance active après ingestion [51]. Naturellement, l'affinité des CDs avec les substances actives est en bon accord avec cette limite car les valeurs de constantes d'associations sont généralement comprises entre 10 et  $1000 \text{ M}^{-1}$ , ce qui est donc approprié pour une dissociation correcte après ingestion [31]. En effet, la dilution des solutions de complexes d'inclusion génère une diminution significative de la proportion de substance localisée à l'intérieur de la cavité des CDs. Cet effet de dilution est d'autant plus prononcé que la constante d'association est faible, mais également par la présence de molécules tiers entrant en compétition dans la formation des complexes (cet effet de compétition est proportionnel à leur valeur de constante de formation). A titre d'exemple, une simple dilution par 100 d'un complexe régi par une constante de  $610 \text{ M}^{-1}$  génère un relargage d'environ 50% de la molécule invitée [52]. Les

mécanismes de relargage des substances actives lors de l'ingestion d'une solution de complexes par voie orale sont donc essentiellement la dilution et la compétition de complexation liée à la présence de molécules biologiques telles que des vitamines ou le cholestérol [12].

#### I.1.3.2.3. Effet sur le goût des substances actives (SAs)

Le mauvais goût et notamment l'amertume des médicaments est la première source d'une mauvaise acceptabilité et l'amélioration de cette problématique est particulièrement importante dans le secteur pédiatrique [53,54]. Le goût amer est généralement retrouvé avec les substances hydrophobes, suggérant que les groupements hydrophobes sont responsables de cette amertume. L'inclusion de ces groupements dans la cavité des CDs apparaît donc comme étant une solution adéquate pour diminuer le goût des substances actives [21]. La diminution du goût des SAs incluses dans les CDs peut s'expliquer par trois voies, au regard des récepteurs responsables de la détection des goûts :

- Le complexe n'est pas détecté par les récepteurs lors de la dissociation du complexe, la présence du complexe, de la molécule libre et de la CD libre limite la disponibilité des récepteurs (Schéma 4 (a)) ;
- Les CDs interagissent directement avec les récepteurs, bloquant les sites d'interaction avec la substance active (Schéma 4 (b)) ;
- Les CDs inhibent les fonctions des récepteurs à travers des interactions avec le cholestérol et/ou les phospholipides constitutifs de ces récepteurs (Schéma 4 (c)).

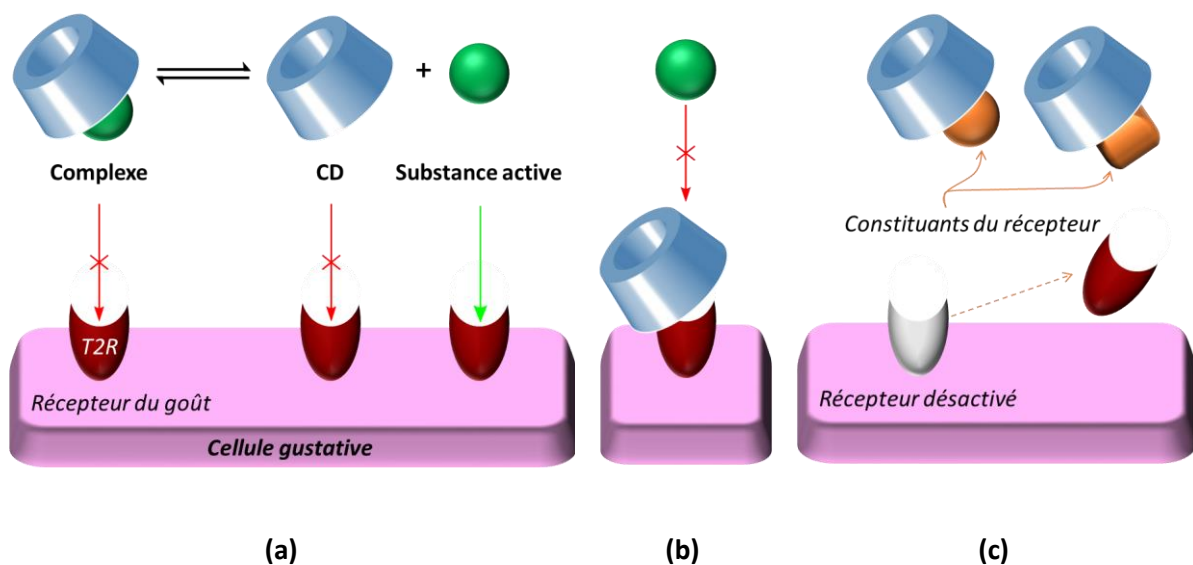


Schéma 4 : Propositions de mécanismes à l'origine de la diminution des goûts des substances actives en présence de CDs. (a) Encombrement des récepteurs T2R (b) Interactions directes des CDs avec les récepteurs T2R (c) Désactivation des récepteurs T2R par l'extraction de certains de leurs composants. D'après [21].

L'efficacité de la diminution des goûts est dépendante de la constante d'association CD-SA, motrice de la rapidité de dissociation et donc de forme complexée à l'approche des récepteurs [21]. Au regard des différents équilibres et mécanismes proposés, il est probable qu'une combinaison de ces mécanismes

soit à l'origine de la diminution observée des goûts des formulations à base de CDs. Une revue de 2005 liste une trentaine de substances actives pour lesquelles les CDs ont montré un effet de diminution du goût et/ou des odeurs, démontrant que cet effet peut être obtenu par la formation des complexes d'inclusion [55]. Il est à noter que les CDs ont également un effet sucrant à ne pas négliger : 2.5% (w/v) de  $\beta$ CD équivaut à 1.71% (w/v) de sucrose en terme de pouvoir sucrant [21,56].

Les effets biologiques observés et discutés précédemment peuvent exister à condition de la formation d'une réelle inclusion d'une substance active à l'intérieur de la cavité des CDs. De nombreuses approches et techniques d'analyses ont été décrites afin de déterminer i) si une association supramoléculaire existe et ii) s'il s'agit d'un complexe d'inclusion. Leur identification et caractérisation représentent un aspect important des connaissances à propos de l'affinité des CDs pour des groupements chimiques.

#### I.1.4. Caractérisation des complexes

Différentes approches de caractérisation sont retrouvées dans la littérature, en accord avec les formes galéniques des complexes d'inclusion. Les deux grandes familles d'études sont définies par l'état du complexe, solide ou liquide. La méthode de préparation des complexes d'inclusion de cyclodextrines sous forme solide fait l'objet de nombreuses recherches, nécessitant pour chaque méthodologie une analyse du solide obtenu. Aujourd'hui, plusieurs techniques de préparation de complexes solides sont décrites : Le broyage [57], la co-précipitation [58], l'évaporation de solvant [59], la lyophilisation [60] ou le séchage par pulvérisation [61]. L'efficacité de la méthode est généralement estimée par la comparaison du solide obtenu avec le simple mélange des composés sous forme solide.

La caractérisation en phase liquide a pour objectif d'étudier les interactions présentes en solution et de décrire l'équilibre d'inclusion. Il est à noter que seule la caractérisation en phase liquide permet l'obtention d'informations sur le comportement de l'invité en présence de CDs en solution. Les informations obtenues par cette voie de caractérisation sont intéressantes car représentatives des équilibres présents lors de l'ingestion de solutions buvables contenant des complexes d'inclusion.

##### I.1.4.1. Caractérisation des complexes en phase solide

Plusieurs méthodes d'analyse sont utilisées afin de caractériser les complexes d'inclusion en phase solide. L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des substances seules, des CDs seules et des complexes solides formés permet l'observation de modifications des longueurs d'ondes caractéristiques, mettant en évidence une interaction entre les composés. Le principe est le même avec les analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), à travers l'observation de variations des points de fusion ou de décomposition lors de l'analyse des complexes en comparaison de l'analyse des substances seules. L'utilisation de la diffraction de rayons X (XRD) est également reportée et les spectres de diffraction obtenus sont également interprétés par comparaison des spectres des substances seules ou complexées. Enfin, la microscopie électronique à balayage (MEB) permet l'observation directe des surfaces du solide obtenu par la préparation des complexes en phase solide, mettant généralement en évidence une différence de structure microscopique notable entre les composants du complexe seul ou après la préparation des complexes solides [62–66]. Généralement, les publications rapportant la préparation et l'analyse de complexes d'inclusion en phase solide combinent tout ou partie des analyses citées, comme représenté sur la Figure 3 relative à l'analyse d'un complexe entre la riparin A et la  $\beta$ CD [67].

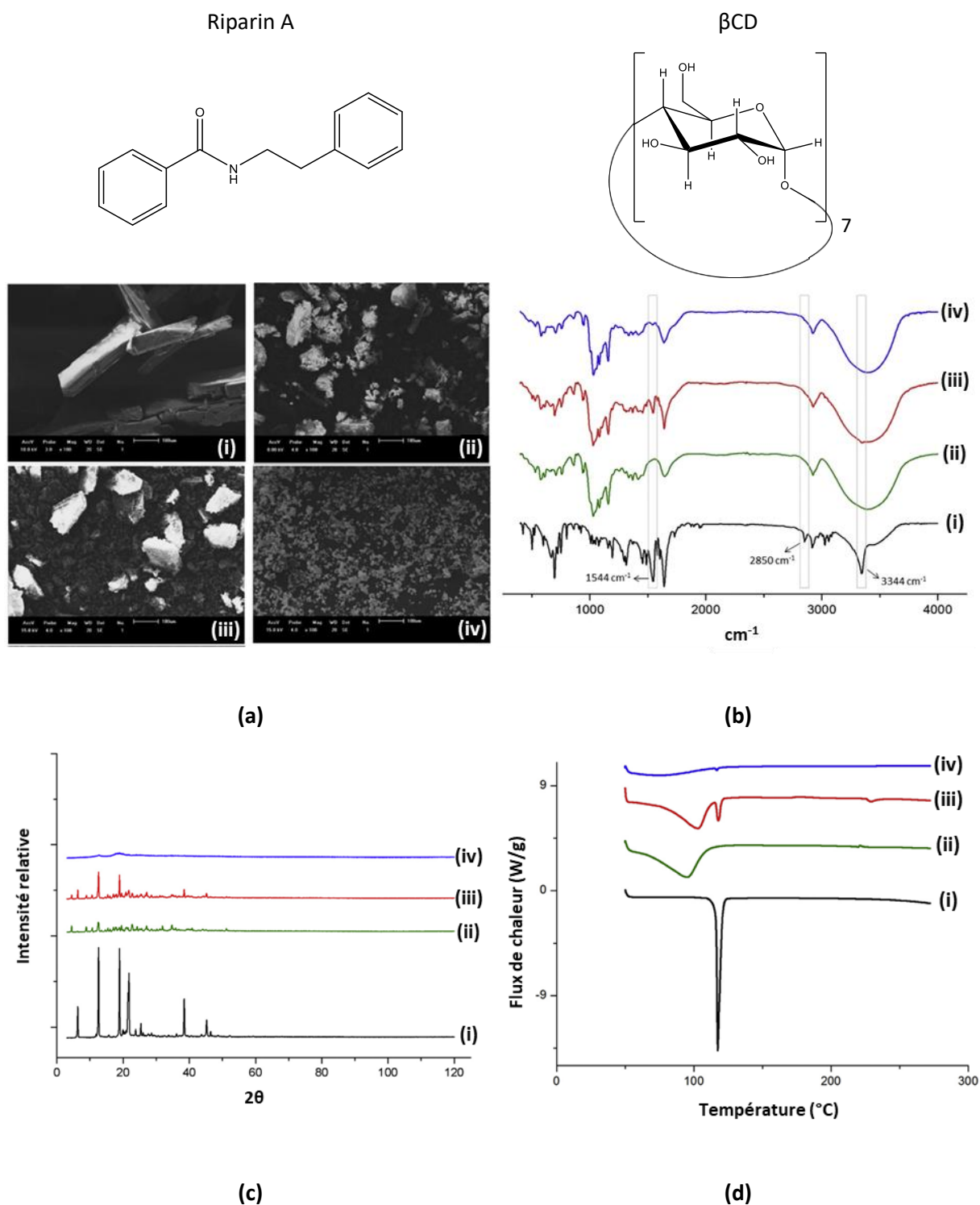


Figure 3 : Exemple d'analyse d'un complexe en phase solide, entre la Riparin A et la βCD, par MEB (a), FTIR (b), DRX (c) et DSC (d). Comparaison des données obtenues par l'analyse de la riparin seule (i), la βCD seule (ii), le mélange des solides (iii) et le complexe d'inclusion préparé par spray-drying (iv). D'après [67].

Il convient de préciser que toutes ces analyses permettent d'observer la présence d'interactions sans apporter d'information sur leur nature ou prouver que les complexes ont été réellement formés. En effet, les différentes méthodes de préparation employées peuvent également modifier la cristallinité des substances à inclure et / ou la présence de CDs peut diminuer leur capacité à cristalliser ou

masquer certaines longueurs d'ondes caractéristiques. De ce fait, ces techniques permettent d'apporter la preuve que la cristallinité est différente et / ou une proximité entre la substance étudiée et les CDs, mais n'apportent pas la preuve de la formation d'un complexe d'inclusion. En revanche, la diffraction de rayons X peut permettre de prouver l'inclusion d'un composé sous réserve de l'obtention d'une forme cristalline du complexe observé, ce qui a été montré dans le cas du complexe entre la  $\beta$ CD et le cholestérol [68].

Les travaux discutant des complexes sous forme solide étudient généralement leur cinétique de dissolution en milieu aqueux, comme représenté Figure 4 dans l'étude de la riparin A en présence de  $\beta$ CD. Cette approche permet de mettre en évidence l'efficacité des CDs pour augmenter la cinétique de dissolution d'une substance active, en comparaison de la substance active seule.

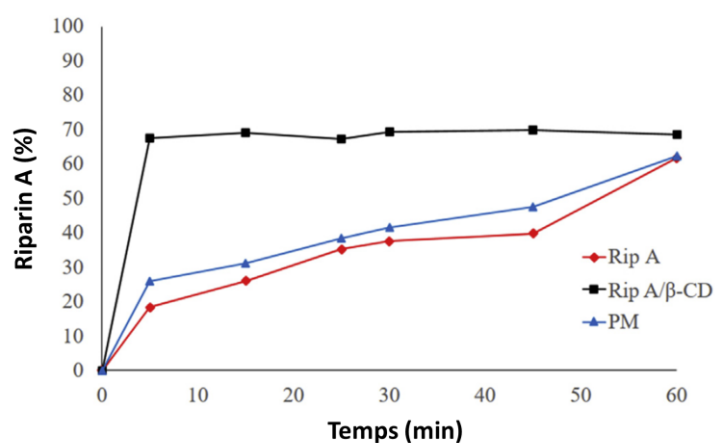


Figure 4 : Exemple de cinétique de dissolution des complexes à travers le cas du complexe solide entre la Riparin A et la  $\beta$ CD. D'après [67].

Il est fréquemment observé que les complexes solides formés permettent d'augmenter significativement cette cinétique de dissolution, apportant un intérêt particulier des CDs dans les formulations sous forme solide telles que les tablettes sublinguales [69]. Néanmoins, ces études de cinétique de dissolution sont souvent réalisées à des concentrations en substances actives faibles, à hauteur de la solubilité aqueuse intrinsèque de la substance étudiée, ce qui n'apporte aucune information sur l'effet solubilisant des CDs.

#### I.1.4.2. Caractérisation des complexes en phase liquide

La caractérisation des complexes d'inclusion en phase liquide offre la possibilité d'obtenir des informations, qualitatives et quantitatives, à propos de la nature des interactions CD-invité. Pour cela, différentes techniques analytiques peuvent être employées pour l'obtention d'informations telles que

l'effet solubilisant des CDs, la stœchiométrie, la géométrie ou la constante d'associations  $K_f$  des complexes analysés.

#### I.1.4.2.1. Techniques d'analyses des complexes d'inclusion en phase liquide

##### I.1.4.2.1.1. Techniques spectroscopiques

La spectroscopie UV est l'une des méthodes les plus employées pour caractériser les complexes d'inclusion de composés comportant un ou plusieurs groupements chromophores. En effet, l'inclusion en milieu aqueux des groupements chromophores dans la cavité des CDs modifie leur environnement, initialement polaire en raison de la solvataion aqueuse, vers la cavité apolaire des CDs. Il peut en résulter une modification des propriétés d'absorption liée aux interactions avec les CDs et / ou à la modification de la nature de solvataion générée par le déplacement des molécules d'eau permettant l'inclusion. Quatre effets peuvent être observés : Une diminution ou augmentation de la longueur d'onde d'absorption maximale  $\lambda_{\max}$  (bathochrome ou hypsochrome) [70]; une diminution ou augmentation du coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  (hypochrome ou hyperchrome) (Figure 5) [71,72].

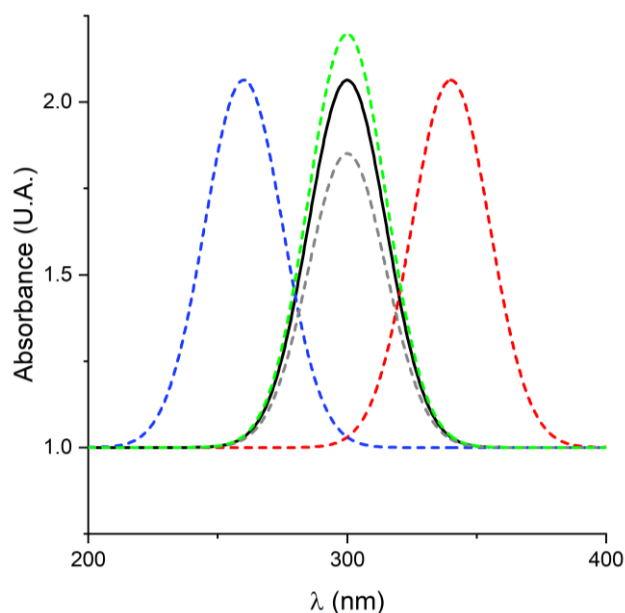


Figure 5 : Illustration des effets bathochrome (bleu), hypsochrome (rouge), hypochrome (gris) et hyperchrome (vert) observables lors de la formation d'un complexe d'inclusion, en comparaison de la courbe de la substance seule (noir).

La spectroscopie de fluorescence peut également être utilisée, les effets observables étant similaires avec ceux obtenus en UV. L'observation de ces effets est une preuve d'interactions entre la molécule observée et la / les CDs utilisées. Il est à noter que les CDs sont transparentes à ces techniques d'analyses, les observations réalisées ne concernent donc que les molécules étudiées, sous réserve de leur capacité de réponse, limitant la quantité d'informations obtenues et le nombre de molécules visibles.

#### I.1.4.2.1.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est une technique de choix pour l'analyse des complexes d'inclusion en solution. En effet, cette technique permet l'observation simultanée de plusieurs composés en solution et de nombreux types d'expériences sont réalisables. Lors de l'analyse de complexes d'inclusion par RMN, définis comme des équilibres dynamiques, les données obtenues sont dépendantes de la cinétique de formation / dissociation de ce complexe. Si l'échange est lent vis à vis de la fréquence de spectromètre RMN, alors les signaux,  $^1\text{H}$  par exemple, correspondant à la forme libre et à la forme complexée seront tous deux visibles (Schéma 5 (a)). A l'inverse dans le cas d'un échange rapide, un unique signal  $^1\text{H}$  sera observé dont la fréquence de résonance correspondra à la moyenne de celle de la forme libre et complexée, pondérée par leur fraction molaire respective (Schéma 5 (b)) [73]. L'état intermédiaire, correspondant à une cinétique proche de la fréquence du spectromètre RMN, génère à un état dit de coalescence, menant à l'observation d'un unique signal large ou à la disparition du signal.

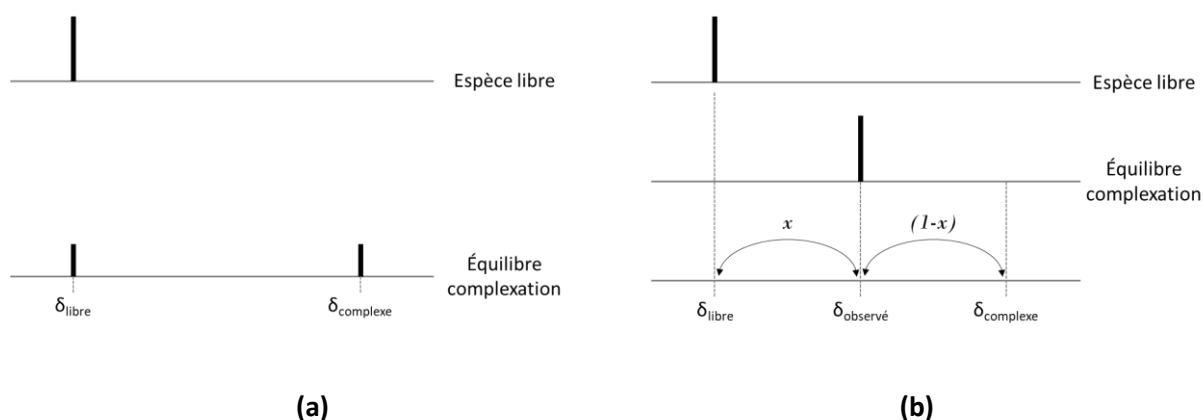


Schéma 5 : Illustration des signaux observés lors de l'analyse de complexes d'inclusion en RMN, dans le cas d'une cinétique de formation lente (a) ou rapide (b). Les exemples présentés correspondent à une fraction molaire en l'espèce libre,  $x$ , égale à 0.5. D'après [73].

Il est admis que la majorité des complexes d'inclusion impliquant les CDs ont une cinétique de formation / dissociation rapide à température ambiante en solution aqueuse, au regard de la fréquence des spectromètres RMN [74]. Cette cinétique impose donc généralement l'observation d'une variation du déplacement chimique des  $^1\text{H}$  des molécules observées (invité et/ou CD), en fonction des rapports molaires (Équation 2), correspondant à un échange rapide.



Équation 2 : Valeur du déplacement chimique observé par RMN  $^1\text{H}$  lors de la formation d'un complexe d'inclusion dont la cinétique de formation/dissociation est rapide au regard de la fréquence du spectromètre RMN utilisé.

$$\delta_{obs} = (\delta_{libre} \times x_{libre}) + (\delta_{cpx} \times x_{cpx})$$

Avec  $\delta_{obs}$  le déplacement chimique observé ;  $\delta_{libre}$  le déplacement chimique à l'état libre ;  $\delta_{cpx}$  le déplacement chimique à l'état complexé ;  $x_{libre}$  la fraction molaire de l'espèce observée sous forme libre ;  $x_{cpx}$  la fraction molaire de l'espèce sous forme complexée.

Cette variation est un indicateur de la modification de l'environnement chimique du  $^1\text{H}$  observé, qu'il soit d'origine intra ou extra moléculaire. Lors de l'analyse d'une solution contenant cyclodextrines et molécule invitée, l'observation de la variation des déplacements chimiques des protons situés à l'intérieur de la cavité de la CD (i.e. H3 et H5) est donc un indicateur de l'inclusion du composé dans la cavité. De plus, les  $^1\text{H}$  portés par des groupements inclus voient également leur environnement proche changer dans la cavité, ce qui peut modifier la valeur de leur déplacement chimique [75]. L'unique condition nécessaire à l'observation de cette variation de déplacement chimique est que  $\delta_{libre} \neq \delta_{cpx}$ .

Parmi les expériences réalisables par RMN, l'exploitation des effets dipolaires de type NOE et ROE est un atout majeur. En effet, à travers les expériences 2D homonucléaires NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) et ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy), il est possible d'observer les corrélations dipolaires intra et intermoléculaires, démontrant une proximité spatiale entre deux protons ( $< 5 \text{ \AA}$ ). Il est à noter que l'expérience NOESY est quantitative, l'intensité des taches de corrélation est proportionnelle à la distance entre les deux protons. A l'inverse, l'expérience ROESY est qualitative et la distance entre deux protons ne peut être obtenue grâce à l'intensité des taches de corrélation. Néanmoins, la comparaison de l'intensité des taches, au sein d'une même expérience ou entre deux expériences aux conditions et paramètres identiques, permet d'évaluer qualitativement les différences d'intensités des corrélations dipolaires. Dans le cas de l'analyse des complexes d'inclusion par des spectromètres RMN aux fréquences de plusieurs centaines de MHz, la sensibilité de l'expérience NOESY (i.e. effet NOE) est proche de son minimum, contraignant à privilégier l'utilisation de la ROESY (Figure 6).

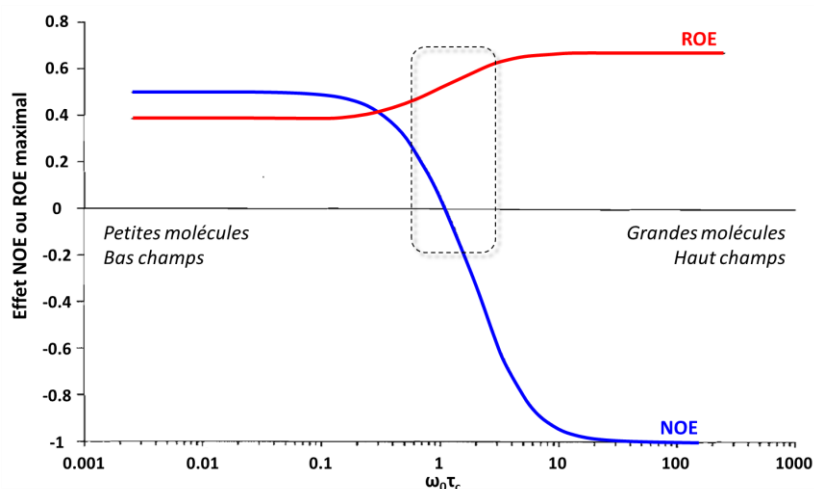


Figure 6 : Représentation de l'effet Overhauser maximal (NOE, bleu ; ROE, rouge) en fonction de la fréquence du spectromètre RMN ( $\omega_0$ ) et du temps de corrélation ( $\tau_c$ ). L'encadré met en évidence la zone où l'effet NOE est voisin de 0 et l'effet ROE de 0,5, correspondant à un  $\omega_0 \tau_c$  proche de celui des complexes d'inclusion lors de leur analyse sur des spectromètres RMN de quelques centaines de MHz. D'après [76].

Une étude visant à comparer l'efficacité de différentes expériences RMN (NOESY, ROESY, T-ROESY (Transverse-ROESY) et ROESY hors-résonance) a été réalisée à travers le cas de l'inclusion de la prostaglandine E<sub>2</sub> dans la  $\beta$ CD [74]. Cette étude a mis en évidence que :

- i) L'expérience NOESY est trop peu sensible dans le cas de l'analyse de ce complexe d'inclusion avec un spectromètre RMN 500 MHz ;
- ii) La ROESY offre une sensibilité nettement supérieure pour l'analyse de ce complexe d'inclusion ;
- iii) iii) la ROESY hors-résonance et la T-ROESY permettent la suppression de corrélations parasites liées à l'effet Hartmann-Hahn. Les corrélations dipolaires observées sont directement et uniquement liées à l'effet ROE intermoléculaire.

Dans le cas des complexes d'inclusion, les corrélations dipolaires recherchées sont principalement entre des protons de l'invité et les protons orientés à l'intérieur de la cavité des CDs (H3 et / ou H5). Leur présence indique une forte proximité ( $< 5 \text{ \AA}$ ), constitue une preuve directe de l'inclusion de l'invité dans la cavité et apporte des informations sur la géométrie de l'inclusion [75]. Enfin, il est remarquable que cette expérience permette d'apporter la preuve d'une inclusion, même si la variation de déplacement chimique n'est pas observable.

Une dernière expérience RMN est reportée lors de l'analyse de complexes d'inclusion par RMN : l'expérience DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy). Cette expérience consiste à mesurer le temps de relaxation longitudinale T<sub>1</sub> pour obtenir le coefficient de diffusion  $D$  d'une molécule, exprimé en m<sup>2</sup>/s et représentatif de sa mobilité dans le milieu étudié. Le coefficient d'une espèce observée varie en fonction de son environnement, induisant une différence entre  $D_{libre}$  et  $D_{cpx}$ . Basé sur le même

principe d'interprétation que pour les spectres RMN  $^1\text{H}$ , admettant une cinétique d'échange rapide,  $D_{obs}$  correspond à la moyenne entre  $D_{libre}$  et  $D_{cpx}$ , pondérée par leur fraction molaire (Équation 3).

*Équation 3 : Valeur du coefficient de diffusion  $D$  observé par l'expérience DOSY lors de la formation d'un complexe d'inclusion dont la cinétique de formation/dissociation est rapide au regard de la fréquence du spectromètre RMN utilisé.*

$$D_{obs} = (D_{libre} \times x_{libre}) + (D_{cpx} \times x_{cpx})$$

Dans le cas de l'inclusion de substances actives de bas poids moléculaire (< 500 Da), la taille du complexe formé est proche de celle de la CD seule, mais significativement supérieure à celle de la substance active seule. En terme de coefficient de diffusion (i.e. de mobilité), cela se traduit par un  $D_{CD\ libre} > D_{SA\ Obs} > D_{SA\ libre}$ , observable par l'expérience DOSY. Malgré une résolution nettement inférieure à celle obtenue par RMN  $^1\text{H}$ , cette expérience permet donc d'observer la présence d'une interaction entre une substance et une CD quand bien même aucune variation de déplacement chimique n'est observée sur les spectre RMN  $^1\text{H}$  [77]. Néanmoins, il est à préciser que l'observation de  $\Delta D$  par DOSY démontre une association et / ou une modification de l'agencement supramoléculaire de l'espèce observée, mais la nature de cette association (i.e. inclusion spécifique ou non-spécifique) ne peut être identifiée par cette seule expérience. Cependant, l'expérience DOSY offre l'avantage, dans le cas de solutions multi-composants, d'observer des différences d'interactions entre deux substances similaires avec une CD alors que le  $\delta\ ^1\text{H}$  des espèces est voisin, à condition que leur  $D_{cpx}$  soit différent et / ou leur  $K_f$  (i.e.  $x_{cpx}$  différent). Une étude visant à déterminer la différence d'interactions entre la  $\beta\text{CD}$  et la phenylalanineproline, un dipeptide en équilibre cis-trans, illustre cet intérêt de l'expérience RMN DOSY. Par l'observation d'une différence de coefficients de diffusion, cette étude a permis l'attribution des signaux  $^1\text{H}$  à la forme cis ou trans, dont la variation de déplacements chimiques est différente en présence de la  $\beta\text{CD}$ . Le dédoublement des signaux  $^1\text{H}$  observé, significatif d'une différence d'interaction entre la forme cis et trans avec la  $\beta\text{CD}$ , couplée à la différence de coefficient de diffusion a mené à la conclusion selon laquelle la forme cis a une affinité supérieure pour la  $\beta\text{CD}$  que la forme trans [78]. Un second exemple d'étude exploitant l'intérêt de l'expérience RMN DOSY consiste en l'analyse d'un mélange ternaire comprenant resvératrol (RSV), méthyl jasmonate (MeJA) et  $\beta\text{CD}$ . D'une part, l'augmentation du coefficient de diffusion du MeJA en présence de  $\beta\text{CD}$  a montré la présence d'une interaction entre ces deux molécules. D'autre part, cette augmentation est plus faible en présence de RSV, indiquant la présence d'une compétition entre le RSV et le MeJA pour la  $\beta\text{CD}$  (Figure 7).

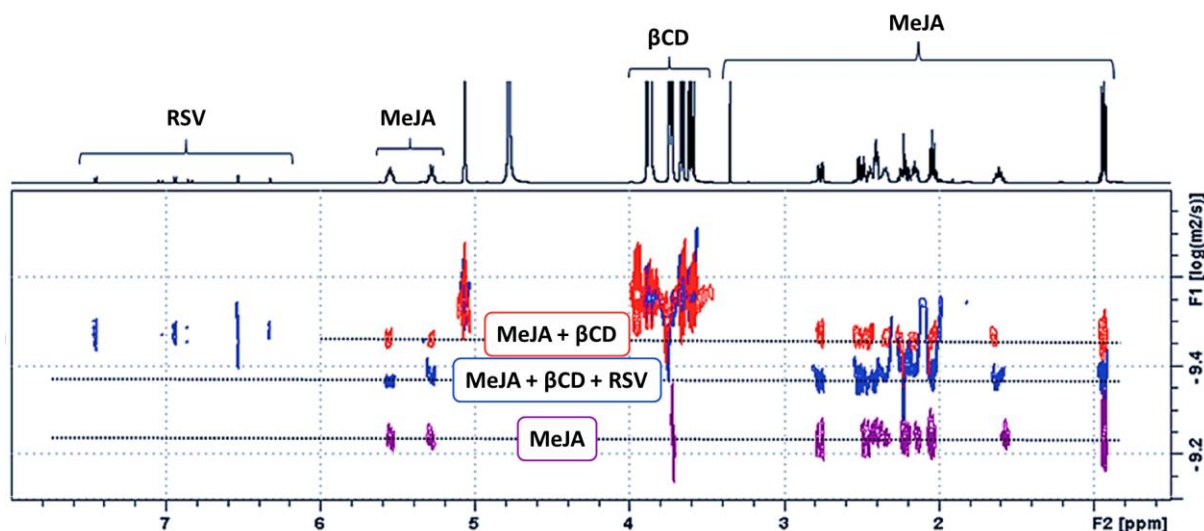


Figure 7 : Superposition des expériences RMN DOSY (600 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K) du méthyle jasmonate (MeJA) seul (violet), en présence de βCD (rouge) et en présence de βCD et de resvératrol (RSV) (bleu). D'après [79].

Généralement associés à d'autres expériences RMN (<sup>1</sup>H, ROESY), ces résultats obtenus par DOSY ont ici été en accord avec les expériences T-ROESY, qui n'ont montré aucune interaction entre le RSV et le MeJA, alors que des corrélations dipolaires ont été observées entre la cavité de la βCD et ces deux molécules [79].

Aujourd'hui les variations de déplacement chimique des <sup>1</sup>H, les expériences ROESY et DOSY sont couramment utilisées lors de l'étude par RMN des complexes d'inclusion en milieu aqueux impliquant des cyclodextrines. La RMN est donc une technique d'analyse incontournable due à la quantité et la qualité des informations descriptives obtenues [80].

#### I.1.4.2.1.3. Titration calorimétrique isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une technique d'analyse mesurant directement les chaleurs générées par un phénomène physico-chimique. Le principe repose sur la mesure des variations de chaleur au sein d'une cellule de mesure contenant une solution A, dans laquelle est injecté successivement un volume précis d'une solution B. Si une interaction existe entre les constituants de A et de B, alors une variation de chaleur sera observée après chaque injection (Figure 8 (a)). Dans le cas de l'analyse des complexes d'inclusion, l'expérience de titration classique consiste en l'injection successive d'une solution de CD dans la cellule de mesure contenant une solution de la substance étudiée. A t<sub>0</sub>, la cellule de mesure ne contient que la substance étudiée. Après la première injection, la composition de la cellule de mesure est modifiée par l'ajout de CDs, se traduisant par une variation de chaleurs si une interaction entre les deux composés existe. La chaleur générée par la première injection est la plus forte observée car la substance étudiée est à l'origine sous forme libre dans la cellule de mesure. Lors de la deuxième injection, un équilibre d'association existe d'ores et déjà

dans la cellule de mesure, diminuant la proportion de forme libre de la substance, ce qui se traduit par une variation de chaleur moins importante (Figure 8 (a)).

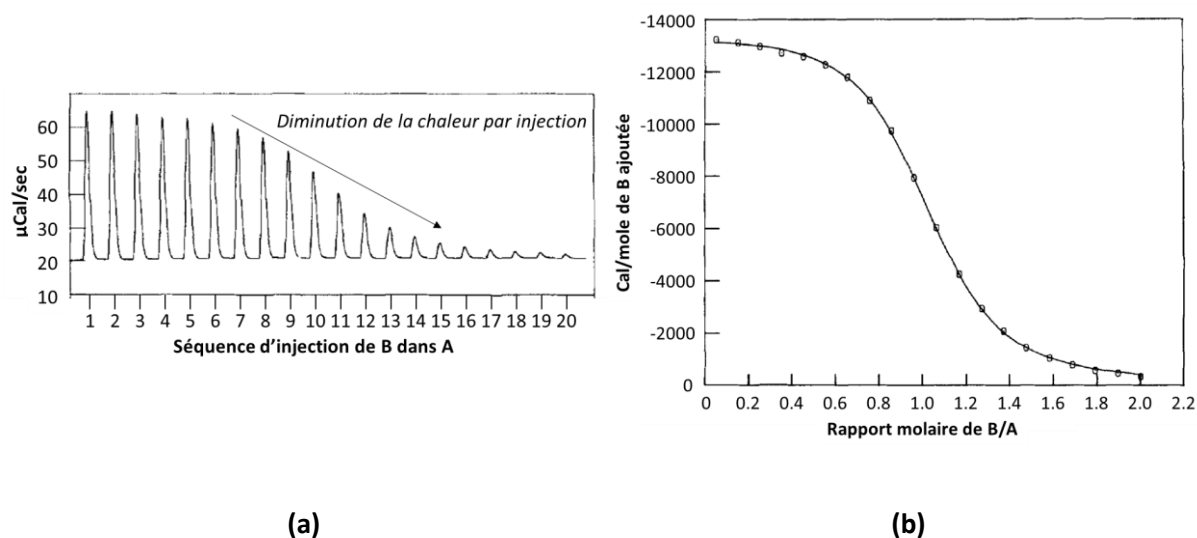


Figure 8 : Exemple représentatif des données obtenues par ITC : (a) thermogramme et (b) isothermes contenant les données brutes (points) et après régression (ligne) obtenues lors de la réalisation d'une expérience de titration d'une molécule A par une molécule B. D'après [81].

Reposant sur un principe de titration et de traitement itératif des données, cette technique donne un accès direct aux paramètres  $\Delta H^\circ$  et  $K_f$  d'un système étudié (Figure 8 (b)) [81]. La connaissance de ces deux paramètres thermodynamiques offre la possibilité de déterminer  $\Delta S^\circ$  et  $\Delta G^\circ$ . De plus, le modèle mathématique descriptif des données est défini selon la stœchiométrie envisagée du complexe, 1:1, 1:2 ou 2:1 (CD:I). Il en résulte que, par l'observation des résidus de la régression, la stœchiométrie du complexe peut également être définie à partir des expériences ITC [82]. Cette technique d'analyse permet également de déterminer la capacité calorifique  $\Delta C_p$  du complexe grâce à la réalisation d'expériences de titration successives à différentes températures. Cette grandeur thermodynamique apporte des informations, complémentaires à celles obtenues par l'enthalpie et l'entropie, concernant l'exposition des groupements hydrophobes aux molécules d'eau, influencée par l'inclusion dans la cavité des CDs [83].

La précision de la mesure de  $K_f$  est cependant une limite observée en ITC, particulièrement dans le cas d'un système dont la constante est faible ( $< 500 \text{ M}^{-1}$ ), ce qui est souvent rencontré avec les CDs. Un effort a donc été entrepris pour diminuer les incertitudes sur la détermination de  $K_f$  par la mise en œuvre de différentes expériences. En effet, les deux approches considérées comme classiques, réalisées par ITC, sont la titration simple et la titration en présence d'un compétiteur. Néanmoins, il a été montré que la réalisation d'une expérience complémentaire de relargage des complexes permet, en fonction des valeurs de constantes d'association, de minimiser l'erreur associée à la mesure de  $\Delta H^\circ$  et  $K_f$ . En effet, Landy et coll. ont montré que la réalisation d'une série d'expériences complémentaires

et le traitement simultané de l'ensemble des données obtenues permettent de réduire significativement l'incertitude sur la valeur de  $K_f$  déterminée [84].

Une des limites de l'analyse des complexes par ITC est la nécessité d'utiliser une solution aqueuse de la substance étudiée, en absence de CDs, à une concentration suffisante pour pouvoir observer les chaleurs générées lors de la formation des complexes. Une valeur de 0.5 mM est suffisante, mais représente parfois un frein pour les composés considérés comme insolubles dans l'eau, telles que les substances actives de classes BCS II et IV [84]. Enfin, il est à noter que l'observation de variation de chaleur lors des expériences de titration n'est pas spécifique à la formation de complexes d'inclusion, tout phénomène physico-chimique peut en être à l'origine. C'est pourquoi la réalisation d'expériences complémentaires, par RMN principalement, est nécessaire afin d'associer les paramètres thermodynamiques déterminés à un complexe d'inclusion.

#### 1.1.4.2.2. Méthodes développées pour l'analyse des complexes d'inclusion

##### 1.1.4.2.2.1. Diagrammes de solubilité de phase

Afin de déterminer l'efficacité de l'effet solubilisant des CDs, l'expérience de diagramme de solubilité de phase a été initialement décrite par Higuchi et Connors en 1965 et consiste à mesurer la solubilité aqueuse d'un composé en fonction de la concentration en CDs [85]. L'ajout du composé d'intérêt sous forme solide, en excès, permet de mesurer l'effet solubilisant des cyclodextrines tant que la phase solide est présente. Plusieurs allures de diagramme peuvent être obtenus, comme observé sur la Figure 9 (a).

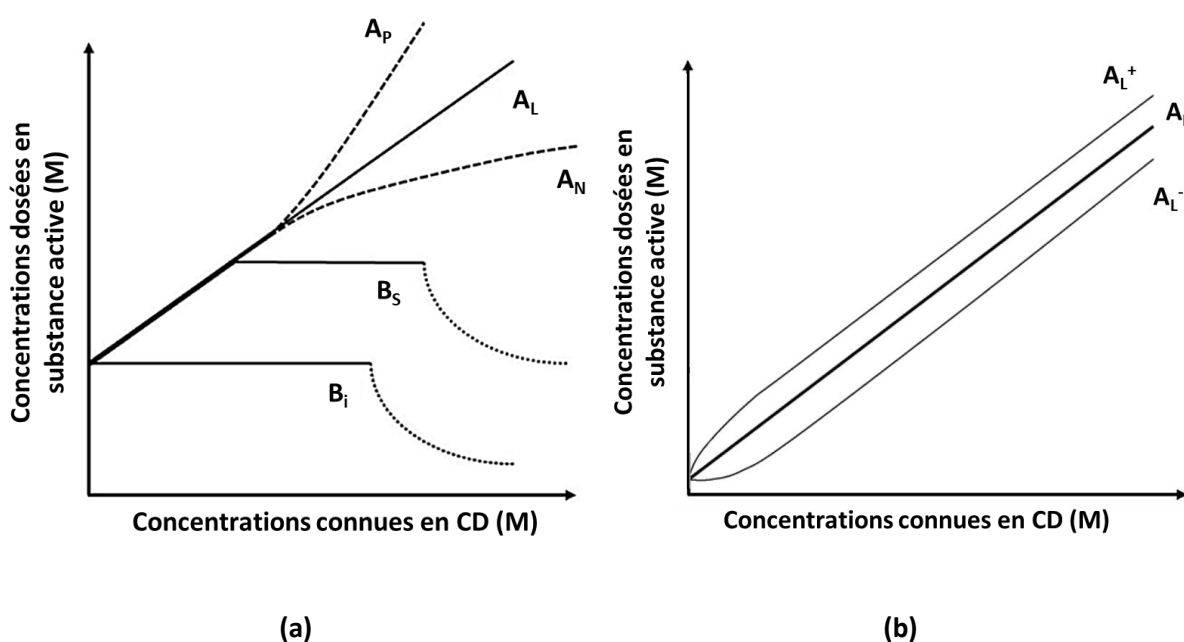


Figure 9 : (a) Illustration des allures des diagrammes de phases définissant leur type A ou B et leur sous-type  $A_P$ ,  $A_L$ ,  $A_N$ ,  $B_S$  et  $B_i$ , d'après [12]. (b) Illustration des dérives observées des diagrammes de phase de type  $A_L$  à l'approche de l'intersection, en absence de CD, définissant les type  $A_L^+$  et  $A_L^-$ , d'après [86].

Les diagrammes de phase se divisent en 2 catégories principales: les types A et B. Parmi les types A, trois sous-types se distinguent :  $A_L$ ,  $A_P$  et  $A_N$  [12]. Les diagrammes  $A_L$  sont linéaires, quelle que soit la concentration en cyclodextrines, ces types de diagrammes de phases sont généralement obtenus lors de la formation de complexes de stœchiométrie 1:1 ou un excès de CDs (2:1 et plus). Les sous-types  $A_P$  et  $A_N$  ont une première partie linéaire suivie respectivement d'une augmentation et diminution de la pente. L'obtention de ces sous-types est généralement attribuée à la formation de complexe de stœchiométrie supérieure, avec un nombre supérieur d'invités dans le cas des  $A_P$ . L'interprétation correcte de ces sous-types est toutefois difficile dans la mesure où l'augmentation de la concentration en CD peut d'une part modifier les propriétés physico-chimiques du milieu et d'autre part peut contraindre le système à adopter une stœchiométrie supérieure. De plus, lors de la réalisation de diagrammes de phase sur une gamme étendue en concentration de CDs, leur capacité (ou celle des complexes formés) à former des agrégats en solution peut également générer un effet solubilisant ou inversement [87]. Deux sous-type de diagrammes de phase  $A_L$  ont été décrits,  $A_L^+$  et  $A_L^-$ , correspondant respectivement à une déviation positive et négative de la pente à de faibles concentrations en CDs. Les diagrammes de type B sont caractérisés par la présence d'un plateau suivi d'une diminution de la solubilité de la substance étudiée à de hautes concentrations en CDs. Le sous-type  $B_S$  présente un effet solubilisant à de faibles concentrations en CD alors que le sous-type  $B_i$  ne montre aucun effet solubilisant des CDs. Ces allures peuvent être observées lors de l'utilisation des CDs naturelles, mais rarement avec leurs dérivés dont la solubilité aqueuse est nettement supérieure. Généralement, l'obtention de ces types B est attribuée à la formation d'un complexe insoluble dans l'eau [12]. Lors de l'obtention d'un digramme de type  $A_L$ , la régression linéaire de la droite obtenue est souvent utilisée afin de déterminer la constante d'association  $K_f$  à partir de l'Équation 4.

*Équation 4 : Equation du calcul de la constante d'association  $K_f$  d'un complexe d'inclusion de stœchiométrie 1:1 à partir d'un diagramme de phase de type  $A_L$ .*

$$K_{f_{1:1}} = \frac{Pente}{S_0 \times (1 - pente)}$$

*Avec  $K_{f_{1:1}}$  la constante d'association, Pente la pente de la régression linéaire du diagramme de phase et  $S_0$  la solubilité intrinsèque de la substance étudiée.*

Il est fréquemment observé que la valeur de  $S_0$  utilisée par les auteurs soit l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire,  $S_{int}$ , au lieu d'une réelle mesure de  $S_0$ . Cette approximation est la source de nombreuses disparités et incertitudes pour la détermination des constantes d'association basée sur les diagrammes de phases. Dans l'étude bibliographique réalisée par Connors en 1995, les valeurs de constantes d'inclusion du 4-Nitrophénol ou du 4-Nitrophénolate dans l' $\alpha$ CD ont été approximées par une loi normale, mettant en évidence un nombre non négligeable de valeurs aberrantes (Figure 10)

[24]. Il est à noter que les  $K_{f_{1:1}}$  étaient fréquemment calculés à partir des diagrammes de phases à cette époque.

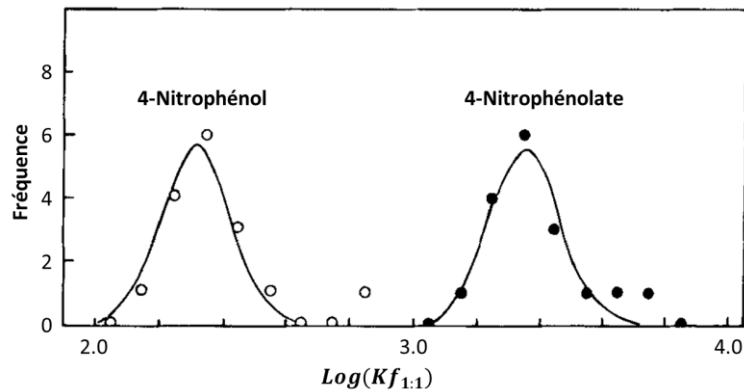


Figure 10 : Regression par une loi normale de la dispersion des constantes d'association ( $\alpha$ CD:4-Nitrophenol et  $\alpha$ CD:4-Nitrophenolate) relevées, pour un système identique, dans la littérature par Connors en 1995. D'après [24].

Un second exemple de la disparité des constantes d'association a été relevé par Loftsson *et coll.*, pour des systèmes proches (pH, tampon, température), incluant l'ibuprofène et le naproxène complexés par l'HP $\beta$ CD. Plusieurs études rapportent le calcul de leur  $K_{f_{1:1}}$  à partir des diagrammes de phases, conduisant à une forte disparité des valeurs retrouvées dans la littérature [11]. Une des raisons de l'incertitude sur la détermination de  $K_{f_{1:1}}$  à partir de diagrammes de phase est expliquée par les sous-types  $A_L^+$  et  $A_L^-$ . En effet, les déviations observées proches de l'ordonnée à l'origine expliquent pourquoi l'extrapolation linéaire des diagrammes de phases pour déterminer la solubilité intrinsèque  $S_{int}$  (au lieu de  $S_0$ ) mène à des  $K_{f_{1:1}}$  sous-estimés ( $A_L^+$ ) ou surestimés ( $A_L^-$ ). Loftsson *et coll.* ont montré, sur la base de plusieurs systèmes, que  $S_{int}$  est régulièrement différent de  $S_0$ , particulièrement dans le cas de substances peu solubles ( $S_0 < 0.01$  mg/mL), influençant directement la valeur de  $K_{f_{1:1}}$  (Équation 4) [86]. Afin de minimiser ces erreurs, une expérience de solubilité dédiée est à privilégier, utilisant de faibles concentrations en CDs pour éviter tout phénomène d'agrégation, associée à une mesure précise de  $S_0$  de la substance étudiée.

Loftsson *et coll.* en ont déduit qu'il était préférable d'introduire le terme « efficacité de complexation » (CE) lors de l'analyse des diagrammes de phases, selon l'Équation 5 [88].

Équation 5 : Relation entre CE,  $K_{f_{1:1}}$ ,  $S_0$  et la pente de diagramme de phase de type  $A_L$  correspondant.

$$CE = \frac{\text{Pente}}{1 - \text{pente}} = \frac{[CD:Invité]}{[CD]} = K_{1:1} \times S_0$$

La CE est indépendante de la valeur de  $S_0$  et correspond à un moyen permettant une comparaison fiable de l'efficacité des CDs, en terme de solubilisation, entre différents systèmes [89]. Enfin, il est à noter que le paramètre observé lors de la réalisation des diagrammes de phases est la solubilité de la



substance étudiée, il n'est donc pas possible de conclure sur la nature de l'interaction uniquement sur la base de cette expérience.

#### I.1.4.2.2.1. Constante d'association et stœchiométrie des complexes

Historiquement, la constante d'association des complexes d'inclusion et leur stœchiométrie peuvent être respectivement déterminées par la méthode de Benesi-Hildebrand (1949, [90]) et la méthode de Job (1928, [91]), des noms de leurs inventeurs. Ces deux méthodes reposent sur l'observation de la variation d'un paramètre, ici nommé  $P$ , en fonction d'une concentration variable en invité et / ou en CDs. Le paramètre  $P$  peut être de différentes natures, dépendantes de la technique analytique utilisée pour observer  $\Delta P$ , défini par l'Équation 6.

*Équation 6 : Définition générale de la variation d'un paramètre observé.*

$$\Delta P = P_{obs} - P_{libre}$$

*Avec  $\Delta P$  la variation du paramètre,  $P_{obs}$  la valeur du paramètre observé et  $P_{libre}$  la valeur du paramètre à l'état libre.*

Il est reporté l'utilisation de différentes techniques analytiques telles que l'UV-Visible, la RMN  $^1\text{H}$  ou l'expérience DOSY, menant respectivement à l'observation de  $\Delta\lambda$ ,  $\Delta\delta$  et  $\Delta D$  [77,82]. L'unique condition nécessaire à la réalisation de ces expériences, outre les limites de solubilité, est que  $\Delta P \neq 0$  et donc que  $P_{libre} \neq P_{cpx}$ . Ces deux méthodes, souvent utilisées conjointement pour l'obtention d'informations complémentaires pour la caractérisation de complexes d'inclusion en solution aqueuse reposent donc toutes deux sur l'observation de  $\Delta P$ , mais diffèrent par les conditions expérimentales mises en œuvres [92].

La détermination de la constante d'association par la méthode de Benesi-Hildebrand consiste en l'analyse d'une série de solutions dont la concentration de l'espèce observée (invité ou CD) est fixe, et celle de l'espèce non observée (CD ou invité) varie, toujours en large excès. Ces conditions expérimentales de titration permettent une approximation selon laquelle la fraction complexée de l'espèce non-observée est négligeable, menant à l'obtention de l'Équation 7 dans le cas où l'invité est observé.

*Équation 7 : Equation de Benesi-Hildebrand dans le cas de l'observation d'un paramètre  $P$  de la molécule invitée en présence d'un large excès de CD [90].*

$$\frac{1}{\Delta P} = \frac{1}{Kf_{1:1} * \Delta P_{max}} \times \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{\Delta P_{max}}$$

*Avec  $\Delta P_{max} = P_{cpx} - P_{libre}$  la variation maximale observable du paramètre  $P$ .*

Graphiquement, le tracé de cette fonction affine permet d'obtenir directement  $P_{cpx}$  grâce à l'ordonnée à l'origine et  $Kf_{1:1}$  à partir de la pente. Cependant, il est à noter que l'approximation liée à

la concentration et la linéarisation sont deux sources d'erreur sur la détermination de la constante d'association, pouvant mener à des valeurs erronées selon le système étudié. De plus, cette méthode n'est valable que pour la détermination des constantes d'association des complexes de stœchiométrie 1:1. Enfin, il a été montré que le coefficient de corrélation obtenu par la regression affine n'est pas représentatif de l'erreur sur la détermination de  $Kf_{1:1}$ , ce qui se traduit par une impossibilité d'appréciation des résultats obtenus [93].

La détermination de la stœchiométrie par la méthode de Job est une expérience de titration également. Cette titration est réalisée de sorte à ce que la concentration totale (CD + invité) soit fixe, en faisant varier les proportions CD/Invité. L'observation des variations de la propriété observée, ici de la CD, permet de tracer la courbe de Job's plot,  $\Delta P \times [CD]$  en fonction de la fraction molaire en CD. Le sommet de la courbe obtenues indique la fraction molaire du complexe formé, et donc de la stœchiométrie (Figure 11). L'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$  est intéressante pour la réalisation des Job's plot car elle permet l'observation des  $^1\text{H}$  portés par les fonctions directement impliquées dans le complexe d'inclusion, tels que les  $^1\text{H}$  de la CD orientés vers l'intérieur de la cavité et / ou ceux de l'invité déterminés comme inclus par l'expérience ROESY [18,94].

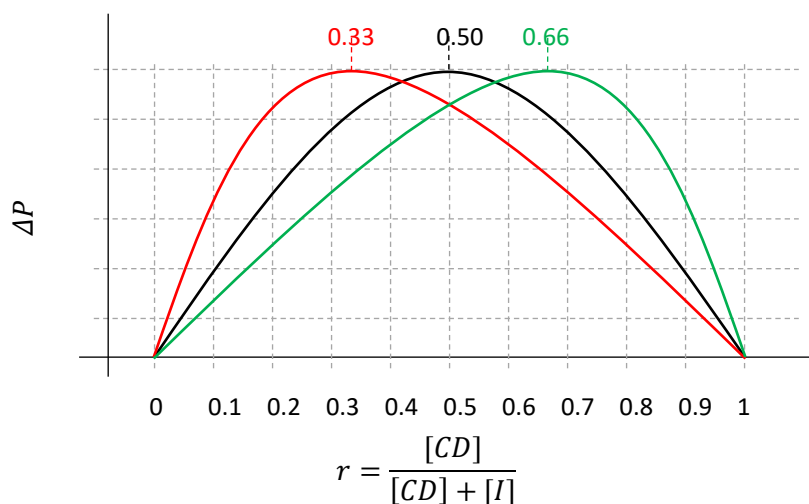


Figure 11 : Représentation des courbes de Job's plot obtenues lors de l'observation de  $\Delta P$  sur la CD étudiée, correspondant à une stœchiométrie (CD:I) de 1:1 (noir), 1:2 (rouge) ou 2:1 (vert).

Basé sur des modèles mathématiques descriptifs des complexes, les constantes d'association et les stœchiométries peuvent aujourd'hui également être calculées à partir de différentes techniques d'analyse par la mise en œuvre de titration [82]. En analogie avec les traitements de données réalisés lors d'expériences d'ITC, différents modèles sont utilisables pour effectuer la regression des données selon la stœchiométrie, principalement 1:1, 1:2 et 2:1. Ces approches permettent également, via la comparaison des résidus de la regression, de déterminer la stœchiométrie du complexe formé par la qualité de l'adéquation du modèle avec le système étudié.

D'après cette approche de traitement mathématique itératif (en opposition du traitement graphique), une étude a montré, du point de vue théorique, que la méthode graphique de Job pouvait dans certaines conditions être inefficace pour décrire convenablement un système et les différentes stœchiométries présentes. Il y est reporté que lors de la présence de complexes de stœchiométrie 1:1 et 1:2 dans un même système, l'approche de Job masque la présence du complexe 1:2 si i) la concentration totale est faible (inférieure à 10 mM) et ii) si la constante  $Kf_{1:2}$  est inférieur à  $Kf_{1:1} \div 4$  (Figure 12) [95].

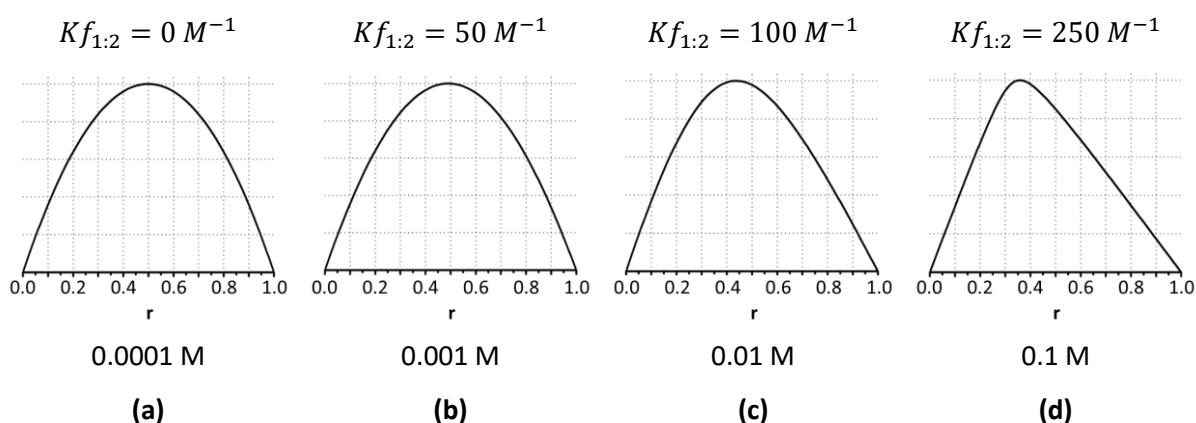


Figure 12 : Illustration des Job's plot théoriques dans le cas d'un  $Kf_{1:1} = 1000 M^{-1}$  en fonction de la valeur de  $Kf_{1:2}$  et de la concentration. Les conditions (b) et (c) ne permettent pas la détection de la stœchiométrie 1:2 en solution alors que la condition (d) mène à l'obtention d'un sommet aux alentours de 0.33. D'après [95].

Il est à noter que ces résultats théoriques sont obtenus par l'utilisation de  $Kf_{1:1}$  d'une valeur de 1000  $M^{-1}$ , et considèrent que le facteur réponse du complexe de stœchiométrie 1:2 est deux fois plus important que celui de stœchiométrie 1:1. Ces résultats théoriques ont été démontrés expérimentalement, mettant en évidence des stœchiométries de 1:1 par l'expérience de Job alors qu'une regression adéquate est observée lors de l'application d'un modèle décrivant la présence des stœchiométries 1:1 et 1:2 (Figure 13). En effet, les résidus observés avec l'application du modèle composite sont aléatoires, contrairement à ceux observés lors de l'application du modèle 1:1, permettant de conclure que le modèle composite est davantage approprié.

Néanmoins, il convient de préciser que les expériences rapportées dans cette étude déterminent des valeurs de constantes d'association  $Kf_{1:2}$  généralement significativement inférieures à  $Kf_{1:1}$  ( $Kf_{1:2} < 5\% Kf_{1:1}$ ), ce qui explique que les stœchiométries correspondantes ne soient pas détectées par l'expérience de Job [95]. Dans le domaine des CDs, les valeurs de constantes d'association des complexes ayant une stœchiométrie supérieure à 1:1 est généralement significativement inférieure à celle correspondant à la formation du complexe 1:2 [12]. Il découle de ces observations que dans le domaine des cyclodextrines appliquées aux formulations pharmaceutiques, la méthode graphique de Job permet d'obtenir des informations suffisantes à l'application des complexes, sous réserve de

conditions expérimentales appropriées. En effet, un complexe de stœchiométrie 1:2 avec une très faible constante d'association, donc masqué dans le Job's plot, sera dissocié instantanément lors de la dilution après ingestion. Ayant connaissance de l'effet de la concentration et des constantes de formation sur l'interprétation des Job's plot, cette méthode peut être utilisée si les conclusions prennent en considération la présence possible d'un second équilibre dont la constante de formation est significativement inférieure à celle déterminée [96].

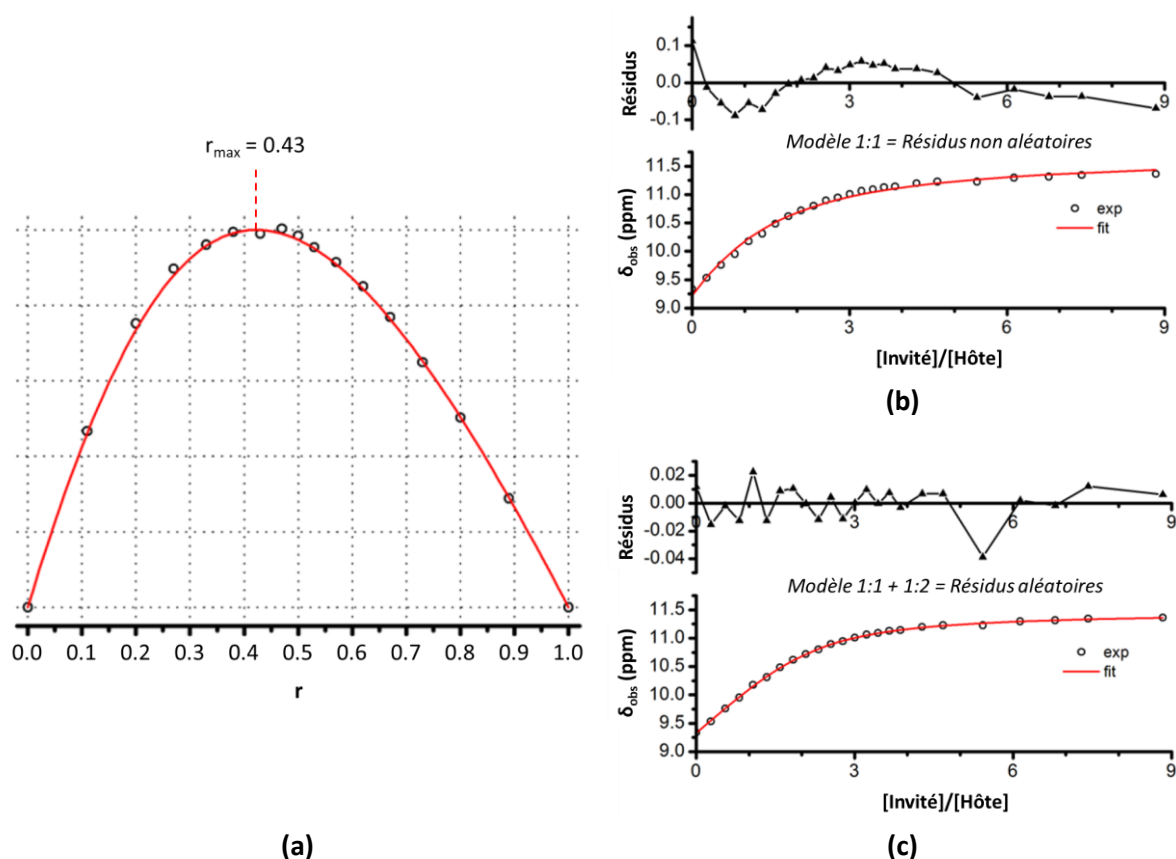


Figure 13 : Pour un même système : (a) Exemple d'un Job's plot masquant la présence de la stœchiométrie 1:2 (hôte:invité) en solution. (b) Regression et résidus de données de titration selon un modèle simple de stœchiométrie 1 :1. (c) Regression et résidus de données de titration selon un modèle composite de stœchiométrie 1:1 et 1:2. D'après [95].

Il convient de préciser que ces méthodes, consistant à mesurer la variation d'une propriété physico-chimique (absorbance  $\lambda$ , coefficient de diffusion  $D$ , fréquence de résonance  $\delta$ , etc...) pour déterminer un paramètre thermodynamique restent des méthodes indirectes de la mesure de  $K_f$ . En effet, bien qu'ayant montré leur efficacité à travers de nombreuses études, ces approches assument le fait que ces variations de propriétés sont directement et uniquement liées à la formation du complexe d'inclusion. Pour cette raison, l'ITC reste, par la mesure directe des chaleurs, la technique d'analyse la plus appropriée pour déterminer les paramètres thermodynamiques régissant la formation d'un complexe d'inclusion à base de cyclodextrines. Afin d'obtenir une caractérisation précise et complète d'un complexe d'inclusion en solution, considérant la preuve d'inclusion, son équilibre

thermodynamique et sa géométrie, il est donc nécessaire de combiner plusieurs techniques d'analyses.

#### I.1.4.3. Caractérisation des complexes par spectrométrie de masse (phase gazeuse)

##### I.1.4.3.1. Observation des complexes d'inclusion en phase gazeuse

La caractérisation en phase gazeuse de molécules ou d'associations non-covalentes appelle l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS). Cette technique d'analyse, rapide et sensible, permet la détection et la manipulation en phase gazeuse de molécules ionisées par la source d'ionisation. Parmi les différentes sources d'ionisation existantes, l'électrospray (ESI) est une méthode d'ionisation douce, qui permet l'observation en phase gazeuse d'objets supramoléculaires comme les complexes d'inclusion, sans provoquer leur fragmentation durant l'étape d'ionisation [97]. Cependant, quelques limites et ambiguïtés existent lors de l'observation, en phase gazeuse, des complexes ionisés et détectés par ESI-MS.

D'une part, certaines forces présentes en solution sont conservées en phase gazeuse telles que les interactions électrostatiques, mais d'autres ne peuvent plus, par nature, être toujours présentes : les interactions hydrophobes ou les liaisons hydrogène impliquant le solvant. La diminution du nombre d'interactions en phase gazeuse en comparaison de la phase liquide tend vers une observation privilégiée des complexes d'inclusion dont les molécules invitées sont en bon accord avec la taille de la cavité des CDs et dont les forces électrostatiques, toujours présentes en phase gazeuse, suffisent à maintenir une certaine stabilité du complexe. De plus, le principe d'échange rapide présent lors de la formation d'objet supramoléculaire en solution est absent en phase gazeuse, donc si les conditions de changement d'état engendrent la décomposition du complexe non-covalent, cette dissociation est irréversible [98].

D'autre part, les résultats de l'analyse des complexes d'inclusion par spectrométrie de masse peuvent être ambigus car les  $m/z$  (rapport masse/charge) correspondant à l'association CD:invité peuvent être i) le complexe d'inclusion recherché, ii) un complexe non spécifique généré dans la source d'ionisation ESI ou iii) un mélange de ces deux associations. Afin de déterminer la nature des associations observées, Gabelica *et coll.* ont démontré que les homologues linéaires des CDs peuvent être utilisés comme moyen de contrôle. Leur étude, portant sur différents complexes d'inclusion connus avec l' $\alpha$ CD et des invités aux longueurs de chaîne aliphatiques différentes, a été réalisé par ESI-MS. Il a été observé, dans un premier temps, que l'intensité des associations était similaire pour tous les complexes, alors que les constantes d'association connues en phase liquide sont croissantes avec la longueur de chaînes. Dans un second temps, l'utilisation de l'intensité des complexes non spécifiques

observés avec le maltohexaose (homologue linéaire de l' $\alpha$ CD) a permis de retrouver, après correction, une corrélation entre l'intensité des complexes avec l' $\alpha$ CD et leur constantes d'association [99]. Une seconde approche reportée afin de vérifier si l'association CD:invité est spécifique ou non spécifique consiste en l'injection de solutions à différents rapports molaires CD:invité. Si l'intensité du m/z recherché est indépendante du rapport molaire de la solution, alors l'association observée peut être associée à un complexe d'inclusion spécifique [100].

Enfin, une dernière ambiguïté peut être relevée concernant la source d'ionisation ESI. Une étude rapporte une comparaison de complexes d'inclusion par spectrométrie de masse entre la rutine et l' $\alpha$ CD, la  $\beta$ CD et la  $\gamma$ CD. Les expériences mises en œuvre par MS (compétition, dilution, fragmentation CID) ont toutes corrélé avec les diagrammes de phases réalisés en solution. Néanmoins, les solutions injectées en MS ont été préparées dans le méthanol alors que les diagrammes de phase ont été réalisés dans l'eau. Pourtant, les spectres de fragmentation MS/MS de ce complexe ont montré des fragmentations différentes en fonction des CDs, parfois spécifiques de l'invité, renforçant l'hypothèse d'un réel complexe d'inclusion [100]. Cette étude part donc du postulat selon lequel le complexe se forme aussi bien dans l'eau que dans le méthanol, alors que l'absence d'eau diminue fortement les interactions impliquées dans la formation des complexes d'inclusion. Au vu du mécanisme d'ionisation de la source ESI, au cours duquel une désolvatation progressive a lieu, jusqu'à la répulsion des charges due à leur forte proximité, l'hypothèse que l'inclusion observée soit générée par cette proximité imposée peut être émise.

La spectrométrie de masse peut donc permettre l'observation des complexes d'inclusion en phase gazeuse mais nécessite quelques précautions opératoires et d'interprétation. De plus, des techniques couplées à la MS ont permis d'améliorer la différenciation des associations observées, notamment grâce aux techniques de fragmentation MS/MS et à la mobilité ionique [101].

#### I.1.4.3.2. Les techniques de dissociation

La fragmentation MS/MS est une expérience réalisable lors d'une analyse par MS, consistant à sélectionner un m/z puis à appliquer une énergie, dont la nature varie selon le type de fragmentation employé. L'apport énergétique mène à la rupture, selon la quantité appliquée, des liaisons non-covalentes mais également covalentes. Classiquement, cette expérience est utilisée afin de déterminer la formule développée d'un ion ou les groupes fonctionnels qu'il possède.

Certaines méthodes d'évaluation de la force de l'association d'un complexe observé par ESI-MS ont été reportées, notamment l'utilisation de plusieurs tensions de cône ou d'énergie de collision, pour évaluer la dissociation du complexe observé [102]. L'utilisation de l'énergie de collision nécessaire à dissocier 50% du complexe peut être utilisée pour comparer la stabilité de différents systèmes, comme observé sur la Figure 14, issue d'une étude comparant la stabilité des complexes entre différents acides

aminés et la  $\beta$ CD [103]. Le principe est identique lors de l'utilisation de tensions de cône croissantes, générant la dissociation du complexe et la possibilité de tracer une courbe analogue.

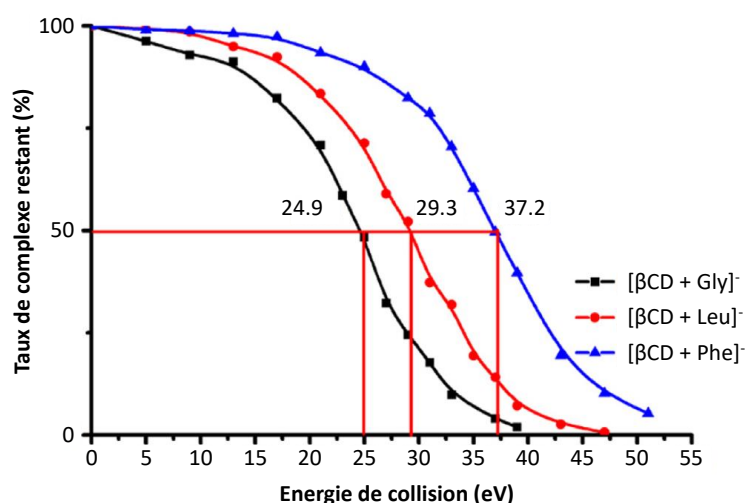


Figure 14 : Courbes de l'intensité résiduelle de l'ion correspondant au complexe d'inclusion entre différents acides aminés et la  $\beta$ CD, après fragmentation MS/MS à différentes énergies de collision. Ces courbes mènent à l'obtention de l'énergie nécessaire à dissocier 50% du complexe. D'après [103].

Théoriquement, l'analyse des spectres MS/MS peut également permettre d'observer des fragments caractéristiques du complexe, correspondant par exemple à la CD étudiée associée à une partie de l'invité. Néanmoins, certaines techniques, dont la fragmentation CID (collision induced dissociation) ou HCD (high collision dissociation), mènent prioritairement à la dissociation des liaisons les plus faibles, donc des interactions non-covalentes telles que celles impliquées dans les complexes d'inclusion. La fragmentation ECD (electron collision dissociation) peut en revanche être citée comme étant une technique de fragmentation MS/MS permettant de conserver les liaisons non-covalentes. Une étude impliquant la  $\beta$ CD et différents peptides a mis en évidence cette différence entre les modes de fragmentation. En effet, la fragmentation ECD a permis l'observation de fragments composés de la cyclodextrine intacte associée à différents fragments du peptide inclus. A l'inverse, la fragmentation CID a mené à une dissociation du complexe et à l'observation de la CD seule et / ou du peptide seul [104]. L'étude du complexe d'inclusion entre la moringin et l' $\alpha$ CD a cependant mis en évidence une fragmentation caractéristique du complexe d'inclusion (Figure 15) par fragmentation CID. De plus, la géométrie déterminée par cette expérience est en accord avec celle déterminée par l'expérience RMN ROESY en solution, démontrant la conservation de l'agencement supramoléculaire de ce complexe de la phase liquide vers la phase gazeuse. Dans ce cas, la présence d'une liaison hydrogène forte entre l' $\alpha$ CD et la moringin a permis d'expliquer i) la visibilité du complexe après son ionisation et ii) la fragmentation spécifique observée [92].

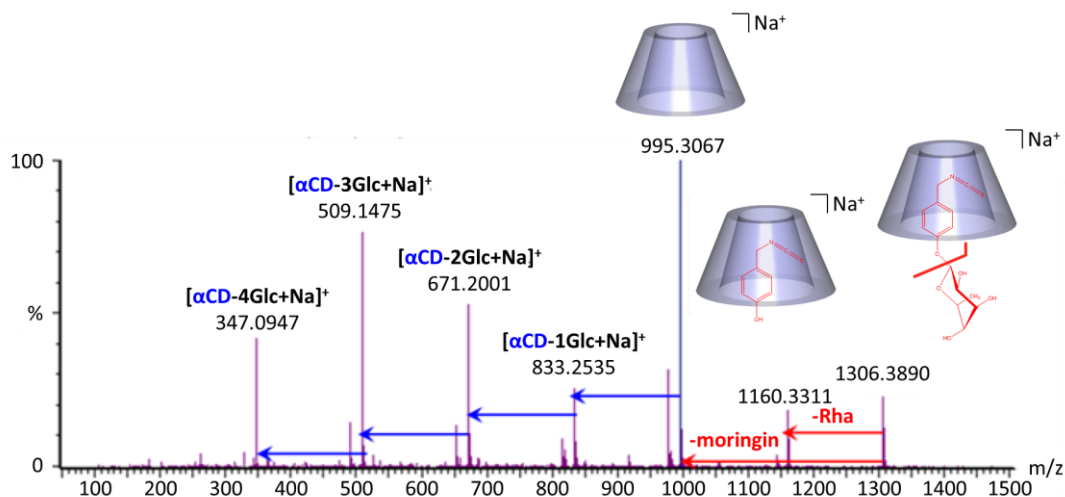


Figure 15 : Spectre MS/MS (fragmentation CID) du complexe  $[\alpha\text{CD}:\text{Moringin} +\text{Na}]^+$  montrant un fragment caractéristique de l'inclusion ( $m/z$  1160.33). D'après [92].

#### I.1.4.3.3. La mobilité ionique

La mobilité ionique (IM) est une technique séparative, en phase gazeuse, qui peut être couplée à un spectromètre de masse, exploitant alors sa source d'ionisation et son détecteur. Cette technique est souvent intégrée au spectromètre de masse sous forme d'une cellule de mobilité, les ions analysés peuvent alors être séparés selon leur masse, leur charge, leur taille et leur forme (Schéma 6 (a)). Un gaz tampon est utilisé (hélium ou diazote). De plus, le temps de dérive, analogue au temps de rétention en chromatographie, est proportionnel à une grandeur intrinsèque nommée section efficace de collision (CCS, collision cross section), qui peut être approximée comme étant la surface projetée de l'ion analysé (Schéma 6 (b)) [105].



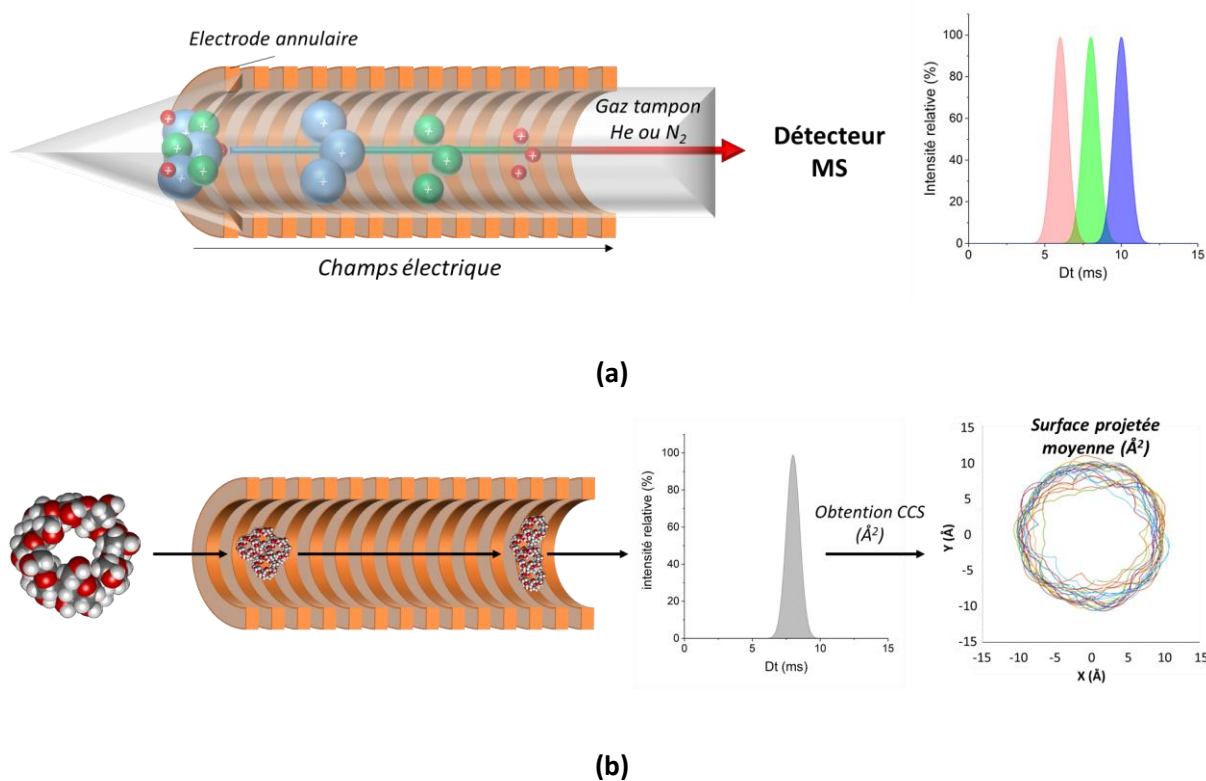


Schéma 6 : (a) Schéma d'une cellule de mobilité de type DTIM (drift tube ion mobility), du fonctionnement aux résultats obtenus. (b) Schématisation de l'analyse d'une CD par mobilité ionique, menant à la mesure de CCS, en Å<sup>2</sup>, approximée par la surface projetée de la CD.

La comparaison de la CCS des CDs, des molécules invitées seules et de l'association observée permet de définir si la taille de cette association est cohérente avec un complexe d'inclusion ou d'exclusion. En effet, une augmentation de la CCS relative (CD seule VS CD:invité) de l'ordre de 5 à 6% a été considérée comme une preuve d'inclusion de différents acides coumariques dans l' $\alpha$ CD ou la  $\beta$ CD. De plus, cette étude a rapporté l'observation d'associations sous forme doublement chargées (stœchiométrie 2:1, CD: Invité) dont la CCS est plus petite que celle de la CD sous forme de dimère. La plus haute compacité de cet objet ne peut s'expliquer que par l'inclusion de l'acide coumarique dans deux CDs, générant des interactions augmentant la proximité des deux CDs [106]. Une seconde étude, portant sur l'analyse de différents acides aminés (AA) en présence d' $\alpha$ CD ou de  $\beta$ CD a exploité la mobilité ionique pour identifier la nature des associations observées. La comparaison des CCS des CDs libres avec celles des associations CDs:AA a permis de conclure que la leucine et la phénylalanine forment des complexes d'exclusion avec l' $\alpha$ CD. A l'inverse l' $\alpha$ CD et la glycine forment un complexe d'inclusion en phase gazeuse. Il a également été conclu que le  $\beta$ CD forme des complexes d'inclusion avec les trois acides aminés étudiés (glycine, leucine et phénylalanine). Les CCS des complexes définis d'inclusion sont proches de celles des CDs libres alors que les complexes non spécifiques (exclusion) forment des objets moins compacts, se traduisant par de plus grandes CCS [103].

Enfin, l'utilisation de la mobilité ionique peut également apporter des informations conformationnelles sur les complexes d'inclusion, en comparaison avec les structures calculées par modélisation moléculaire. En effet, la CCS étant une caractéristique intrinsèque de l'ion observé, la modélisation moléculaire suivie du calcul de CCS des structures générées permet la comparaison des données théoriques et expérimentales. Cette approche a dans de nombreux cas été utilisée afin de proposer une géométrie à l'association observée par MS couplée à l'IMS [107].

#### I.1.5. Conclusion

La capacité des CDs à inclure des composés apolaires en milieu aqueux rend ces molécules particulièrement intéressantes dans de nombreux secteurs d'activité. Les effets qui peuvent découler de cette inclusion attirent particulièrement le secteur pharmaceutique, par les propriétés solubilisantes, stabilisantes et d'amélioration de la biodisponibilité ainsi que des qualités organoleptiques. De plus, les CDs naturelles et certaines CDs modifiées sont d'ores et déjà autorisées par différentes pharmacopées, dont la Pharmacopée européenne ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD). De nombreux principes actifs, dont celles classées BCS II et IV, souffrent d'une forte insolubilité aqueuse, de mauvaises qualités organoleptiques et / ou d'une faible biodisponibilité. C'est pourquoi les CDs font l'objet de nombreuses recherches pour étudier leur capacité à pallier ces problématiques de formulation. Il est notable que la littérature rapporte deux axes de recherches principaux que sont l'applicatif et le fondamental.

Les recherches applicatives portant sur l'intérêt des CDs correspondent aux expériences de diagrammes de solubilité de phase, de cinétique de dissolution, d'amélioration de la perméabilité membranaire ou de dégradations accélérées. Les informations obtenues par ces expériences offrent les informations nécessaires à déterminer si le couple CD / substance active étudié peut avoir un intérêt dans le développement de nouvelles formulations. Néanmoins, ces études manquent généralement d'études structurales, qui relèvent davantage du fondamental que de l'applicatif. Les recherches fondamentales ont pour objectif de déterminer les interactions entre les CDs et les substances étudiées. Définir si l'inclusion dans la cavité est réelle, la stœchiométrie, la géométrie d'inclusion ou la stabilité des complexes sont autant d'objectifs fixés par ces études. Atteignables par le cumul de différentes techniques et approches analytiques, ces informations contribuent à l'amélioration des connaissances sur la capacité des CDs à inclure des structures ou motifs moléculaires.

Ces deux approches sont complémentaires, l'efficacité des CDs étant démontrée par les études applicatives, motivant la continuité des recherches sur l'apport des CDs aux formulations pharmaceutiques. La rationalisation de ces résultats par les études fondamentales permet d'orienter

les recherches applicatives sur la base d'adéquations moléculaires entre CDs et substances actives connues.

## I.2. Partie 2 : Analyse des cyclodextrines

Les CDs sont exploitées dans de nombreux domaines et la caractérisation des interactions qu'elles génèrent est aujourd'hui très poussée, mais leur propre caractérisation est en comparaison assez peu étudiée. C'est particulièrement le cas des CDs modifiées qui montrent pourtant des efficacités supérieures aux CDs naturelles. La relative simplicité structurale des CDs naturelles a permis le développement de différentes méthodes de caractérisation dont certains exemples seront décrits ci-après. A l'inverse, la caractérisation des CDs modifiées obtenues en mélange est beaucoup moins décrite.

### I.2.1. Analyse des CDs purifiées

#### I.2.1.1. Analyse des CDs naturelles

Les CDs naturelles sont depuis longtemps finement caractérisées, en phase liquide et solide, avec la connaissance exacte de leur taille, forme, conformation, solubilité, etc... (Tableau 1). Malgré cela, leur conformation en phase gazeuse fait toujours l'objet de recherches actuelles, particulièrement après le processus d'ionisation lors de leur analyse par spectrométrie de masse.

Une étude a investigué l'énergie de collision nécessaire à la diminution de 50% de l'intensité des CDs naturelles pour comparer leur stabilité avec leurs homologues linéaires en phase gazeuse. Il en est ressorti que, pour des adduits de même nature ( $[M+Na]^+$ ), la stabilité des oligosaccharides cycliques est supérieure à celle des oligosaccharides linéaires de même taille. Cette observation peut être interprétée par une plus haute coordination de l'ion  $Na^+$  dans le cas des oligosaccharides cycliques [108]. De même, une seconde étude, a exploré le mécanisme de fragmentation de la  $\beta$ CD. Les spectres de fragmentation MS/MS (fragmentation CID) de  $[\beta CD+H]^+$  ne montrent que des pertes successives de 162 uma, correspondant à une perte de neutre d'un ou plusieurs glucoses déshydratés. Cette observation peut s'expliquer par une première étape de linéarisation de la CD, générant un ion oxonium de même m/z. A partir de cet ion, seules des pertes de 162 u sont possibles dans la mesure où il n'y a plus d' $H^+$  libre, consommé pour la linéarisation. Il est à noter que cette hypothèse de mécanisme de fragmentation part du postulat selon lequel l'ion  $H^+$  de l'adduit  $[\beta CD+H]^+$  est localisé sur un oxygène d'une liaison glycosidique, facilitant son ouverture (Schéma 7) [109].

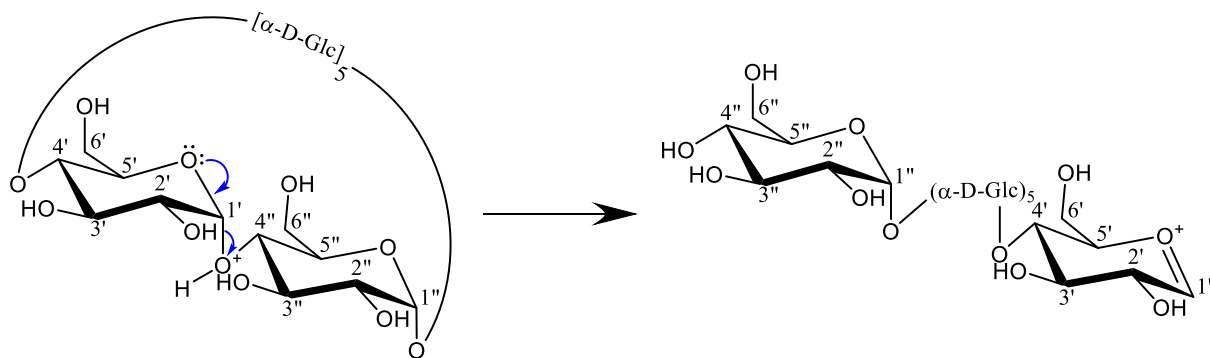
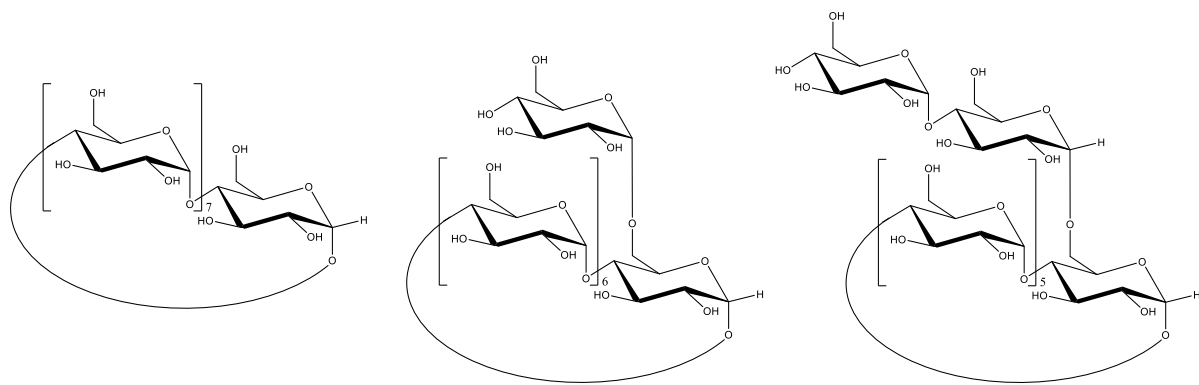
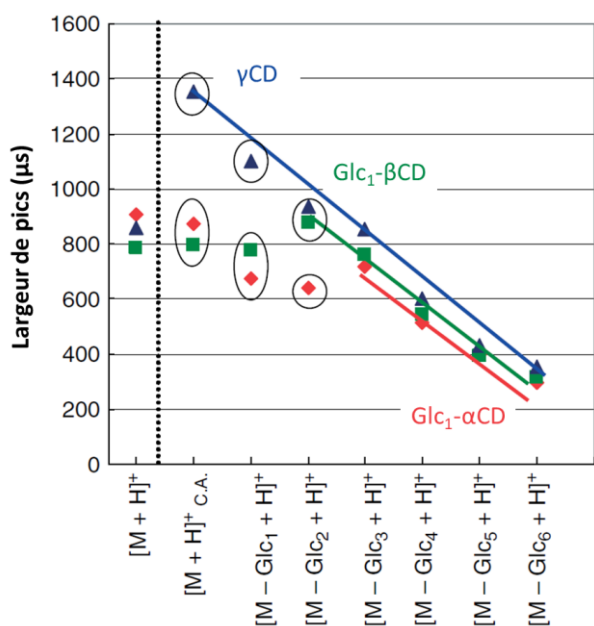


Schéma 7 : Mécanisme d'ouverture de la  $\beta$ CD lors de la fragmentation de l'adduit  $[\beta\text{CD}+\text{H}]^+$ , proposé sur la base d'une série d'expériences MS/MS. D'après [109].

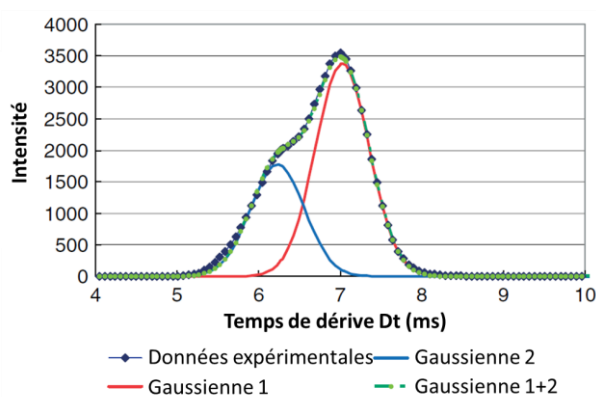
Cette première étape de linéarisation a également été proposée suite à des expériences réalisées par mobilité ionique dans une autre étude, réalisée avec l'objectif de définir expérimentalement si l'ouverture de la  $\gamma$ CD, sans changement de  $m/z$  et donc non détectable, a lieu lors de l'application d'une énergie de collision. Pour ce faire, trois isomères ont été utilisés, la  $\gamma$ CD, la  $\text{Glc}_1\text{-}\beta\text{CD}$  et la  $\text{Glc}_2\text{-}\alpha\text{CD}$  (Figure 16 (a)). L'application d'une énergie de collision en amont de la cellule de mobilité a significativement augmenté la largeur du pic de mobilité correspondant au  $m/z$  de l'adduit  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $\gamma$ CD (Figure 16 (b)). De manière similaire, la perte d'un glucose sur le  $\text{Glc}_1\text{-}\beta\text{CD}$  ne diminue pas la largeur du pic de mobilité, ce qui est expliqué par une compensation entre une diminution du nombre de glucose et l'augmentation de la flexibilité liée à la linéarisation. La même observation a été réalisée lors de la perte de deux glucoses par la fragmentation du  $\text{Glc}_2\text{-}\alpha\text{CD}$ . En effet, la largeur des pics de mobilité ionique est un indicateur de la présence de différentes conformations non-résolues par cette technique d'analyse. La Figure 16 (c) met en évidence la présence de deux distributions (i.e. deux populations) dans la trace de mobilité du fragment  $[\text{Glc}_1\text{-}\beta\text{CD} - \text{Glc}_1 + \text{H}]^+$  après l'application d'une énergie de collision, attribuées à la conformation cyclique et linéaire [110].



(a)



(b)



(c)

Figure 16 : (a) Structure des isomères utilisés, la  $\gamma$ CD (gauche), la  $Glc_1$ - $\beta$ CD (milieu) et la  $Glc_1$ - $\alpha$ CD (droite). (b) Tracé de la largeur à mi-hauteur des pics de mobilité des ions parents ( $\gamma$ CD, bleu ;  $Glc_1$ - $\beta$ CD, vert ;  $Glc_1$ - $\alpha$ CD, rouge) avant fragmentation (gauche) et après l'application d'une énergie de collision (droite). (c) Trace de mobilité correspondante à  $[M - Glc_1 + H]^+$  après l'application d'une énergie de collision sur  $[Glc_1$ - $\beta$ CD +  $H]^+$ . D'après [110].

La mobilité ionique apparaît comme une technique d'analyse complémentaire ayant permis d'apporter des données expérimentales confortant les propositions de mécanismes et de conformations en phase gazeuse. Cette technique a été utilisée, en 1997 afin de discriminer les CDs naturelles et leur fragments, les différenciant avec succès (Figure 17 (a)) [111]. La même année, l'utilisation des CCS obtenues par mobilité ionique (gaz tampon hélium) de différents oligosaccharides, dont l' $\alpha$ CD, a été mise en comparaison avec des données théoriques obtenues par modélisation moléculaire pour déterminer l'emplacement de l'ion  $Na^+$ , après ionisation par MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [112]. Cette étude a montré que les CCS expérimentales en accord avec les modèles théoriques correspondaient aux structures les plus compactes, dont la conformation a été déterminée comme contrainte par l'ion  $Na^+$  et ses coordinations avec les différents hydroxyles libres des sucres.

Aujourd'hui, les techniques de mobilité ionique modernes sont davantage résolutive que la version historique, le DTIMS, utilisée dans les deux études précédentes [113]. Néanmoins, le DTIMS est une technologie permettant la mesure directe de la CCS – dépendante du gaz utilisé (l'hélium ou diazote principalement) – par l'équation de Mason-Schamp [105], contrairement aux technologies modernes comme le TWIMS (Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry) ou le TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry). En effet, les CCS mesurées par ces deux techniques ne peuvent être obtenues que par une calibration, basée sur des composés dont la CCS est connue et mesurée par DTIMS. De plus, la nature du gaz tampon utilisé dans la cellule de mobilité influence la CCS mesurée, menant à l'obtention de  $CCS_{He}$  ou de  $CCS_{N_2}$ , avec de l'hélium et du diazote respectivement. Ce n'est qu'en 2018 qu'une publication a rapporté la mesure directe des CCS, par DTIMS utilisant le  $N_2$  comme gaz tampon, des trois CDs naturelles sous formes de différents adduits ( $[CD+H]^+$ ,  $[CD+Na]^+$ ,  $[CD+K]^+$ ,  $[CD-H]^+$ , dimères, etc.). La connaissance de ces valeurs de CCS est d'autant plus importante avec les cyclodextrines dans la mesure où ces composés sont cycliques alors que les calibrants généralement utilisés sont linéaires, pouvant instaurer un biais lors de la détermination des CCS sur la base du temps de dérive. Il est à noter que la CCS des 3 CDs naturelles n'évolue pas linéairement en fonction du nombre de glucose, dans l'hélium comme dans le diazote, à l'inverse des homologues linéaires (Figure 17 (b)). Cette observation se justifie par les différences de flexibilité, notamment de la  $\gamma$ CD, autorisant à augmenter sa compacité en phase gazeuse [114].

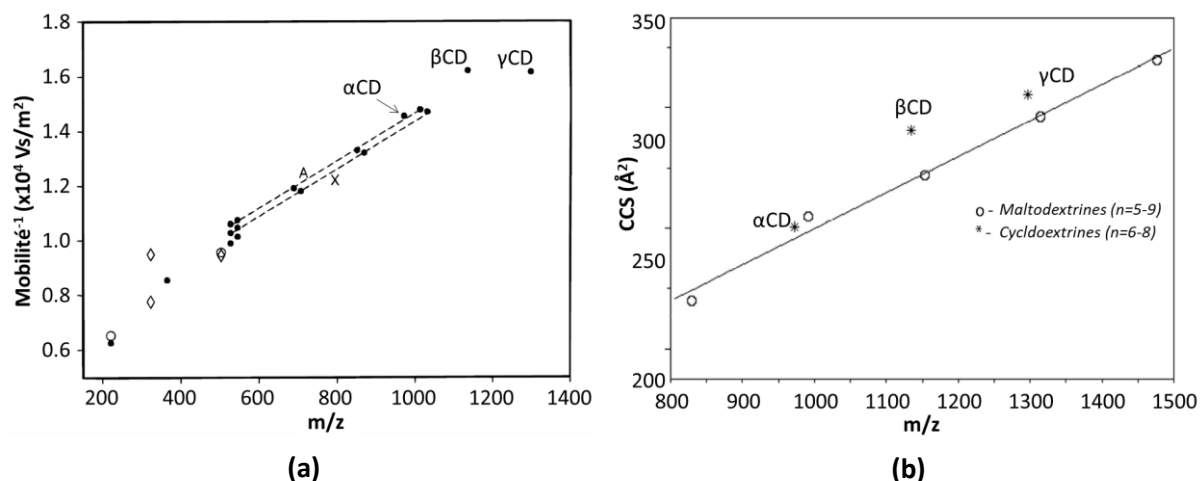


Figure 17 : (a) Mesure de la mobilité des CDs naturelles (annotées) et de leur fragments (reliés par les pointillés) par DTIMS utilisant de l'hélium comme gaz tampon. (b) Mesure des CCS (issues mobilité) des CDs naturelles (étoiles) et de dextrans linéaires (rond) par DTIMS utilisant le diazote comme gaz tampon. D'après [111,114].

Le placement de la charge  $Na^+$  sur les CDs en phase gazeuse est obtenu grâce à la combinaison d'une approche pratique et théorique, dont le critère de comparaison est la CCS (i.e. la taille). Une équipe a souhaité, par le biais d'une technique récemment mise en avant pour l'analyse des sucres par spectrométrie de masse, apporter de nouvelles données expérimentales pour appuyer les propositions existantes. Le couplage de la mobilité ionique, de l'infra-rouge (IR) cryogénique en phase gazeuse et

de la spectrométrie de masse a ainsi été utilisé. D'une part, l'utilisation de la mobilité ionique haute résolution (TWIMS cyclique) a permis de déterminer la formation d'une unique conformation de  $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$  lors de l'étape d'ionisation. D'autre part, l'IR cryogénique en phase gazeuse permet l'observation des bandes vibrationnelles des différents OH libres grâce à la phase gazeuse (suppression des échanges avec le solvant) et à la basse température (suppression des équilibres dynamiques). La résolution obtenue par IR cryogénique autorise, une nouvelle fois, la comparaison entre les spectres IR expérimentaux et ceux générés théoriquement par modélisation moléculaire. Grâce à ce couplage, la proposition de symétrie de l'adduit  $[\alpha\text{CD}+\text{Na}]^+$  issue de modélisations théoriques a été consolidée, ainsi que l'asymétrie de l'adduit  $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$  et la position de la charge  $\text{Na}^+$  sur la face primaire de ces CDs. Enfin, l'analyse des fragments de  $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$  par IR cryogénique a mené à une proposition de mécanisme de fragmentation, différent de celui de l'adduit  $[\beta\text{CD}+\text{H}]^+$  (Schéma 8) [115].

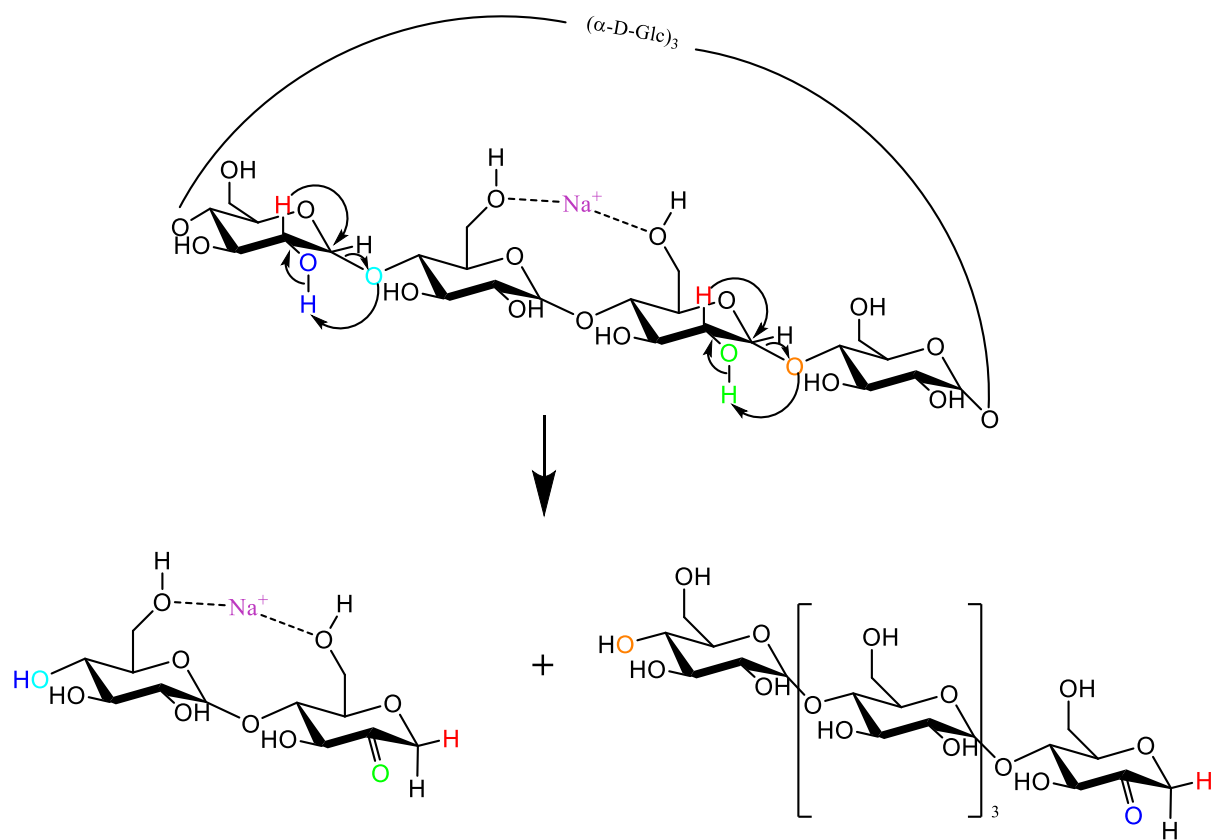


Schéma 8 : Mécanisme de fragmentation de l'adduit  $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$  proposé suite aux expériences réalisées sur un spectromètre de masse couplé à l'infrarouge cryogénique. D'après [115].

Les exemples cités sur la caractérisation des CDs en phase gazeuse mettent en évidence la continuité des efforts engagés dans la caractérisation de ces oligosaccharides naturels, malgré une connaissance d'ores et déjà conséquente en terme de caractéristiques physico-chimiques et de réactivité. Il est à noter que l'intégration aujourd'hui courante de la mobilité ionique aux spectromètres de masse a également contribué à l'émergence de nouvelles données expérimentales concernant les CDs en phase gazeuse.



### I.2.1.2. Analyse des CDs modifiées sélectivement

L'analyse des CDs modifiées sélectivement est analogue à celle réalisée pour tout produit de synthèse purifié, notamment via la mesure de masse précise par HRMS (i.e. la composition élémentaire) et l'élucidation structurale par MS/MS et RMN. Néanmoins, la perte de symétrie liée au greffage d'une ou plusieurs fonctions rend les spectres RMN des CDs modifiées particulièrement difficiles à interpréter, nécessitant la mise en œuvre d'expériences 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). A titre illustratif, un exemple publié par Sollogoub et coll. sera développé ici, concernant l'hepta-différenciation de la  $\beta$ CD, représentant un cas particulièrement complexe de caractérisation d'un dérivé de CD pur issu d'une synthèse sélective multi-étapes [116]. Le dérivé synthétisé, représenté Schéma 9, correspond à la  $\beta$ CD protégée en position 2 et 3, portant 7 groupements différents en position 6, sur chaque unité glucose.

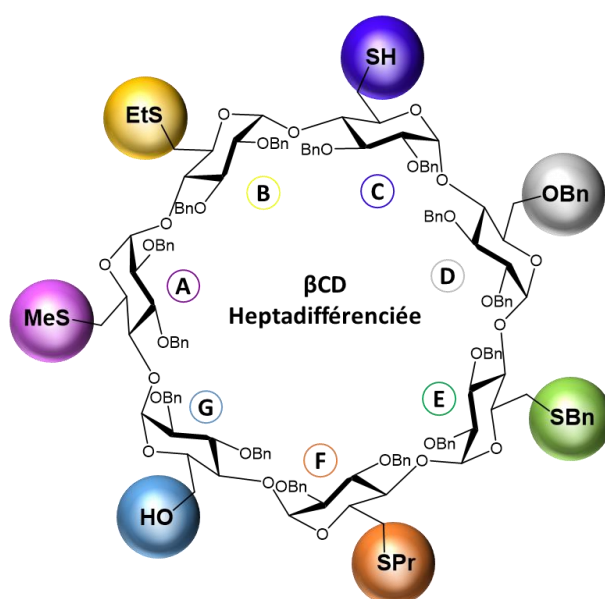


Schéma 9 : Structure de la  $\beta$ CD hepta-différenciée en position 6 obtenue en 21 étapes de synthèse pour un rendement final de 0.6%. D'après [116]. Et : Ethyle ; Bn : Benzyle ; Pr : Propyle ; Me : Méthyle.

Deux techniques analytiques ont été employées pour caractériser ce composé : la RMN et la MS. D'une part, l'analyse approfondie des spectres RMN  $^1\text{H}$  et des expériences COSY a été réalisée. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  observable sur l'expérience COSY représentée sur la Figure 18 met en évidence la complexité des spectres obtenus pour ce composé, qui ne peut être analysé que par le biais d'expériences complémentaires en RMN 2D. Les annotations correspondent à l'attribution des protons appartenant à un même glucose, ce travail ayant donc été effectués sur les 7 unités glucose différenciées par le groupement porté en position 6. Il est à noter que pour permettre l'attribution observée, des expériences 2D (TOCSY, HSQC, HMBC) ont été réalisées. D'autre part, l'expérience NOESY a été utilisée pour observer les corrélations dipolaires entre deux unités glucosidique adjacentes, offrant la possibilité de déterminer la séquence A-B-C-D-E-F-G représentant chaque sucre différencié (Schéma 9).

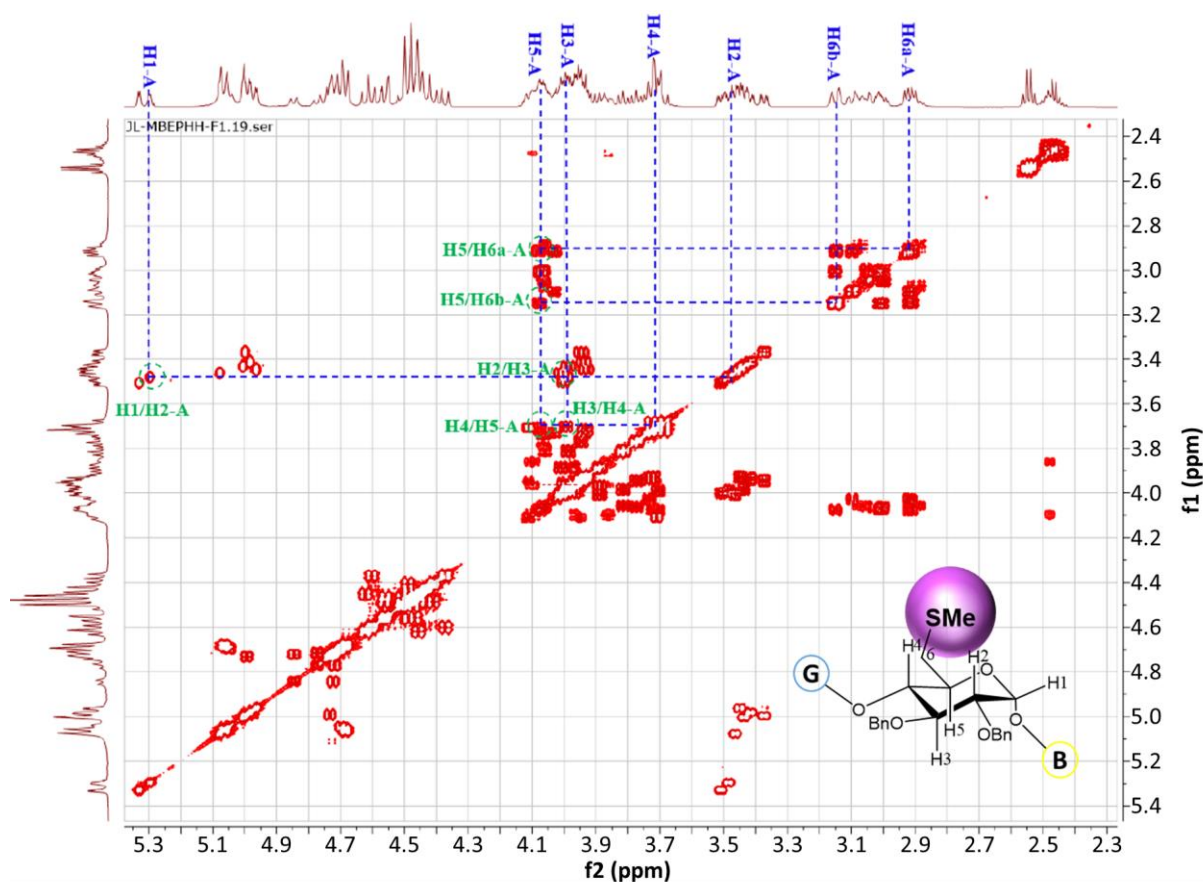


Figure 18 : Extrait des expériences RMN (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K) réalisées pour caractériser la  $\beta$ CD heptadiérenciée : expérience COSY annotée correspondant à l'assignation des signaux du glucose A portant le groupement thiométhyle. D'après [116].

Afin d'obtenir une preuve complémentaire à cette analyse détaillée par RMN, une étude par MS a également été entreprise. D'une part, la mesure de la masse précise est en accord avec la masse théorique de ce composé, de formule brute  $\text{C}_{160}\text{H}_{178}\text{O}_{30}\text{S}_5$  ( $\Delta = -1.3$  ppm). D'autre part, une étude par fragmentation  $\text{MS}^n$  a été effectuée afin de déterminer la séquence des glucoses différenciés. La Figure 19 reprend l'annotation réalisée suite à une fragmentation de type  $\text{MS}^2$ , consistant à sélectionner l'ion parent (ici l'adduit  $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$ ) et à observer les ions générés. Il est notable que le spectre généré comporte une grande quantité d'informations, correspondant à différentes parties de la molécule analysée, parfois sous forme mono-chargées et / ou di-chargées. Par la suite, les analyses par  $\text{MS}^3$ ,  $\text{MS}^4$ ,  $\text{MS}^5$  et  $\text{MS}^6$  ont été réalisées afin de déterminer l'affiliation des fragments. Cette technique de fragmentation séquentielle consiste à sélectionner un ion et le fragmenter ( $\text{MS}^2$ ), puis à sélectionner un fragment pour le fragmenter à son tour ( $\text{MS}^3$ ), etc... Ces expériences ont apporté, par la fragmentation séquentielle de la CD avec 7, 6, 5, 3 et 2 sucres ( $\text{MS}^2$ ,  $\text{MS}^3$ ,  $\text{MS}^4$ ,  $\text{MS}^5$  et  $\text{MS}^6$  respectivement), la preuve de l'affiliation des fragments observés sur la Figure 19. De plus, l'ensemble

des informations obtenues par cette série d'expériences est cohérent avec la structure déterminée par RMN, apportant une preuve supplémentaire de l'obtention de cette  $\beta$ CD hepta-différenciée.

Cette caractérisation d'un dérivé de CD isolé est un exemple démontrant que la caractérisation des CDs peut s'avérer difficile, notamment par RMN en raison de la perte de symétrie et à la faible dispersion spectrale des  $^1\text{H}$  des unités glucose qui en résulte. Pourtant, un cas complexe comme celui présenté ici permet de mettre en évidence que cette caractérisation reste atteignable, particulièrement grâce à la complémentarité des expériences RMN 2D et à la combinaison de plusieurs techniques d'analyse (RMN et MS).

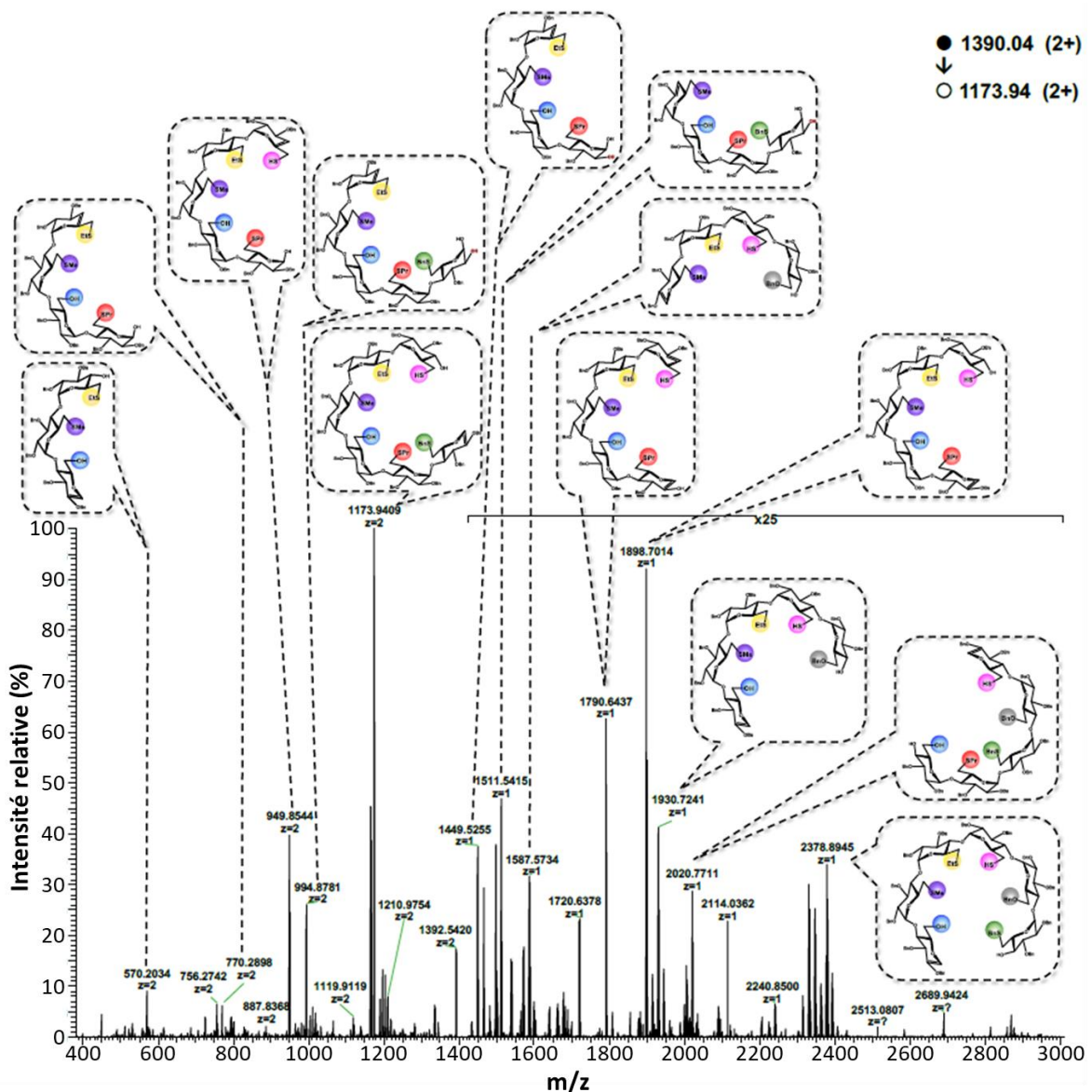


Figure 19 : Spectre  $\text{MS}^2$  de l'adduit  $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$  ( $m/z$  1390.0352) de la  $\beta$ CD hepta-différenciée, annoté des structures correspondantes aux masses précises mesurées. Certaines structures sont présentes deux fois en raison de l'observation de leur forme mono-chargée et di-chargée. Issue de [116].

### 1.2.2. Analyse des CDs en mélange, modifiées non-sélectivement

A contrario, l'analyse des CDs modifiées non-sélectivement et obtenues sous forme de mélange souffre d'un manque de développement analytique. En effet, une revue de Szente *et coll.* datant de 2016 rapporte le nombre de publications relatives aux cyclodextrines dans le domaine analytique : Environ 5000 traitent de l'intérêt de CDs pour améliorer la séparation de composés grâce à leur capacité à différencier les énantiomères et 3000 concernent l'analyse des complexes d'inclusion. De manière très contrastée, uniquement une centaine de publications étudient la mise en place de méthodologie pour la caractérisation des CDs [117]. Ce bilan permet de mettre en évidence le manque de développement de méthodes d'analyse des CDs elles-mêmes, pourtant nécessaire à contrôler leur composition dans le cas de mélanges complexes. Aujourd'hui, des mélanges de CDs tels que la RAMEB, la SBE $\beta$ CD ou l'HP $\beta$ CD sont définis par leur degré de substitution (DS) ou DS moyen, correspondant respectivement au nombre total de substituants greffés ou du nombre moyen greffé par unité glucosidique. Ce moyen de contrôle est notamment indiqué dans les différentes pharmacopées autorisant l'HP $\beta$ CD et la SBE $\beta$ CD (Pharmacopée européenne et américaine).

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer si le DS des mélanges a une influence significative lors de leur utilisation pour la formation de complexes d'inclusion. Szente *et coll.* ont investigué l'effet solubilisant de  $\beta$ CD méthylées (Me $\beta$ CD) de différent DS : la CRYSMEB (DS faible), la RAMEB (DS moyen), la DIMEB (DS = 14, en position 2 et 3, à différents taux de pureté) et la TRIMEB (DS = 21). Il en est ressorti, après l'étude de plusieurs composés, que l'effet solubilisant est différent selon le DS mais sans tendance apparente, à l'exception d'un effet solubilisant généralement moins fort de la CRYSMEB [118].

Une série de deux études, visant à déterminer par ITC les constantes d'association de la Me $\beta$ CD et de l'HP $\beta$ CD de DS variables avec différents sels d'acides biliaires a été réalisée par Holm *et coll.* [119,120]. L'étude avec les HP $\beta$ CD a mis en évidence que le DS moyen affecte significativement la constante d'association avec tous les invités étudiés, la tendance étant une diminution de l'affinité avec l'augmentation du nombre d'hydroxypropyl greffés (Figure 20 (a)) [119]. Les résultats de l'étude réalisée avec les dérivés méthylés sont plus nuancés. En effet, la Figure 20 (b) ne montre aucune tendance définie reliant le DS moyen et la constante d'association mesurée. De plus, les cas des acides taurodéoxycholate (Figure 20 (b), ronds pleins) et glycodéoxycholate (Figure 20 (b), ronds vides) illustrent la diversité des affinités en fonction des lots de Me $\beta$ CD. En effet, la constante d'association entre l'acide taurodéoxycholate et une Me $\beta$ CD de DS moyen proche de 0.7 est de 5000 M<sup>-1</sup>, alors qu'un second lot de DS proche mène à l'obtention d'une constante de 7000 M<sup>-1</sup> (Figure 20 (b), encadré). Une observation analogue est remarquable pour ces deux composés en présence de Me $\beta$ CD au DS moyen de 2.1 [120].

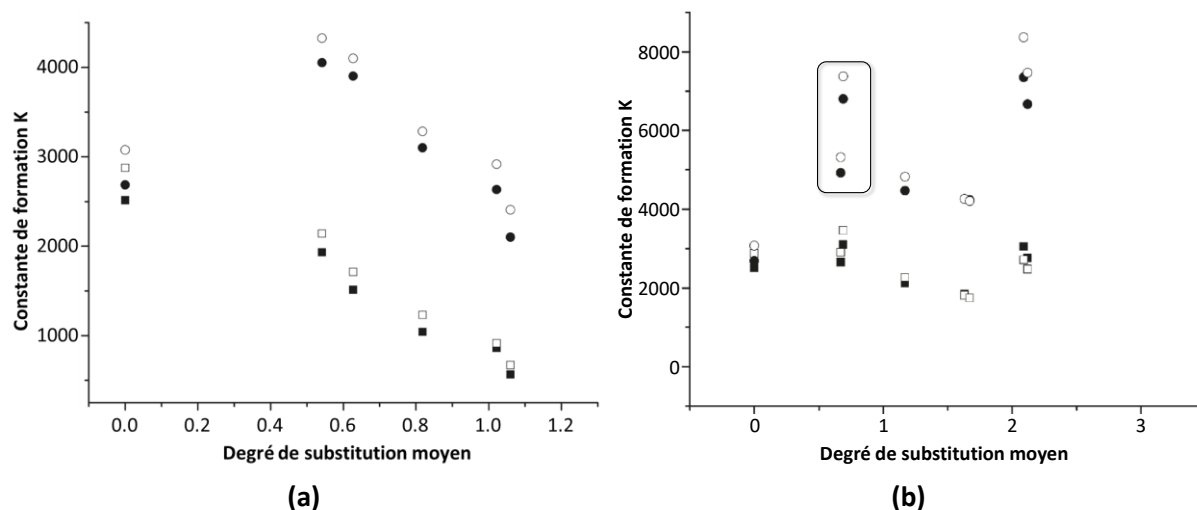


Figure 20 : Mesure par ITC des constantes d'associations des sels d'acide taurocholate (carré plein), glycocholate (carré vide), taurodeoxycholate (rond plein) et glycodeoxycholate (rond vide) avec des lots de différents DS moyen d'HPβCD (a) et de MeβCD (b). L'encadré met en avant la différence de constante d'association entre deux lots de MeβCD au DS quasiment identiques. D'après [119,120].

Cette différence d'affinité ne peut s'expliquer que par une composition différente de ces deux lots de MeβCD, qui n'est pas prise en considération lors de l'utilisation du DS moyen comme seul critère de caractérisation. En effet, de nombreuses combinaisons, d'isomères notamment, peut mener à l'obtention de DS moyens semblables.

L'analyse de tels mélanges, composés de structures proches mais également d'isomères pour chaque DS est un réel défi analytique. Les études décrites précédemment mettent pourtant en évidence l'intérêt de caractériser ces mélanges dont la composition, de la distribution du DS à la nature des composés, affecte directement leurs propriétés physico-chimiques. Quelques études ont été publiées avec l'objectif de combler ce manque de méthodologie, exploitant la RMN, la chromatographie ou la spectrométrie de masse pour caractériser au mieux ces mélanges.

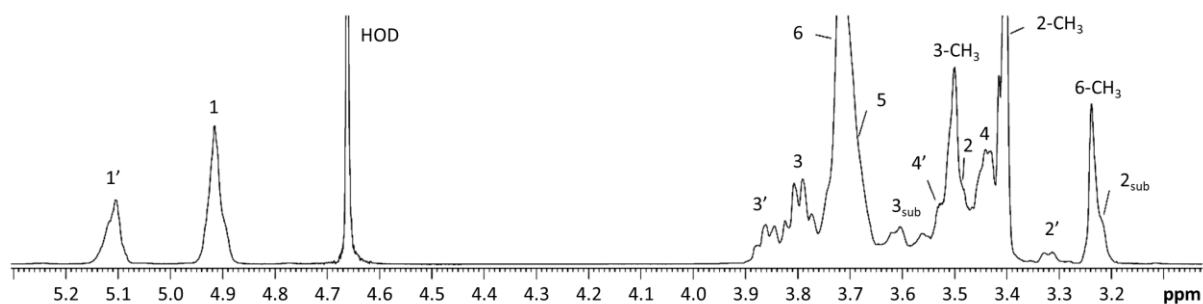
#### 1.2.2.1. Analyse par RMN

La RMN est une approche qui a été reportée afin de déterminer le degré de substitution de certaines CDs modifiées en mélange, dont l'HPβCD et la MeβCD. L'étude de Holm et coll. discutée précédemment a notamment caractérisé par RMN le DS de toutes les MeβCD utilisées (Tableau 7) [120]. Sachant que les signaux  $^1\text{H}$  des différents DS et isomères sont superposés, à l'exception des H1 des CDs, leur approche de détermination du DS consiste à intégrer ces signaux d'une part (considéré égale à 1), et d'autre part l'ensemble des autres signaux incluant les  $\text{CH}_3$ . L'écart d'intégration obtenu sur cette zone comprenant les H2, H3, H4, H5, H6 et  $\text{CH}_3$  avec la valeur d'intégration théorique sans  $\text{CH}_3$  (i.e. 6) permet la mesure directe du DS moyen. Comme observé sur le Tableau 7, les DS calculés sont de l'ordre de ceux annoncés par les fournisseurs et différencient les lots utilisés. Néanmoins, la

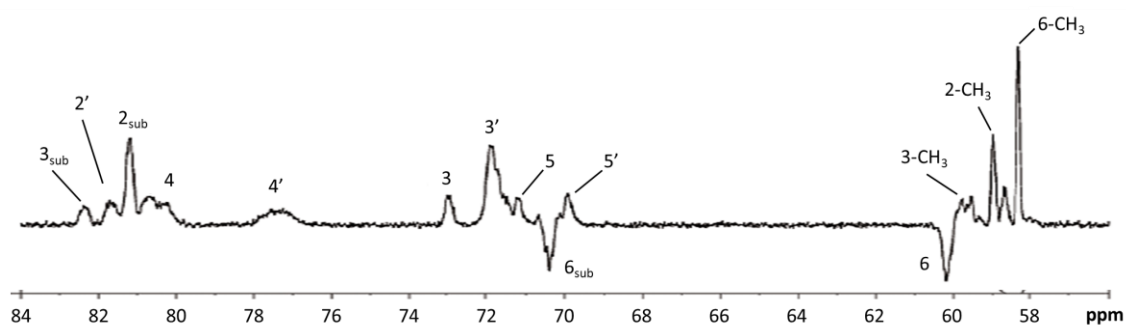
précision obtenue par cette approche est peu satisfaisante, s'expliquant par des zones d'intégration larges comprenant de nombreux signaux et correspondant sans doute à une grande hétérogénéité de structures.

Tableau 7 : Degrés de substitution moyen (global et par position) de différents lots de Me $\beta$ CD. <sup>a</sup> Déterminé par l'intégration des <sup>13</sup>C des CH<sub>3</sub>, les proportions obtenues ont été multipliées par le DS moyen. D'après [120].

Me $\beta$ CD DS annoncé*	DS mesuré (RMN <sup>1</sup> H)	DS (O2) <sup>a</sup>	DS (O3) <sup>a</sup>	DS (O6) <sup>a</sup>
0.6	0.44	0.38	0.19	0.10
0.57	0.63	0.52	0.12	0.05
1.2	1.03	0.59	0.33	0.25
1.8	1.50	0.63	0.37	0.67
2	1.90	1.00	0.09	1.00
2.16	1.95	1.00	0.12	1.00
3	2.99	1.00	1.00	1.00



(a)



(b)

Figure 21 : Spectres RMN annotés d'une Me $\beta$ CD de DS moyen de 0.67 : spectre <sup>1</sup>H (a) et spectre DEPT-135 (b). sub : position substituée; ' : position voisine d'une substitution. D'après [120].

Cette équipe a également approfondi la caractérisation de ces mélanges en déterminant le DS des positions 2, 3 et 6 de la Me $\beta$ CD. D'une part, le DS en position 2 a été déterminé grâce au rapport

d'intégration des deux signaux relatifs aux H1 (Figure 21 (a)), le signal déblindé correspondant aux H1 voisins d'une substitution en position 2. D'autre part, l'intégration des  $^{13}\text{C}$  correspondant aux  $\text{CH}_3$ , déterminés liés en position 2, 3 et 6 par des expériences 2D (HSQC et HMBC), a été utilisée pour déterminer les proportions de position de greffage (Figure 21 (b)). Multipliée par le DS moyen, cette proportion permet l'obtention du DS sur chaque position de greffage. Il est à noter que malgré les incertitudes liées aux effets NOE lors de l'intégration de signaux  $^{13}\text{C}$ , la comparaison de l'intégration de mêmes groupements chimiques (ici  $\text{CH}_3$ ) diminue cette incertitude grâce à un effet NOE semblable [121]. De plus, la mise en place de séquences RMN  $^{13}\text{C}$  quantitatives peut être utilisée pour s'assurer de la validité de l'intégration. Malgré la proximité des signaux  $^{13}\text{C}$  des méthyles greffés en position 2, 3 ou 6, cette approche a permis de mettre en évidence des différences notables de DS par position entre les lots de Me $\beta$ CD, notamment un DS non négligeable en position 3.

Concernant l'HP $\beta$ CD, l'approche par intégration des signaux observés en RMN  $^1\text{H}$  est plus robuste. En effet, l'intégration des H1 isolés comparés aux  $\text{CH}_3$  des groupements hydroxypropyle, également isolés, permet la détermination du DS moyen (Figure 22). Les zones d'intégration sont nettement restreintes dans le cas de l'HP $\beta$ CD en comparaison des Me $\beta$ CD présentés précédemment, limitant l'erreur sur la valeur d'intégration [122].

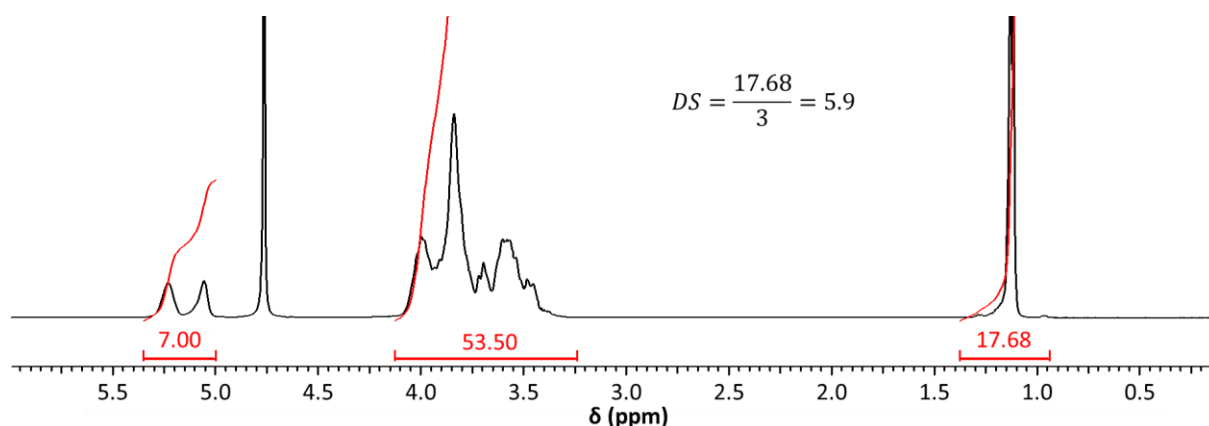


Figure 22 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K) de l'HP $\beta$ CD annoté des intégrations utilisées pour calculer le DS de ce lot. D'après [122].

Contrairement aux Me $\beta$ CD, les groupements hydroxypropyle de l'HP $\beta$ CD ne permettent pas l'observation de  $^{13}\text{C}$  différenciables par les expériences RMN  $^{13}\text{C}$  à une dimension, seules des observations qualitatives peuvent être obtenues. Szente et coll. ont reporté l'utilisation de l'expérience 2D HSQC éditée (Dept-HSQC) pour observer les variations de déplacements chimiques des  $^{13}\text{C}$  des positions 2, 3 et 6. Comme observé sur la Figure 23, cette équipe a attribué certaines taches de corrélations  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  aux positions substituées, les positions 2 et 6 dans le cas de ce lot d'HP $\beta$ CD de DS moyen 0.84 [122]. Les carbones porteurs de la substitution sont déblindés, permettant leur différenciation des positions non-substituées.



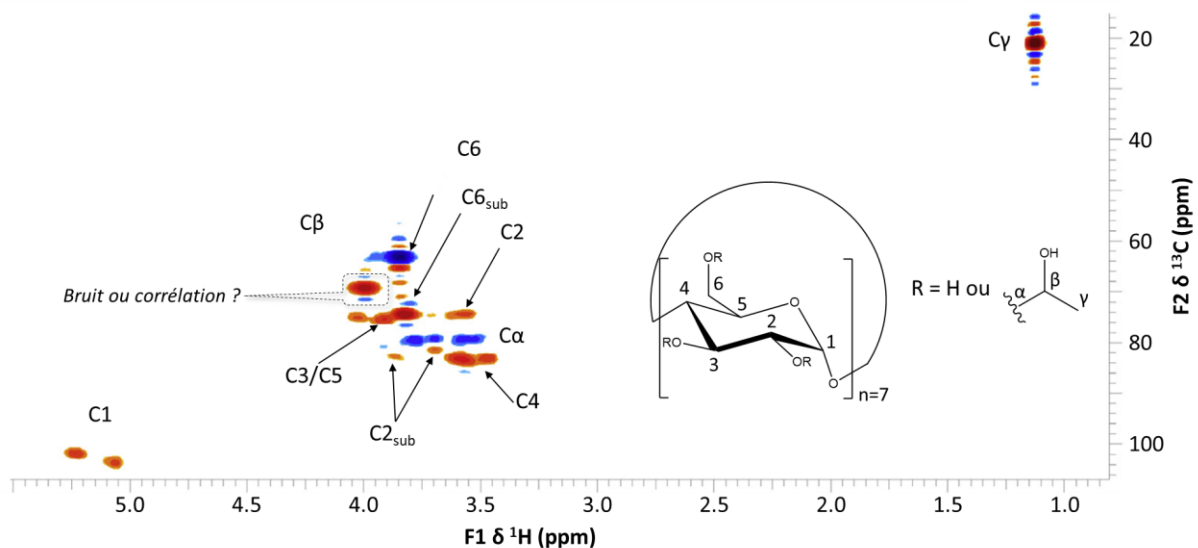


Figure 23 : Expérience RMN HSQC éditée DEPT-135 (600 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K) de l'HPβCD, annotée de l'attribution des taches de corrélation. sub : carbone porteur d'un groupement hydroxypropyle. L'encadré met en évidence l'observation de bruit de phase opposé adjacent à certains signaux. D'après [122].

Néanmoins, malgré des signaux <sup>1</sup>H partiellement déconvolués grâce à l'ajout de la dimension <sup>13</sup>C, il est notable que de nombreuses taches de corrélation, dont certaines attribuées aux unités substituées, ont une intensité faible. De plus, le caractère phasé de cette expérience amène une ambiguïté lors d'une forte proximité entre deux taches de corrélation de phases opposées (Figure 23, encadré).

Ces deux exemples sont illustratifs de la capacité qu'offre la RMN pour déterminer la composition des mélanges de dérivés de CDs, dont l'efficacité est dépendante de la nature de la modification chimique et du mélange. Malgré une caractérisation avancée de la MeβCD, incluant la détermination du DS par position, cette technique analytique ne peut permettre de déterminer la contribution des DS dans le DS moyen déterminé. Afin de répondre à cette problématique de mélange qui limite les capacités d'analyses par RMN, l'utilisation de méthodes chromatographiques destinées à séparer les constituants de ces mélanges de CDs a été investiguée.

#### 1.2.2.2. Analyse par des techniques séparatives

Dès 1969, la mise au point d'une méthode d'analyse de mélange des CDs naturelles a été publiée, permettant la séparation et la quantification de l'αCD, la βCD et la γCD par chromatographie gazeuse (GC). Afin d'être analysées par GC, les CDs doivent cependant être dérivatisées au préalable afin de les rendre volatiles [123]. En 1993, une équipe a étudié la capacité de la GC et différentes colonnes chromatographiques à séparer les constituants de différents mélanges de CDs modifiées (méthylées, éthylées, alkylées). La séparation obtenue des composés synthétisés dans leur laboratoire est satisfaisante, et ce même dans des mélanges complexes reconstitués de dérivés alkylés d'αCD, βCD et γCD (Figure 24 (a)). De plus, la réalisation de purifications de pics isolés par chromatographie liquide,



suivies de leurs analyses par GC, atteste de la présence de plusieurs composés, indiquant que la phase gazeuse offre une meilleure séparation des dérivés alkylés de CDs que la phase liquide. Néanmoins, l'analyse de RAMEB commerciale ne permet pas, avec leurs conditions chromatographiques, l'obtention d'une séparation intéressante (Figure 24 (b)) [124].

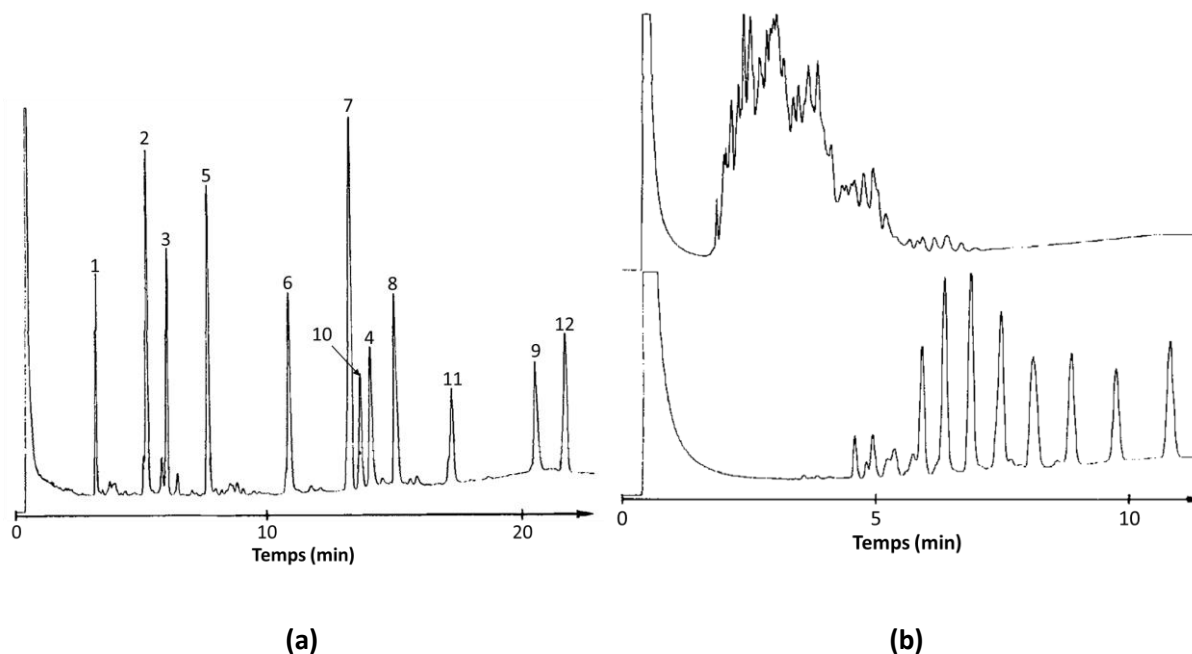


Figure 24 : Séparation chromatographique en phase gazeuse (colonne 13m\*0.27mm, phase stationnaire OV-17 borosilicate revêtue de méthyle phényle polysiloxane). (a) Température 330-390°C, 3°C/min : séparation d'un mélange reconstitués de dérivés alkylés d'αCD, de βCD et de γCD : **1**, hexakis(2,3,6-tri-O-ethyl)-αCD; **2**, hexakis(2,3,6-tri-O-propyl)-αCD; **3**, hexakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-αCD; **4**, heptakis(2,3,6-tri-O-pentyl)-βCD; **5**, heptakis(2,3,6-tri-O-ethyl)-βCD; **6**, heptakis(2,3,6-tri-O-propyl)-βCD; **7**, heptakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-βCD; **8**, heptakis(2,3,6-tri-O-butyl)-βCD; **9**, heptakis(2,3,6-tri-O-pentyl)-βCD; **10**, octakis(2,3,6-tri-O-ethyl)-γCD; **11**, octakis(2,3,6-tri-O-propyl)-γCD; **12**, octakis(2,3,6-tri-O-méthyl)-γCD. (b) Température 350-370°C, 2°C/min : après triméthylsilylation, analyse d'une RAMEB commerciale W-7 M de DS 1.8 (Wacker) (haut) ou synthétisée par les auteurs (bas). D'après [124].

Afin d'améliorer la séparation chromatographique, en phase liquide, des CDs naturelles et de leurs dérivés, le développement de nouvelles phases stationnaires dédiées a été entrepris. Développées sur la base de modélisations moléculaires, ces phases stationnaires comportent un groupement phényle en bout de chaîne, lié à une fonction carbamide. Cette phase stationnaire a pour objectif de permettre aux CDs de former des complexes d'inclusion avec les groupements phényles et de permettre des liaisons hydrogène avec la fonction carbamide. A titre indicatif, les analyses reportées permettent de séparer les 3 CDs naturelles avec l'élution de l'αCD dans le volume mort, suivi de la γCD puis de la βCD. Cet ordre de temps de rétention est en accord avec les constantes d'association de ces CDs avec le groupement phényle [125]. Néanmoins, les séparations présentées semblent efficaces pour l'analyse de mélanges simples, alors que les mélanges complexes tels que l'HPβCD ou la RAMEB ne sont que peu résolus.

Le caractère ionique des dérivés de CDs sulfoalkylées a motivé le développement de méthodes chromatographiques en phase liquide basées sur la charge des molécules analysées. La

chromatographie HILIC a montré une bonne capacité de séparation de dérivés d' $\alpha$ CD et de  $\beta$ CD, sulfoalkylées (DS compris de 1 à 14, greffées en position 6) et diméthylées en position 2 et 3. Les dérivés partiellement sulfopropylé en position 2 et 3 (libres en position 6) sont également séparables par HILIC en fonction du nombre de groupements greffés [126]. L'utilisation de la chromatographie liquide échangeuse d'anions a également été envisagée pour la séparation des différents DS, le nombre de groupements sulfate influençant directement la rétention des composés (Figure 25) [127]. De manière analogue, l'utilisation de l'électrophorèse capillaire a permis de correctement séparer les différents degrés de substitution de la SBE $\beta$ CD [128].

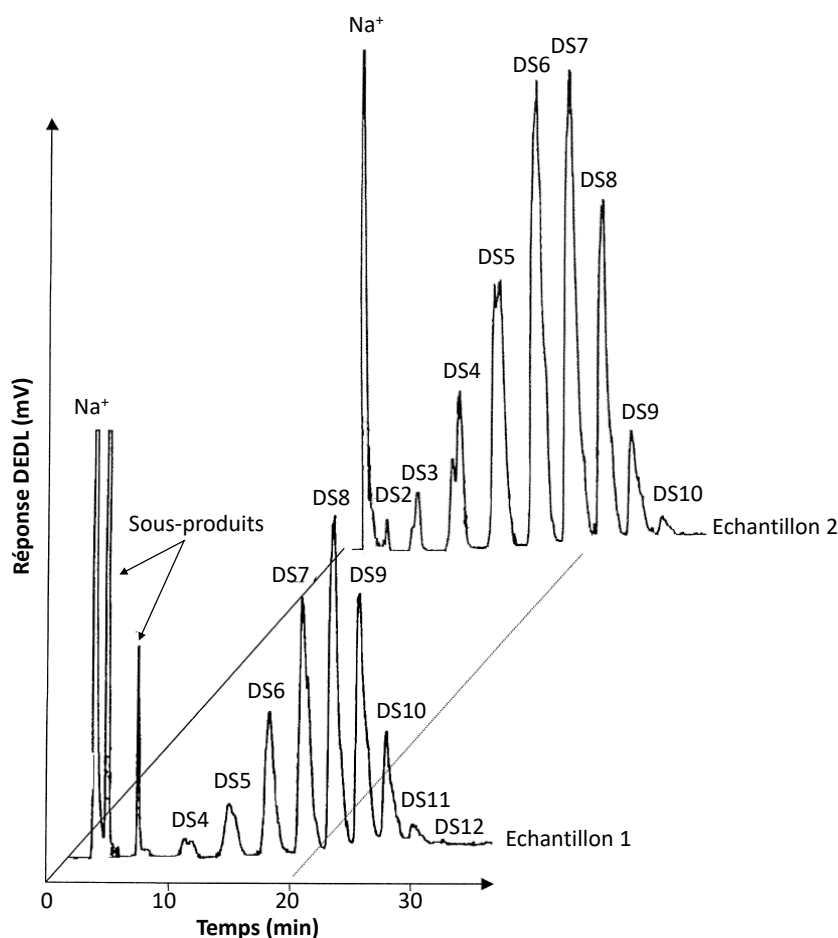


Figure 25 : Séparation par chromatographie d'échanges d'anions des différents DS constitutifs de la SBE $\beta$ CD mettant en évidence la différence de DS moyen entre deux échantillons. Gradient linéaire à 1 mL/min A (50 mM acétate d'ammonium, H<sub>2</sub>O/ACN 70/30):B (300 mM acétate d'ammonium, H<sub>2</sub>O/ACN 70/30), 100:0 (0min), 0:100 (35 min). Colonne : Vydac 302 IC column (250\*4.6 mm). D'après [127].

La qualité de séparation obtenue par ces trois techniques séparatives est similaire, avec l'observation d'une série de pics correctement séparés, correspondant aux différents DS. Ces résultats semblent donc indiquer que le caractère discriminant, par ces techniques, est le nombre de chaînes greffées (i.e. le nombre de charges négatives liées aux sulfates). Malgré leur capacité à comparer différents lots et

à observer des différences, la position de greffage ou la stéréochimie ne peuvent être différenciées par ces techniques d'analyse, chaque pic observé contenant une multitude d'isomères possibles. Concernant l'analyse des mélanges de  $\beta$ CD méthylées, Elfakir *et coll.* ont fortement contribué au développement de méthodes chromatographiques en phase liquide, dont l'efficacité dépasse la simple différenciation des DS. Parmi leurs premières études des méthodes d'analyse des CDs méthylées, cette équipe a mis en évidence l'importance du choix de la colonne utilisée pour séparer au mieux les composés d'un mélange complexe de CDs méthylées. En effet, le % de carbone greffé, le % d'end-capping des silanols libres et les dimensions (longueur, largeur, taille des particules, des pores, etc..) sont autant de paramètres influençant la capacité résolutive des colonnes en phase inverse pour cette application [129]. Les conditions chromatographiques ont aussi une importance significative, cette équipe ayant démontré que l'utilisation d'un mélange  $H_2O/ACN$  est le plus efficace pour la séparation des constituants de la RAMEB. La température de la colonne est également un paramètre dont l'influence sur la capacité de séparation est intéressante. En effet, la température est le paramètre essentiel ayant permis la séparation de la  $Me_{14}\beta CD$  d'une  $Me_{15}\beta CD$  lors de l'analyse de la DIMEB par chromatographie liquide en phase inverse. Il a été montré qu'à  $40^\circ C$ , ces deux composés ne sont pas résolus et que l'augmentation de la température à  $60^\circ C$  permet d'améliorer cette séparation jusqu'à un retour à la ligne de base (Figure 26 (a)).

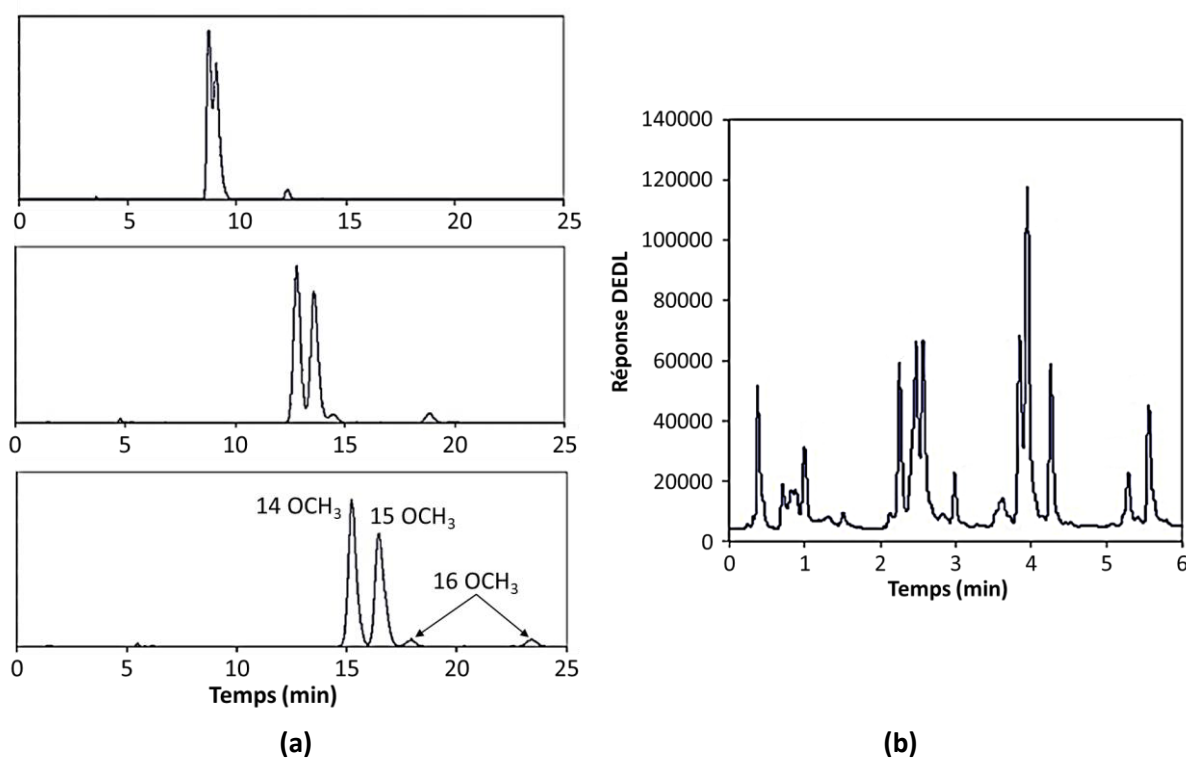


Figure 26 : Analyses par chromatographie liquide à phase inverse (colonne Halo C18, 50 mm \* 4.6 mm). (a) Séparation des constituants de la DIMEB (0.3 mL/min isocratique  $H_2O/ACN$ , 64/36) à différentes températures :  $40^\circ C$  (haut),  $50^\circ C$  (milieu) et  $60^\circ C$  (bas). (b) Analyse rapide d'une  $Me\beta CD$  offrant un profil chromatographique (2.4 mL/min,  $60^\circ C$ , gradient linéaire A ( $H_2O$ ) : B (ACN) ; 95:5 (0 min), 85:15 (5 min), 85:15 (6 min)). D'après [130].

Malgré une augmentation du temps de rétention, le temps d'analyse peut être réduit avec l'augmentation du débit sans affecter la résolution entre ces pics, offrant une analyse rapide (< 10 min) et efficace pour le contrôle des lots de DIMEB et de RAMEB [130]. La Figure 26 (b) correspond à la séparation des constituants d'une  $\beta$ CD au DS de méthylation faible, mettant en évidence un profil chromatographique plus détaillé que ceux obtenus pour la SBE $\beta$ CD ou la RAMEB discutés précédemment.

L'ensemble des méthodes chromatographiques discutées ici exploitent des détecteurs universels comme le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) ou la réfractométrie (dans le cas de méthodes isocratiques), apportant une information uniquement quantitative. Afin de déterminer le DS des pics observés, il est alors nécessaire de procéder à une étape de purification ou de disposer de témoins isolés. La spectrométrie de masse est, dans ce contexte, un outil analytique performant pour déterminer le DS d'un mélange de dérivés de CDs, par l'analyse directe du mélange ou par son couplage avec des méthodes chromatographiques.

### I.2.2.3. Analyse par spectrométrie de masse

#### I.2.2.3.1. Analyse directe

La MS est un moyen rapide et efficace pour définir le DS de CDs substituées non-sélectivement, par la mesure directe de la masse ( $m/z$ ) des constituants d'un mélange. La mesure de l'intensité de chaque  $m/z$ , associé à un DS, permet l'obtention du DS moyen du mélange ainsi que la répartition des DS. De plus, il a été montré que l'utilisation de différentes voies d'ionisation telles que le MALDI, l'ESI ou l'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) mène à la détermination du même DS moyen, dans le cas de la RAMEB [131]. Cette approche permet donc d'obtenir sans séparation chromatographique le DS moyen de lots de CDs méthylées mais aussi des HP $\beta$ CD ou des SBE $\beta$ CD. L'étude de Holm *et coll.* discutée précédemment a également déterminé le DS des différentes Me $\beta$ CD utilisées par MS, à travers une ionisation par MALDI. Les DS moyens obtenus par cette méthode sont en bon accord avec ceux annoncés par le fournisseur, avec une précision supérieure à celle obtenue par l'intégration des signaux en RMN  $^1\text{H}$  [120].

Néanmoins, dans une seconde étude de la RAMEB par MALDI, il a été observé que le DS moyen obtenu était dépendant de la méthode de préparation de l'échantillon (Figure 27) [132].

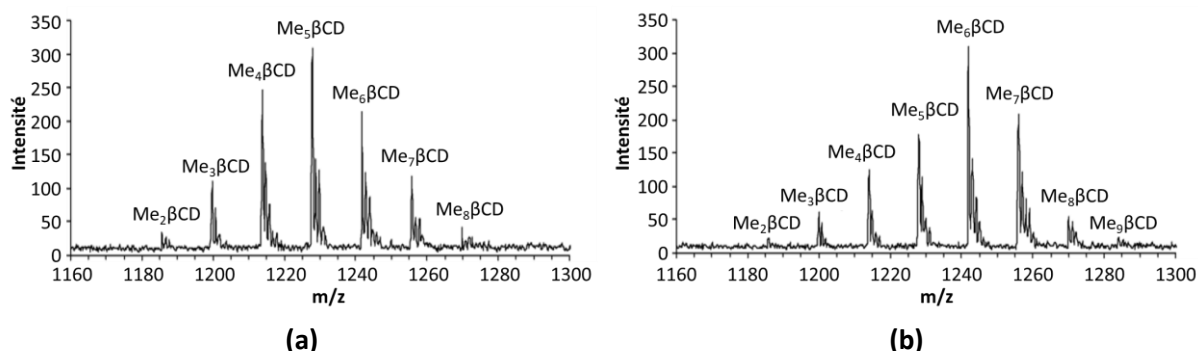


Figure 27 : Analyses par MALDI-TOF d'une MeβCD dont l'échantillon a été préparé selon deux méthodes. (a) La matrice est déposée, séchée, puis l'échantillon de MeβCD est déposé sur la plaque. (b) La matrice et l'échantillon sont mélangés et ce mélange est déposé sur la plaque. D'après [132].

Wouessidjewe *et coll.* ont également observé un effet des conditions expérimentales sur la mesure de la réponse de différents isomères de βCD amphiphiles, substituées par des chaînes alkyles C<sub>10</sub> [133]. En effet, lors de l'infusion directe du mélange par ESI-MS, le solvant de solubilisation (Figure 28 (a)) ainsi que le débit (Figure 28 (b)) influencent directement et différemment la réponse des constituants. Il est notable, sur la Figure 28 (b), que le DS calculé lors de l'infusion du mélange à un débit de 15 μL/min est différent de celui à 20 μL/min, notamment dû à l'ion de m/z 1619 (courbe bleu). Ces observations impliquent que les distributions de DS observées peuvent être biaisées selon les conditions expérimentales lors de l'analyse de mélange de CDs modifiées par MS, tant par la source d'ionisation MALDI que par ESI.

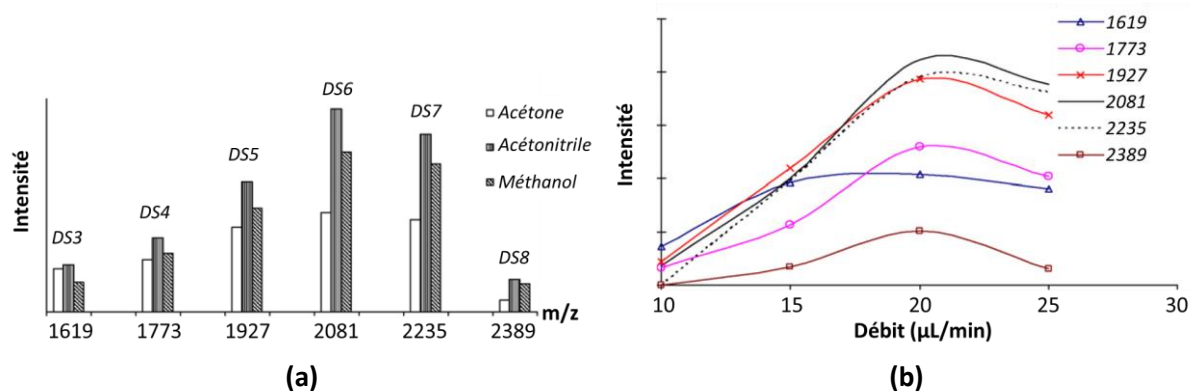


Figure 28 : Influence du solvant (a) et du débit (b) d'infusion sur la réponse des constituants d'un mélange contenant différent DS de C<sub>10</sub>-βCD. D'après [133].

Le facteur réponse des composés ainsi que les compétitions d'ionisation peuvent être à l'origine des disparités observées en fonction de la préparation des échantillons ou des conditions opératoires. Une solution envisageable pour pallier ce problème est de coupler la MS à une méthode de séparation afin de minimiser l'arrivée simultanée des échantillons et de standardiser les conditions de solvants.

### 1.2.2.3.2. Couplage à une méthode séparative

Le couplage des méthodes chromatographiques avec la spectrométrie de masse représente un moyen analytique particulièrement efficace pour la caractérisation des mélanges de CDs. D'une part, les problématiques évoquées concernant les variations de facteurs réponses lors de l'analyse du mélange sont minimisées grâce à la séparation. D'autre part, cette détection offre la possibilité d'attribuer les pics chromatographiques à un DS grâce à la mesure de la masse précise. A titre illustratif, les méthodes chromatographiques développées par Elfakir et coll. pour la séparation des dérivés méthylés de la  $\beta$ CD couplées à la spectrométrie de masse permet d'apprécier la complexité de ces mélanges commerciaux. En effet, comme observé sur la Figure 29 (a), la reconstitution du courant ionique correspondant à chaque DS met en évidence une forte dispersion des temps de rétention entre les isomères de même DS. Il est à noter que cette dispersion ne peut être détectée lors de l'utilisation d'un autre détecteur dans la mesure où une co-élution de différents DS est présente. La Figure 29 (b) permet d'observer que cette observation est valable tant pour les lots faiblement méthylés que pour ceux fortement méthylés.

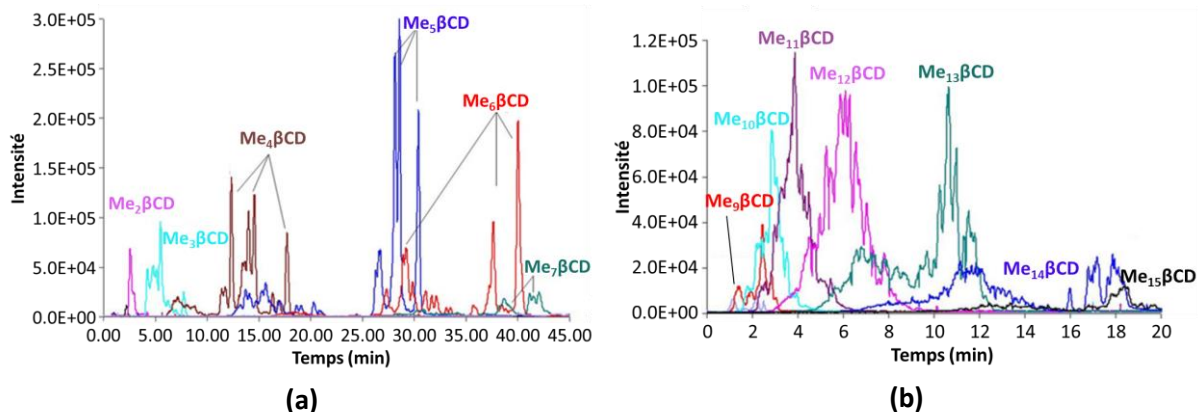


Figure 29 : Analyses par LC-ESI-MS (colonne Halo C18, 50 mm \* 4.6 mm, 60°C, solvant : H<sub>2</sub>O (A), ACN (B), avec 5 mM d'acétate d'ammonium) de deux Me $\beta$ CD de différents DS. (a) Bas DS (Me<sub>2</sub>-Me<sub>7</sub>), 0.3 mL/min, gradient A:B 95:5 (0 min), 85:15 (35 min), 85:15 (45 min). (b) Haut DS (Me<sub>9</sub>-Me<sub>15</sub>), 1.2 mL/min, gradient A:B 80:20 (0 min), 65:35 (20 min), 65:35 (30 min). D'après [130].

La fragmentation MS/MS est également un outil complémentaire à cette séparation couplée à la MS. Dans le cas de l'analyse de différents lots de DIMEB, la MS/MS est l'outil analytique idéal pour déterminer si la méthylation est homogène sur chaque sucre ou non. En effet, la Me<sub>14</sub>βCD correspondant au produit attendu (heptakis(2,6-di-O-méthyl)-βCD) génère uniquement des pertes successives de 190 uma correspondant à un glucose diméthylé déshydraté (Figure 30 (a)). A l'inverse, si la méthylation est hétérogène, la perte correspondant à un sucre mono- ou tri-méthylé peut être observée (176 et 204 uma respectivement) (Figure 30 (b)) [134]. Couplée à une méthode chromatographique, cette approche permet donc de discriminer les deux isomères de Me<sub>14</sub>βCD observés sur la Figure 30 (c), le pic majoritaire correspondant à la diméthylation homogène. Il est à noter que seule la RMN permet de différencier la DIMEB d'un isomère dont un sucre serait substitué

en position 3 et 6 (au lieu de 2 et 6), grâce à une conservation de la symétrie uniquement dans le cas de la DIMEB.

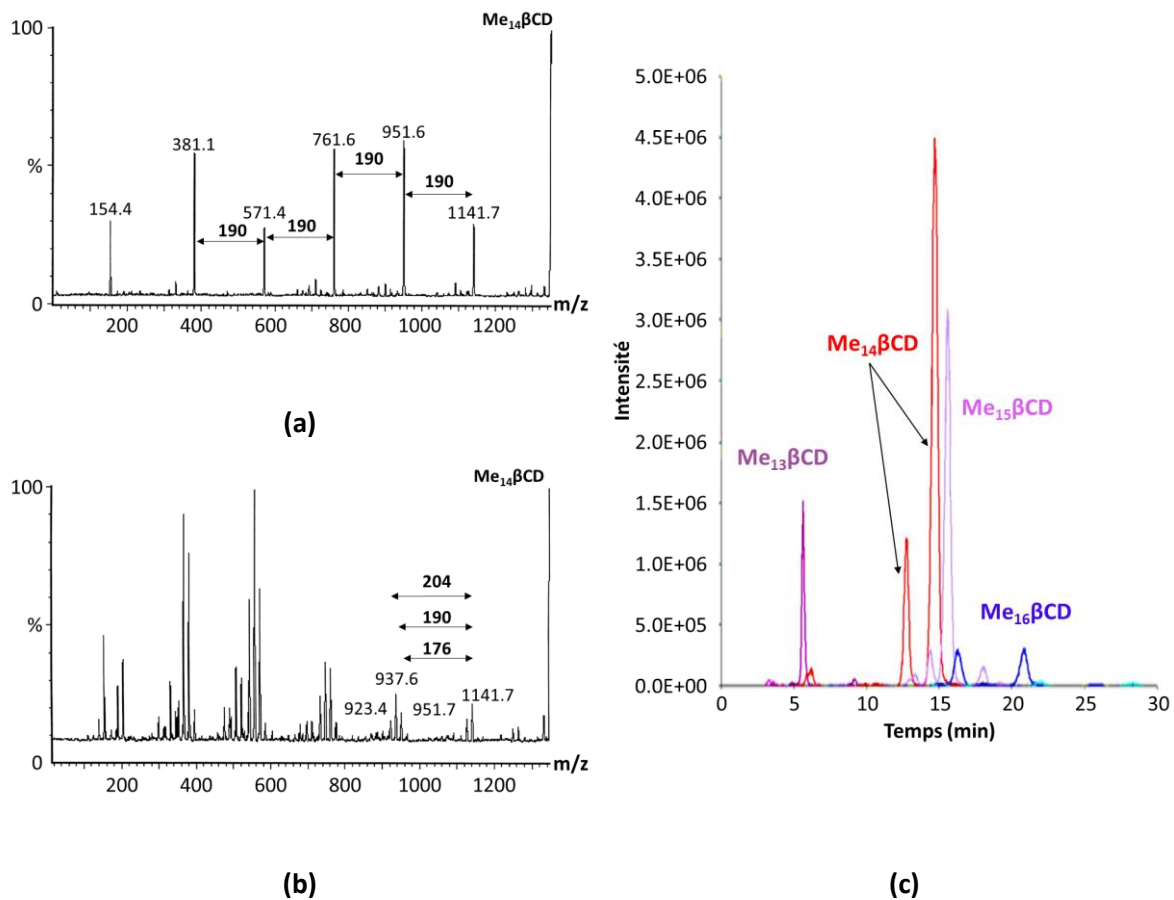


Figure 30 : Spectre de fragmentation MS/MS d'une DIMEB dont le DS est homogène sur chaque sucre (a) ou hétérogène (b). D'après [134].(c) Analyse LC-ESI-MS d'une DIMEB (colonne Halo C18, 50 mm \* 4.6 mm, 60°C, conditions isocratiques : 0.3 mL/min H<sub>2</sub>O/ACN 64/36 avec 5 mM d'acétate d'ammonium). D'après [130].

Une autre approche reportée par Szente et coll. consiste à dégrader l'HPβCD par méthanolisation afin d'obtenir les sucres libres hydroxypropylés et méthylés en position 1. Les mélanges complexes d'HPβCDs deviennent des mélanges complexes de sucres libres hydroxypropylés, limitant le nombre d'isomères observables. L'analyse de ce mélange de produit de dégradation par chromatographie liquide couplée à la MS permet de déterminer i) quel est le DS maximal par unité glucose et ii) d'obtenir une séparation chromatographique intéressante isolant chaque DS (Figure 31). Cette étude a permis de prouver que dans le cas d'un lot d'HPβCD de DS moyen 1.39 (haut DS), certaines unités glucose portent 4 groupements hydroxypropyles, apportant une preuve de l'existence d'oligohydroxypropyles greffés lors de la synthèse de l'HPβCD de haut DS, rendant ces dérivés particulièrement hétérogènes [122].

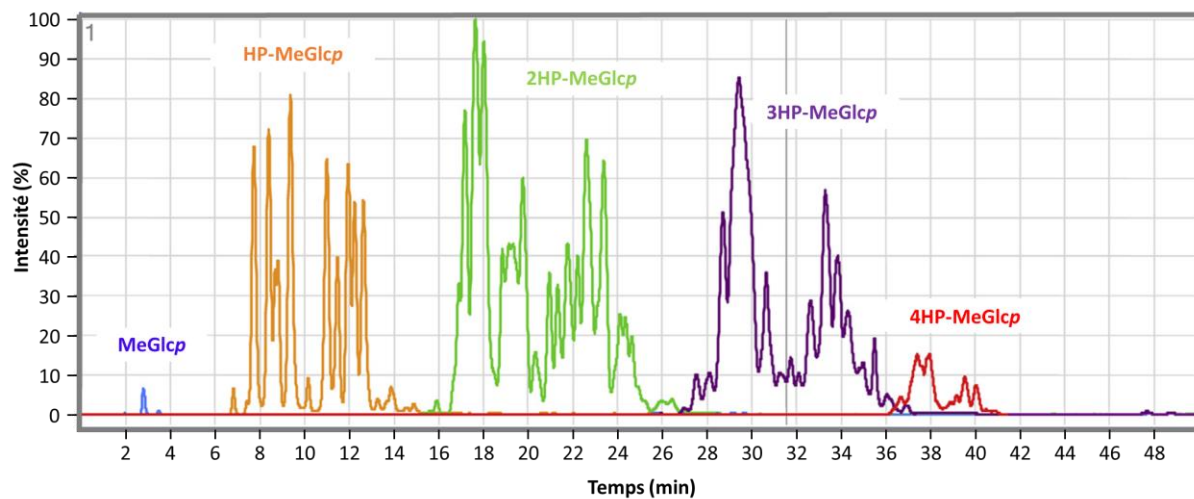


Figure 31 : Analyse LC-ESI-MS d'un échantillon méthanolisé d'HPBCD de DS de 9.7. MeGlc p : Glucopyranose méthanolisé. HP : Hydroxypropyle. D'après [122].



### I.2.3. Conclusion

La différence de stratégie de caractérisation pour les CDs naturelles et leurs dérivés purifiés d'une part, et pour les mélanges de dérivés de CDs d'autre part est notable. La relative facilité de caractérisation de composés purs permet aujourd'hui de disposer d'une impressionnante base de données des caractéristiques des CDs naturelles. De plus, les nouveaux dérivés purs sont eux même le plus souvent correctement caractérisés (stéréochimie, position et nombre de greffages). Concernant les mélanges de CDs obtenus par voies non-sélectives, seule le degré de substitution est généralement recherché, alors qu'il a été montré la présence de nombreux isomères pour chaque DS. Sachant que chaque analogue possède des propriétés physico-chimiques spécifiques, il semble important de pouvoir définir si, lors de la réalisation de synthèses non-sélectives, la nature du mélange obtenu est répétable et reproductible, en terme de DS mais également d'isomérisation.

La mobilité ionique a apporté de nouvelles données expérimentales permettant de mieux appréhender le comportement des CDs naturelles en phase gazeuse. Néanmoins, il est notable que cette technique séparative n'a pas été exploitée afin d'améliorer la caractérisation de mélanges de dérivés de CDs. L'ajout d'une dimension de séparation associée à la mesure d'une caractéristique intrinsèque, autorisant une comparaison avec les modèles théoriques, fait de cette technique d'analyse un outil prometteur pour améliorer le niveau de caractérisation sans étapes de purification.

## II. Résultats et discussion

*L'essentiel des travaux décrits et discutés dans ce chapitre a été publié :*

### II.1. Apport des cyclodextrines à une formulation orale liquide du carvedilol

- Rigaud, S.; Mathiron, D.; Moufawad, T.; Landy, D.; Djedaini-Pilard, F.; Marçon, F. Cyclodextrin Complexation as a Way of Increasing the Aqueous Solubility and Stability of Carvedilol. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1746, doi:10.3390/pharmaceutics13111746. (Annexe 1).

### II.2. Mise en place d'une approche de caractérisation des mélanges de dérivés de CDs

- Oliva, E.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Monflier, E.; Sevin, E.; Bricout, H.; Tilloy, S.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Bonnet, V.; Pilard, S.; Djedaini-Pilard, F. New Lipidyl-Cyclodextrins Obtained by Ring Opening of Methyl Oleate Epoxide Using Ball Milling. *Biomolecules* **2020**, *10*, 339, doi:10.3390/biom10020339. (Annexe 2).
- Rigaud, S.; Dosso, A.; Lesur, D.; Cailleu, D.; Mathiron, D.; Pilard, S.; Cézard, C.; Djedaini-Pilard, F. Mass Spectrometry, Ion Mobility Separation and Molecular Modelling: a powerful combination for the Structural Characterization of Substituted Cyclodextrins Mixtures. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 13352, <https://doi.org/10.3390/ijms232113352>. (Annexe 3).



## II.1. Apport des cyclodextrines à une formulation orale liquide du carvedilol

### II.1.1. Introduction

Le carvedilol est une substance active décrite pour la première fois en 1984 (source SciFinder), le reportant en tant que substance utilisée pour traiter l'hypertension [135]. D'origine synthétique, la première voie de synthèse a été brevetée en 1985 [136], décrivant la synthèse non-stéréospécifique menant à la formation de la forme racémique du carvedilol et de ses dérivés (Schéma 10).

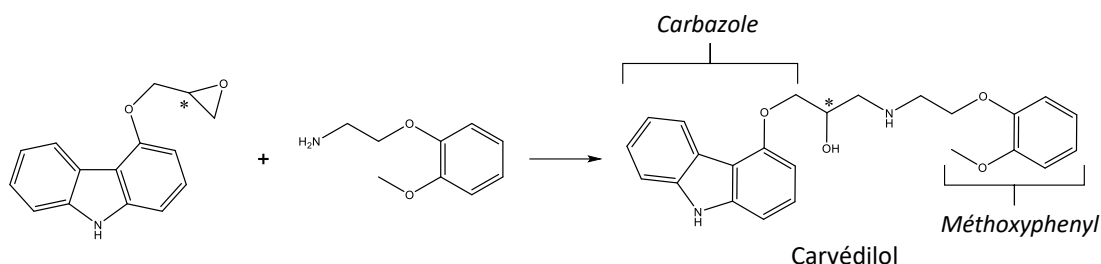


Schéma 10 : Voie de synthèse originale du carvedilol. D'après [137]

Le nombre de produits secondaires formés et le rendement de cette voie originale ont initié la recherche de nouvelles voies de synthèse alternatives en vue d'améliorer la production du carvedilol, aboutissant à de nombreux brevets. Parmi ces derniers, la voie de synthèse décrite par Kim *et coll.* permet, via plusieurs étapes de protection/déprotection, la synthèse stéréospécifique amenant à l'obtention de l'énantiomère souhaité ( $R^*$  ou  $S^*$ ) [138]. Malgré cette possibilité le carvedilol est néanmoins actuellement commercialisé et administré sous sa forme racémique [139].

Cette substance active a un intérêt tout particulier en lien avec sa structure, représentée sur la Schéma 11, dans la mesure où elle présente une fonction anti-oxydante,  $\beta$ -bloquante et  $\alpha$ -bloquante [140].

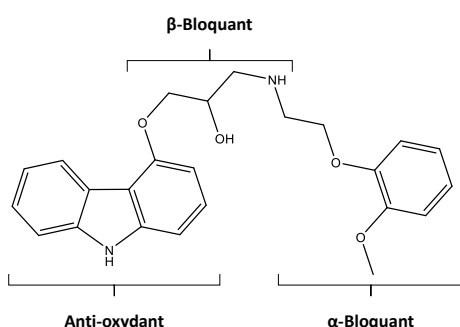


Schéma 11 : Structure du carvedilol annotée des descriptions des fonctions chimiques et des effets thérapeutiques associés à chaque partie de la molécule. D'après [140].

La présence de ces trois propriétés au sein d'une même structure a suscité l'intérêt de nombreuses recherches, afin d'évaluer leurs influences sur les mécanismes cardiovasculaires et les cellules cardiaques, et notamment dans le cas du traitement des troubles cardiaques légers à modérés [141].

Cette substance active, classée BCS II chez l'adulte, est un modèle de choix pour l'étude des interactions avec les cyclodextrines [142]. En effet, La présence de deux groupements aromatiques (la partie carbazole et méthoxyphényle), son caractère racémique, basique, sa faible solubilité aqueuse ( $\approx 35 \mu\text{M}$ ) [143] et sa biodisponibilité ( $\approx 25\%$ ) [137] qui en découle font de l'étude des interactions CDs-Carvédilol un enjeu particulier. Enfin, le développement d'une formulation liquide du carvédilol présente un intérêt d'applicabilité de par sa présence dans les besoins pédiatriques européens et de son utilisation recommandée chez l'enfant pour le traitement des troubles cardiaques légers à modérés. [144,145].

L'étude de l'efficacité des CDs est reportée dans la littérature, mais principalement pour la formation de complexes à l'état solide à destination d'une administration par voie orale. Dans ce contexte, l'intérêt des CDs est principalement d'augmenter la cinétique de dissolution du carvédilol [69,146]. Pour cela, plusieurs méthodes de préparation sont reportées, telle que le pétrissage [147], le micro-onde [148], la lyophilisation [149], la co-évaporation [150], co-précipitation [151] ainsi que le séchage par atomisation [64,152].

Les complexes d'inclusion du carvédilol à base de CDs ont également été décrits en phase liquide, principalement en présence de  $\beta\text{CD}$  et de ses dérivés hydroxypropylés et méthylés. L'effet solubilisant observé est modéré et les expériences souvent réalisées dans l'eau pure ou un tampon à pH neutre. Pour une concentration de 10 mM en CDs, le carvédilol est solubilisé à hauteur de  $400 \mu\text{M}$  et  $500 \mu\text{M}$  respectivement en présence de  $\beta\text{CD}$  et d'HP $\beta\text{CD}$  dans l'eau pure [153]. Pour ces deux mêmes CDs dans le même milieu, des valeurs différentes ont été rapportées, montrant un effet solubilisant de l'HP $\beta\text{CD}$  moins fort que la  $\beta\text{CD}$ , qui concentrées à 2.5 mM mènent respectivement à une solubilité du carvédilol de  $57.7 \mu\text{M}$  et  $62.9 \mu\text{M}$  [154]. Une autre étude rapporte que 2 mM d'HP $\beta\text{CD}$  permet de solubiliser  $35 \mu\text{M}$  de carvédilol, soit une valeur équivalente à sa solubilité intrinsèque, mettant en évidence une disparité de l'efficacité de ces CDs dans l'eau pure dans la littérature [155]. La RAMEB montre également un léger effet solubilisant dans ce milieu, permettant d'atteindre une concentration de  $130 \mu\text{M}$  de carvédilol pour 10 mM de CD [150]. En tampon phosphate (pH 7.4), 143 mM d'HP $\beta\text{CD}$  permet la solubilisation d'1 mM de carvédilol, correspondant à une forte hausse de la concentration solubilisée en comparaison des valeurs citées précédemment, mais impliquant une grande quantité de CDs [156]. Les stœchiométries des complexes reportées diffèrent également selon les publications, déterminées comme étant 1:1 ou 2:1 (CD:carvédilol), pour un même système.

Ces faibles valeurs de solubilité et le caractère ionisable du carvédilol ont motivé certaines équipes à investiguer l'effet du pH sur la formation des complexes d'inclusion. Loftsson *et coll.* ont étudié l'efficacité solubilisante de différentes CDs à travers des expériences de diagrammes de phases dans plusieurs milieux à pH acide. Dans cette étude, il a été montré que l'acide acétique offre un effet solubilisant intéressant sur le carvédilol, augmentant sa solubilité en absence de CDs à 17 mM. De plus,

il permet l'obtention d'efficacités de complexation (CE) élevées en présence de CDs, d'une valeur de 1.62 et 1.60 respectivement en présence d'HP $\beta$ CD et de SBE $\beta$ CD [157]. Néanmoins, l'acide acétique est un milieu à exclure d'une formulation liquide destinée à une prise par voie orale en raison de son goût et odeur de vinaigre.

Cet état de l'art concernant l'apport des CDs sur la solubilité de carvédilol met en évidence une hétérogénéité des valeurs reportées dans la littérature. De plus, ces valeurs de solubilité sont un indicateur de l'association entre les CDs et le carvédilol mais ne permettent pas de déterminer si une concentration en carvédilol suffisamment haute dans un milieu acceptable pour une administration orale d'une solution chez l'enfant est atteignable. En effet, la dose d'environ 0.5 mg/kg/jour associée aux recommandations de volumes d'ingestion acceptables chez l'enfant mènent à la nécessité d'obtenir une solution de carvédilol concentrée à 5 mg/mL environ (12.3 mM) [144,158]. C'est pourquoi les objectifs de ce chapitre seront de déterminer si cette concentration cible est atteignable grâce aux CDs, via une étude comparative de différents milieux et CDs permettant l'obtention de données homogènes. La caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion sera réalisée afin de décrire aux mieux les objets supramoléculaires responsables de la hausse de solubilité du carvédilol. Enfin, l'apport des CDs les plus prometteuses sur la photostabilité du carvédilol sera investiguée.

### II.1.2. Solubilité en milieu aqueux

#### II.1.2.1. Méthode de préparation des échantillons

Il existe différentes méthodes de préparation de solutions destinées à permettre la détermination de la solubilité d'une molécule en milieu aqueux, présentant chacune des avantages et des inconvénients [159]. Dans le cadre de cette étude, l'objectif est de mesurer tant la solubilité aqueuse intrinsèque du carvédilol que l'effet solubilisant des CDs, une méthode de préparation en accord avec ces deux objectifs doit donc être privilégiée.

Nous nous sommes orientés vers une préparation simple des échantillons, sans utiliser de procédés impliquant par exemple des gradients de température ou de changements d'état des solides utilisés (lyophilisation, évaporation à sec) : les cyclodextrines ont été dissoutes en milieu aqueux puis mises en contact de la substance active étudiée. Concernant l'état de la substance active, ici du carvédilol, deux solutions ont été envisagées (Schéma 12). En effet, elle peut être d'une part préalablement solubilisée dans un solvant organique volatile à une forte concentration, permettant ainsi son ajout en quantité faible et précise, par la manipulation de volume et l'augmentation des probabilités de rencontres avec les cyclodextrines lors de l'agitation. D'autre part, le simple ajout sous forme solide commerciale présente l'intérêt de limiter les phénomènes parasites, en intégrant au milieu uniquement les éléments entre lesquels une interaction est recherchée.

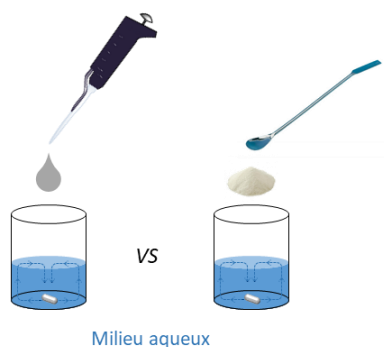


Schéma 12 : Comparaison des méthodes d'ajout du carvédilol, préalablement solubilisé à 167 mM dans l'acétone (gauche) ou sous forme solide commerciale (droite).

Des deux méthodes envisagées, l'ajout du carvédilol sous forme solubilisée dans un solvant organique est celle présentant le plus d'avantages, permettant également de s'affranchir des cinétiques de dissolution dans l'eau dépendantes de la cristallinité et d'interactions intermoléculaires telles que le  $\pi$ -stacking. Le choix du solvant organique s'est orienté vers l'acétone en raison de son faible point d'ébullition ( $T_{eb} = 56^{\circ}\text{C}$ ), de sa miscibilité à l'eau et de sa capacité à solubiliser le carvédilol à hauteur de 165 mM environ (détermination expérimentale). Dans ces conditions, 30  $\mu\text{L}$  de solution concentrée en carvédilol sont suffisants pour ajouter une concentration équivalente à 1 mM (pour un  $V_{tot} = 5 \text{ mL}$ ) aux solutions aqueuses avec ou sans cyclodextrines. Néanmoins, il est nécessaire de déterminer la vitesse d'évaporation de l'acétone dans l'eau afin de s'assurer que le volume restant avant l'analyse soit au moins inférieur à 0.1  $\mu\text{L}$ . En effet, la présence de 0.1  $\mu\text{L}$  d'acétone dans un volume de 5 mL d'eau conduirait à une solubilisation du carvédilol à hauteur de 3.3  $\mu\text{M}$  due à l'acétone, une concentration considérée négligeable. Cette condition a donc motivé la mise en place d'une étude cinétique de l'évaporation de l'acétone suivie par RMN  $^1\text{H}$  à travers l'intégration de son signal, considérant l'aire mesurée au temps initial comme correspondante au volume ajouté initialement. Afin d'observer si la quantité d'acétone ajoutée influence sa vitesse d'évaporation, deux volumes d'ajout ont été testés, à 15  $\mu\text{L}$  et 30  $\mu\text{L}$ , conduisant respectivement à des concentrations de 100 mM et de 160 mM ( $V_{tot} = 2 \text{ mL}$  et 2.5 mL) en phase aqueuse. Les échantillons ont été chauffés à 40°C le temps de l'expérience pour favoriser l'évaporation. Comme observé sur la Figure 32, la diminution progressive de l'intensité du pic correspondant à l'acétone ( $\delta = 2.14 \text{ ppm}$ ), et donc sa valeur d'intégration, met en évidence son évaporation au cours du temps, jusqu'à un volume restant de 0.03  $\mu\text{L}$  après 120 min d'agitation. Cette expérience a donc permis de montrer que 2 heures sous agitation à 40°C mène, lors d'un ajout initial de 30  $\mu\text{L}$  d'acétone, à une réduction de sa quantité dans l'eau jusqu'à un volume permettant de solubiliser seulement 1  $\mu\text{M}$  de carvédilol, ce qui sera considéré comme un biais acceptable lié à la préparation.

Cependant, cette étude ne prend pas en considération l'effet que peuvent avoir les cyclodextrines sur cette cinétique. Afin d'observer si une interaction entre les CDs et l'acétone est présente, l'analyse par RMN  $^1\text{H}$  de la  $\beta\text{CD}$  dans le  $\text{D}_2\text{O}$  seul ou tamponné acétate 0.1M a été réalisée avant et après ajout de 0.6% (v/v) d'acétone- $d_6$ . Ce pourcentage volumique correspond à celui évoqué précédemment, prévu pour les analyses de solubilité.

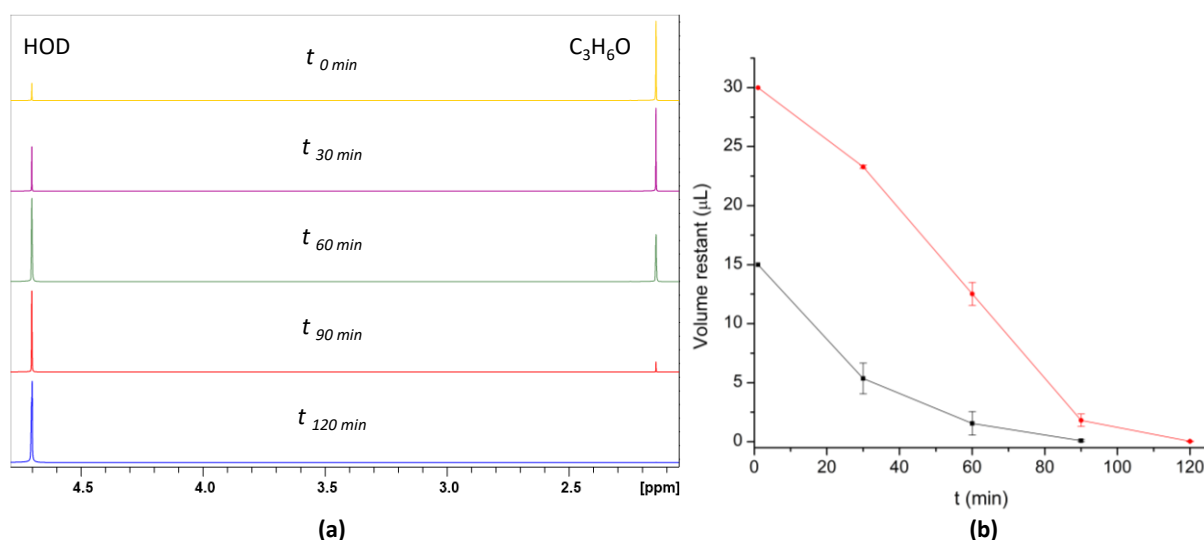


Figure 32 : Cinétique d'évaporation de l'acétone dans le  $\text{D}_2\text{O}$  en mélange à  $40^\circ\text{C}$ . (a) Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ) après 0 min (jaune), 30 min (violet), 60 min (vert), 90 min (rouge) et 120 min (bleu). (b) Courbe du volume d'acétone restant en fonction du temps lors d'un ajout initial de 15  $\mu\text{L}$  (noir) ou 30  $\mu\text{L}$  (rouge) d'acétone, obtenue par l'intégration du signal de l'acétone observée par RMN  $^1\text{H}$ .

L'étude des spectres RMN  $^1\text{H}$  partiels obtenus (Figure 33) met en évidence une variation des déplacements chimiques des signaux de la  $\beta\text{CD}$  entre le spectre dans le  $\text{D}_2\text{O}$  seul et celui dans le tampon acétate. Lorsque que les variations concernent tous les  $^1\text{H}$ , sans distinction entre ceux situés à l'intérieur ou l'extérieur de la cavité, et que la présence du tampon acétate affecte le pH de la solution, ces variations de déplacements chimiques sont attribuables à une modification de la force ionique du milieu. A l'inverse, l'ajout d'une faible quantité d'acétone affecte uniquement le déplacement chimique des protons H3 et H5, situés à l'intérieur de la cavité, mettant en évidence un équilibre d'inclusion entre l'acétone et la  $\beta\text{CD}$  en tampon acétate [75].



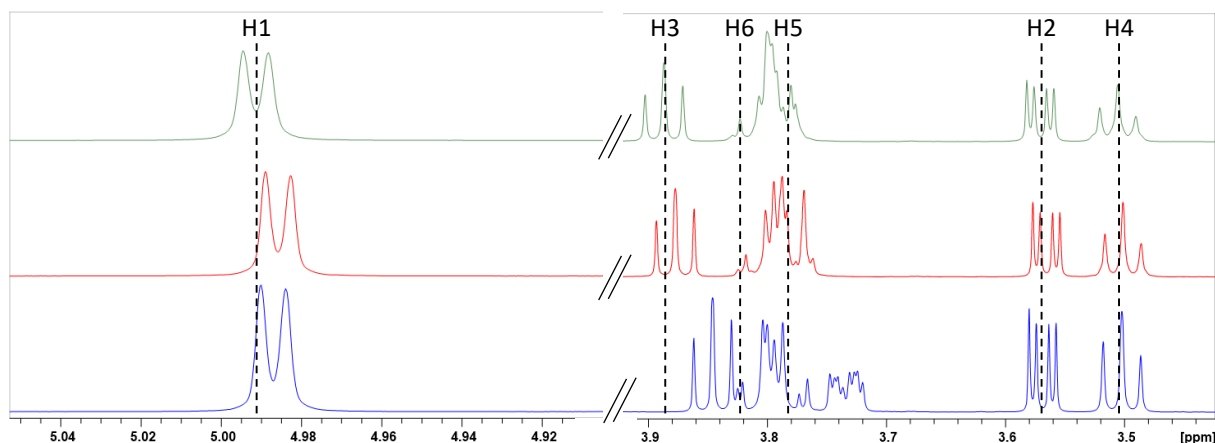


Figure 33 : Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, 298 K) de la  $\beta\text{CD}$  dans le  $\text{D}_2\text{O}$  (vert), le  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1M sans acétone- $\text{d}_6$  (rouge) et avec 0.6 % (v/v) d'acétone- $\text{d}_6$  (bleu).

Cette observation remet en question la méthode de préparation des échantillons par l'intermédiaire d'une solubilisation préalable du carvédilol dans l'acétone. En effet, la présence d'un équilibre d'inclusion entre le solvant organique utilisé pour solubiliser la substance active et la/les cyclodextrines testées engendre 1) la diminution de la cinétique d'évaporation dudit solvant par son engagement dans un second équilibre et 2) une diminution de la disponibilité des CDs pour former un complexe d'inclusion avec le composé testé (ici le carvédilol) due à une compétition avec le solvant organique [160]. Les résultats de cette étude préliminaire tendent vers une utilisation privilégiée de la méthode de préparation consistant au simple ajout de la forme solide commerciale de la substance active testée au milieu aqueux étudié, en présence ou en absence de CDs. Cette méthode, la plus simple possible, présente également l'avantage de pouvoir être réalisée à différentes échelles sans engendrer, à priori, de changements de cinétique liés aux quantités et aux volumes.

#### II.1.2.2. Choix de la méthode de dosage du carvédilol

Différents choix de méthodes d'analyse sont possibles pour le dosage de la teneur en carvédilol dans les milieux aqueux testés. Dans la mesure où cette substance active dispose de plusieurs groupements aromatiques (carbazole et méthoxyphényle), son observation par un détecteur UV est envisageable. La mesure de l'absorbance peut être réalisée en cuve par un spectrophotomètre classique ou par une séparation chromatographique couplée à un détecteur UV. Dans le cas présent, la mesure de la valeur d'absorbance du carvédilol en présence de CDs peut être biaisée par la formation de complexes d'inclusion. En effet, les groupements aromatiques étant connus comme étant des sites d'inclusion privilégiés, leur interaction avec la cavité des CDs peut modifier 1) la longueur d'onde d'absorption maximale (effet batho et hypso, positif et négatif respectivement) et 2) la mesure absolue de l'absorbance (effet hyper et hypo, positif et négatif respectivement) [71]. L'injection des solutions analysées vers une colonne chromatographique en phase inverse offre l'avantage de s'affranchir de

cet effet, séparant ainsi la molécule analysée des CDs présentes dans le milieu. A l'exception des CDs modifiées et la présence de groupements hydroxypropyles ou méthyles (HPCDs, MeCDs), les CDs ont une polarité suffisamment haute pour être éluées rapidement lors d'une analyse par gradient sur une phase stationnaire inverse, à l'opposé des composés peu solubles dans l'eau qui sont davantage retenus. Il est à noter que les CDs modifiées utilisées sont commercialisées sous forme de mélange (degré de substitution, isomérisation), leur séparation par chromatographie permet donc, malgré une rétention plus forte que les CDs naturelles, de diminuer leur quantité lors de la détection du composé analysé. Pour ces raisons, les mesures de l'absorbance ont été effectuées par l'utilisation d'un système de chromatographie couplé à un détecteur UV. La méthode de chromatographie utilisée, représentée Figure 34 et issue de la littérature, a été choisie car elle a été développée avec l'objectif d'observer les produits de dégradation du carvédilol [161]. Les étapes de validation de méthodes ont été décrites et le carvédilol est élué au milieu du gradient, permettant la séparation d'éventuels produits de dégradation moins polaires. Il est remarquable que cette méthode permet, notamment en raison des dimensions UHPLC de la colonne, l'observation du pic correspondant au carvédilol à une faible concentration (2.5  $\mu$ M) en conservant un rapport signal / bruit acceptable.

La spectrométrie de masse est également une option de détection intéressante car elle offre une haute sensibilité, appropriée à la détermination de la solubilité de composés très peu solubles. Avec l'objectif de déterminer l'apport en terme de sensibilité de la détection par MS, l'analyse de solutions de carvédilol à différentes concentrations par un système UHPLC couplé en ligne à un détecteur à barrette de diode et à un spectromètre de masse haute résolution a été réalisée. Ce couplage en ligne offre l'avantage d'obtenir en une unique analyse la réponse du carvédilol par la détection UV et MS, permettant une comparaison fiable de la réponse des deux détecteurs. L'intégration du pic correspondant au carvédilol montre, pour les deux détections, une bonne linéarité dans la gamme de concentration analysée (Figure 35).

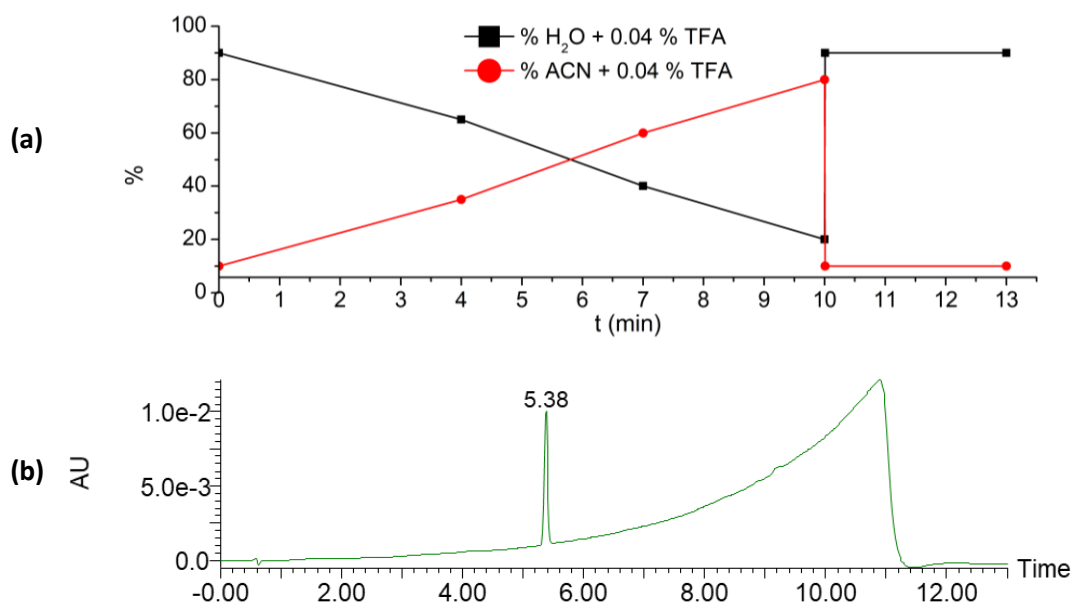
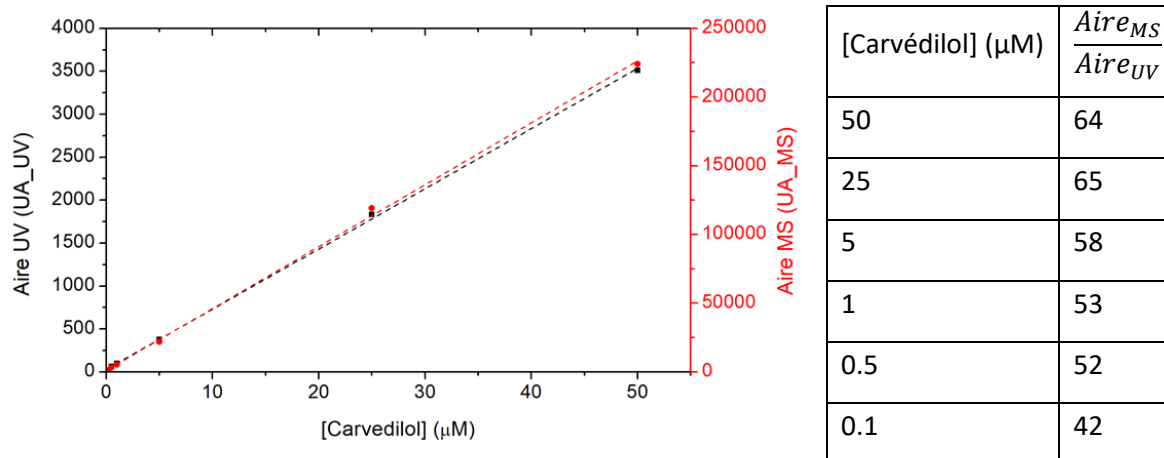


Figure 34 : (a) Représentation du gradient utilisé [161]. (b) Chromatogramme UV (241 nm) obtenu par l'analyse d'une solution de carvedilol (2.5  $\mu$ M) avec le gradient représenté.

Les valeurs d'intégration ont été obtenues d'une part en UV par la reconstitution de l'absorbance à la longueur d'onde d'absorption maximale du carvedilol (241  $\pm$  1 nm) et d'autre part en MS par la reconstitution du courant ionique de l'adduit  $[M+H]^+$  du carvedilol ( $[\text{carvedilol} + H]^+$ ,  $m/z = 407.1965 \pm 10$  ppm). Comme attendu, la valeur d'intégration obtenue par MS est supérieure à celle en UV, en moyenne d'un facteur 50. Cependant, cette comparaison met en évidence que la détection UV à 241 nm permet d'observer le carvedilol jusqu'à des concentrations inférieures au  $\mu$ M, ce qui est suffisant au regard de la solubilité du carvedilol dans l'eau reportée dans la littérature, de l'ordre de 10-40  $\mu$ M [137,143,157]. De plus, l'utilisation de la spectrométrie de masse en tant que détecteur en vue de doser un composé implique davantage de précautions, notamment en raison des variations de réponses parfois observées liées à la source électrospray (compétition d'ionisation, encrassement de la source).



*Figure 35 : Superposition des courbes d'étalonnage obtenues par analyse en UV (noir) et MS (rouge) (gauche) associée au rapport de l'aire obtenue par MS sur l'aire UV en fonction de la concentration en carvédilol (droite).*

Dorénavant le dosage du carvédilol par calibration externe se fera donc par cette méthode de séparation chromatographique couplée à une détection par UV (241 nm). Avant chaque analyse, 1 mL de solution sera filtré (PVDF, porosité 0.2 µm, diamètre 13 mm) pour éliminer l'excès de solide avant d'effectuer une dilution appropriée dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN (50/50).

### II.1.2.3. Essais préliminaires de milieux en absence de CDs

Le carvédilol est un composé basique comportant deux amines secondaires, avec un pKa globale reporté aux alentours de 7.8. Le caractère acido-basique de cette molécule permet donc de moduler, en diminuant le pH de la solution étudiée, la quantité de forme chargée ou neutre en solution, impactant ainsi sa solubilité aqueuse. Afin d'assurer la stabilité du pH en fonction de la quantité de carvédilol solubilisée, des milieux tamponnés ont été privilégiés et mis en comparaison avec une mise à pH par HCl. Les choix de la nature des tampons et de la gamme de pH étudiée ont été motivés par des critères d'acceptabilité lors de la prise de médicaments par voie orale chez les enfants. De ce fait, le pH minimal a été fixé à une valeur de 3 et la concentration des tampons étudiés à 0.1 M. La Figure 36 reprend la solubilité mesurée du carvédilol en fonction du pH dans les tampons citrate, phosphate et citrate-phosphate à 0.1M, ainsi qu'une solution acide non-tamponnée mise à pH par HCl. Cette expérience met en évidence une nette augmentation de la solubilité du carvédilol avec une diminution du pH, s'accroissant en dessous d'un pH mesuré à 5, pour tous les tampons étudiés. Il est à noter que les pH initiaux des milieux étudiés étant identiques, fixés à 3, 4, 5.5 et 7 (3 et 5.5 avec le tampon citrate), la stabilité du pH selon la nature du tampon est donc également représentée. Outre la stabilité du pH qui est fonction du pKa des acides utilisés, la différence de nature des tampons utilisés n'affecte pas significativement la solubilité du carvédilol seul, montrant davantage une dépendance au pH. Cependant, il a été rapporté par l'équipe de Loftsson que la solubilité du carvédilol est significativement augmentée par l'utilisation d'acide acétique ou de tampon acétate, mettant en évidence que la nature de l'acide utilisé peut fortement impacter la solubilité du carvédilol par la formation de sels aux solubilités différentes [157].

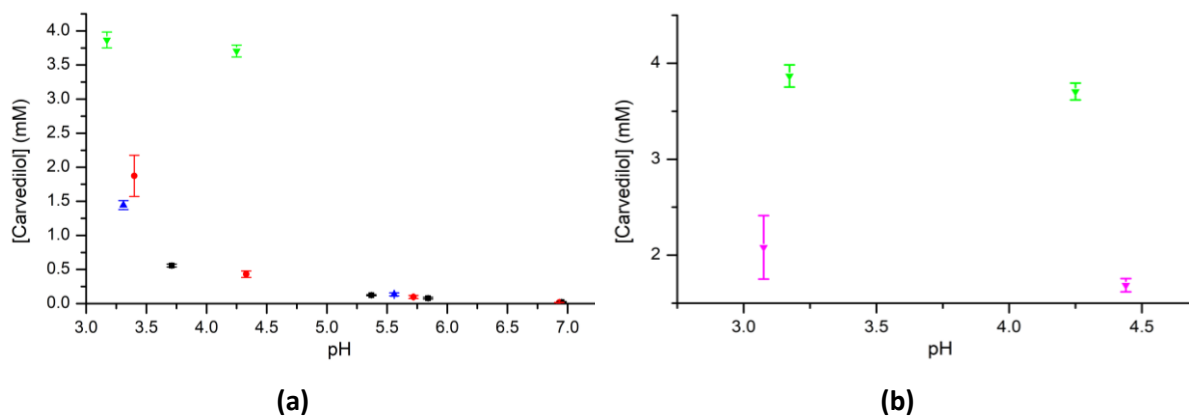


Figure 36 : (a) Solubilité du carvédilol en fonction du pH en tampon phosphate 0.1 M (noir), tampon citrate 0.1 M (bleu), tampon phosphate-citrate 0.1 M (rouge) et HCl (vert). (b) Solubilité du carvédilol lors de l'ajout de 2 mg/mL (vert) ou de 4 mg/mL (magenta) en présence d'HCl en fonction du pH.

De plus, la différence de solubilité rapportée entre le milieu contenant de l'acide acétique ( $S_0 = 7$  mg/mL) ou son homologue tamponné ( $S_0 = 0.1$  mg/mL) montre que l'utilisation d'acides seuls peut permettre d'atteindre de plus hautes performances de solubilisation que lors de l'ajout de l'acide accompagné de sa base conjuguée. Cette observation a motivé la mesure de solubilité du carvédilol lors d'une mise à pH par HCl, représenté en vert sur la Figure 36 (a), limitant ainsi l'introduction de composés organiques dans le milieu testé. De manière intéressante, la solubilité mesurée est deux fois plus importante que dans un milieu tamponné à un pH compris entre 3 et 3.5. La courbe de solubilité semble également différente des milieux discutés précédemment au vu de la faible diminution de la solubilité mesurée, à 3.7 mM au pH de 4.25 contre 0.5 mM dans le tampon phosphate-citrate au même pH final. Il est à noter que cette observation est différente de celle réalisée par Loftsson et coll. qui rapportent que HCl a un effet solubilisant 10 fois inférieur à l'acide phosphorique, en raison de la nature des sels générés.

La mesure de solubilité du carvédilol dans l'eau mise à pH par HCl a été répétée, en ajoutant le double de carvédilol solide (4 mg/mL vs 2 mg/mL) afin d'évaluer si la quantité ajoutée a une influence sur sa solubilité. Comme observé sur la Figure 36 (b), la solubilité apparaît dépendante de la quantité ajoutée, avec une concentration mesurée à 2 mM et 4 mM lors de l'ajout de 4 mg/mL et 2 mg/mL respectivement, pour un pH final identique ajusté par HCl. Cette dépendance met en évidence l'influence de la méthode de préparation des solutions de carvédilol utilisées pour mesurer sa solubilité en milieu aqueux. Il a été rapporté, pour le cas de l'indométacine, une forte dépendance de la quantité de solide ajoutée sur sa solubilité, une observation également dépendante du pH [162]. En effet, il a été montré dans cette étude qu'à pH 5, une grande quantité ajoutée d'indométacine diminue sa solubilité alors que l'inverse est observé à pH 7. Cette publication met également en avant que les courbes de solubilité et de cinétique de dissolution en fonction du pH et de la quantité ajoutée sont différentes selon les substances actives étudiées, soulignant l'importance de la méthode de

préparation et la maîtrise du pH des solutions. L'observation de cette diminution de la solubilité du carvédilol en fonction de la quantité de solide ajoutée est intéressante car les mesures de solubilité en présence de CDs impliquent classiquement l'ajout d'un plus large excès de solide, notamment lors de la réalisation des diagrammes de phase.

## II.1.2.4. Apport des CD sur la solubilité du carvédilol

### II.1.2.4.1. Comparaison de l'effet solubilisant des CD

Afin d'évaluer l'efficacité des CD sur la solubilisation du carvédilol en milieu aqueux, leur concentration a été dans un premier temps fixée à 10 mM. Pour cette étude, le carvédilol a été ajouté sous forme solide à hauteur de 10 mg/mL dans 3 mL des différents milieux étudiés. Les tampons étudiés ont été utilisés pour solubiliser les CD afin de les ajouter directement au carvédilol solide. Le milieu mis à pH acide par HCl a été préparé par l'ajout de solutions aqueuses de CD au carvédilol solide, suivi de l'ajout d'HCl 1 M pour obtenir une concentration finale en HCl équivalente en molarité à celle du carvédilol ajouté. La Figure 37 reprend l'intégralité des valeurs de solubilité du carvédilol en absence ou en présence de CD dans l'eau pure, un tampon acétate (0.1 M, pH = pKa = 4.7), citrate (0.1 M, pH = pKa<sub>1</sub> = 4.7) et mise à un pH compris entre 3 et 3.5 par HCl. Afin d'alléger la lecture, le terme « mise à pH par HCl » sera par la suite remplacé par « HCl », signifiant une molarité d'HCl équivalente à celle du carvédilol ajouté et un pH final acide. Le pH des tampons a été choisi pour obtenir un effet tampon maximal et comparable. Comme évoqué précédemment, le caractère basique du carvédilol engendre, lors de sa dissolution, une augmentation du pH qui défavorise alors sa solubilité.

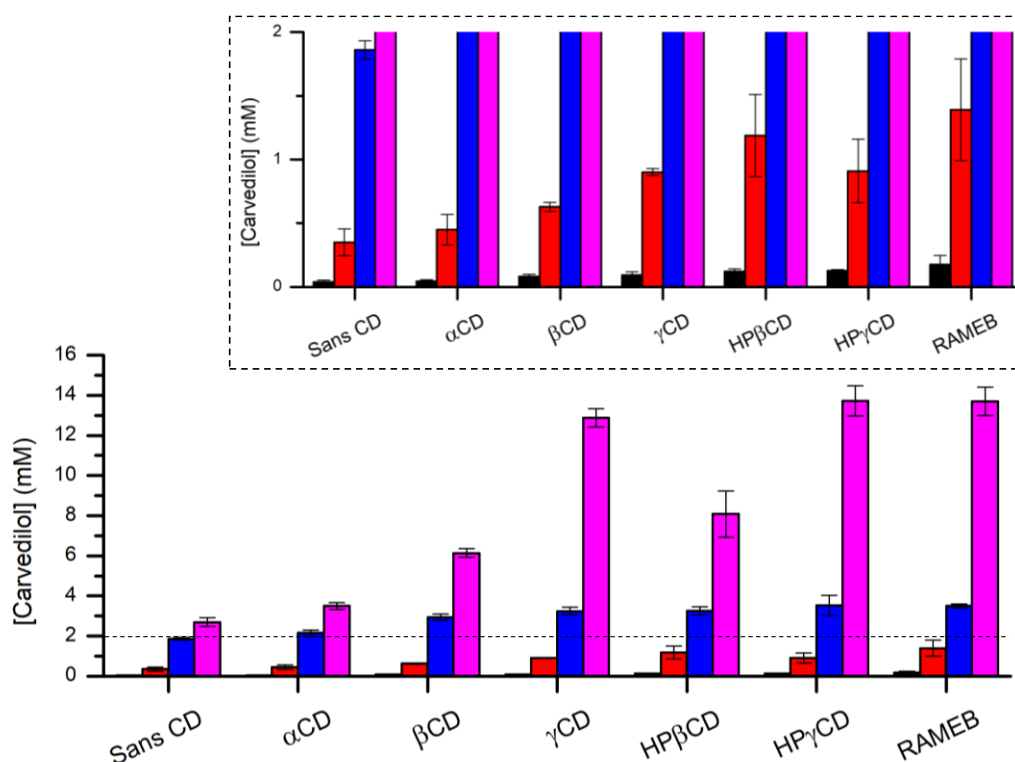


Figure 37 : Solubilité du carvédilol en absence ou en présence de 10 mM de CD dans l'eau pure (noir), tampon citrate 0.1 M (pH = 4.7) (rouge), en présence d'HCl (pH ~ 3.5) (bleu) ou en tampon acétate 0.1 M (pH = 4.7) (magenta).

Quel que soit le milieu considéré, il est notable que l' $\alpha$ CD n'augmente pas significativement la solubilité du carvédilol. Correspondant à la taille de cavité la plus petite, l'hypothèse selon laquelle les

groupements hydrophobes du carvédilol sont trop volumineux pour permettre leur inclusion dans la cavité de l'αCD peut être émise [163]. En effet, le groupement carbazole est volumineux et le méthoxyphényle est substitué en ortho, son diamètre est plus grand qu'avec une substitution en para. Le tampon acétate, comme reporté par Loftsson et coll. permet l'obtention de la plus haute augmentation de solubilité du carvédilol en absence de CDs, allant d'une valeur mesurée de 39 μM dans l'eau pure à une valeur de 2.6 mM dans ce tampon. De plus, ce milieu permet, en présence de 10 mM de γCD, d'HPγCD et de RAMEB la solubilisation du carvédilol à hauteur de 12.5 mM, menant à un rapport CD/SA inférieur à 1 et à l'obtention de la concentration cible fixée. Cependant, l'utilisation de ce tampon dans une formulation orale à destination pédiatrique n'est pas envisageable en raison de l'odeur et du goût de vinaigre qu'il génère, ce qui est incompatible avec une bonne acceptabilité. Il offre néanmoins une capacité de solubilisation du carvédilol intéressante pour effectuer l'analyse par RMN des complexes formés avec les CDs étudiées et son caractère tamponné permet d'envisager la réalisation d'expériences de titrations par ITC.

Parmi les autres conditions testées, HCl est plus efficace que le tampon citrate, lui-même plus efficace que l'eau pure. Le Tableau 8 indique les valeurs de solubilité associées à l'erreur de mesure sur 3 répétitions de préparation, ainsi que le facteur R qui met en évidence le facteur d'augmentation de la solubilité liée à la présence de CDs (Équation 8).

*Équation 8 : Définition du facteur R représentatif de l'effet solubilisant des CDs concentrées à 10 mM sur le carvédilol, pour un milieu donné.*

$$R = \frac{[\text{carvédilol}]_{\text{CDs } 10 \text{ mM}}}{[\text{carvédilol}]_{\text{sans CDs}}}$$

L'utilisation de ce facteur, analogue au CE décrit dans la littérature et obtenu en 2 points, permet une comparaison rapide de l'effet solubilisant des CDs dans les différents milieux testés [88]. Dans l'eau pure, une valeur maximale de R de 4.5 environ est obtenue lors de l'ajout de 10 mM de RAMEB nous indiquant que pour cette concentration de CDs, ce mélange de CDs méthylées offre le plus grand effet solubilisant. Il est intéressant de noter que seul l'utilisation du tampon acétate mène à l'obtention de R supérieurs à ceux calculés dans l'eau pure.



Tableau 8 : Solubilité du carvédilol (S, mM) mesurée dans les solutions aqueuses testées associée au facteur d'augmentation (R) de solubilité par l'ajout de 10 mM de CDs

	Eau pure		Tampon acétate 0.1M		Tampon citrate 0.1M		HCl	
pH initial	7		4.7		4.7		3.5	
	S (mM)	R	S (mM)	R	S (mM)	R	S (mM)	R
Sans CDs	0.039 ± 0.014	-	2.694 ± 0.211	-	0.350 ± 0.107	-	1.861 ± 0.070	-
$\alpha$ CD	0.044 ± 0.014	<b>1.14</b>	3.501 ± 0.174	<b>1.30</b>	0.450 ± 0.120	<b>1.29</b>	2.157 ± 0.145	<b>1.16</b>
$\beta$ CD	0.081 ± 0.018	<b>2.10</b>	6.133 ± 0.218	<b>2.28</b>	0.629 ± 0.035	<b>1.80</b>	2.946 ± 0.161	<b>1.58</b>
$\gamma$ CD	0.092 ± 0.026	<b>2.38</b>	12.881 ± 0.465	<b>4.78</b>	0.901 ± 0.027	<b>2.58</b>	3.242 ± 0.196	<b>1.74</b>
HP $\beta$ CD	0.122 ± 0.020	<b>3.14</b>	8.082 ± 1.154	<b>3.00</b>	1.188 ± 0.322	<b>3.40</b>	3.252 ± 0.199	<b>1.75</b>
HP $\gamma$ CD	0.128 ± 0.009	<b>3.30</b>	13.734 ± 0.752	<b>5.10</b>	0.910 ± 0.250	<b>2.60</b>	3.527 ± 0.501	<b>1.89</b>
RAMEB	0.177 ± 0.071	<b>4.58</b>	13.708 ± 0.709	<b>5.09</b>	1.390 ± 0.400	<b>3.98</b>	3.502 ± 0.106	<b>1.88</b>

Le choix d'ioniser une substance active, par un changement de pH, afin d'augmenter sa solubilité aqueuse peut conduire à une baisse de son affinité avec les CDs si la charge générée est portée par le groupement inclus. En effet, le placement d'une charge augmentant la polarité et la cavité étant hydrophobe, une diminution de leur affinité est attendue, pouvant expliquer que les valeurs de R issues des expériences en tampon citrate et dans l'eau mise à pH par HCl sont inférieures à celle obtenues dans l'eau pure [156]. L'augmentation de R en tampon acétate est davantage observée avec la  $\gamma$ CD et l'HP $\gamma$ CD, laissant supposer un agencement particulier rendu possible par la plus grande taille de cavité de ces CDs, en opposition aux dérivés  $\beta$ CD (naturelle ou HP). En tampon citrate, l'inverse est observé, les valeurs de R étant inférieures avec les dérivés  $\gamma$ CD, pouvant également être interprétées par la formation d'un agencement supramoléculaire particulier, comme un complexe ternaire, cette fois moins soluble. Pokharkar *et coll.* ont reporté l'utilisation d'acide citrique et de  $\beta$ CD utilisé conjointement afin d'augmenter la solubilité du carvédilol destiné à une formulation solide préparée par spray desséchant [69]. Dans leur étude, des expériences de solubilité à différentes concentrations d'acide citrique et/ou de  $\beta$ CD ont mis en évidence un effet synergique de ces deux composés à certaines concentrations sur la solubilité du carvédilol, diminuant avec la concentration en acide citrique. Il est à noter que les tampons utilisés sont ici concentrés à 0.1M, soit dix fois plus concentrés que les CDs étudiées, ce qui peut être à l'origine de l'observation de comportement différents de ceux observés dans la littérature à de plus faibles concentrations. En effet, avec l'utilisation de l'HP $\beta$ CD dans le tampon citrate, les proportions CD/Carvédilol/Citrate sont de 10/1/100, contraignant les CDs à interagir, si une affinité existe, préférentiellement avec le tampon.

Dans HCl, les écarts de R et donc de solubilité du carvédilol en fonction des CDs sont faibles, malgré une solubilité en moyenne supérieure à 3 mM. Les bonnes valeurs de solubilité obtenues peuvent en

partie être attribuées au pH des solutions, inférieurs à ceux des tampons préparés à pH 4.7 ( $\text{pH} = \text{pKa}$ ). Comme mis en évidence sur la Figure 36 (a), la solubilité du carvédilol augmente significativement en dessous du pH 5. Malgré une valeur de pH inférieur au  $\text{pKa} - 2$ , (à partir duquel une espèce devrait être sous une forme chargée proche de 100%), cette augmentation de solubilité peut indiquer que le carvédilol n'atteint pas cet équilibre dans les tampons ( $\text{pH} = 4.7$ ), alors qu'il est atteint dans HCl ( $\text{pH} < 4$ ). L'hypothèse suivante peut être émise pour expliquer ces faibles valeurs de R : la proportion de forme chargée est importante dans le milieu HCl, et si la charge est portée par un groupement inclus, l'affinité de la cavité des CDs avec ce groupement peut être diminuée [156]. Néanmoins, malgré un R faible dans HCl, la solubilité du carvédilol en absence de CDs permet l'obtention, en présence de CDs, d'une bonne solubilité sans causer de contraintes d'acceptabilité comme discuté pour le tampon acétate, ce qui semble être un bon compromis.

Afin de déterminer si la concentration ciblée en carvédilol (12.3 mM, 5 mg/mL) est atteignable grâce à une solubilisation par les CDs, des diagrammes de phase sont à entreprendre dans HCl en présence de  $\gamma\text{CD}$ , d'HP $\gamma\text{CD}$  ou de RAMEB, pour lesquelles la valeur de R est la plus haute. Afin d'obtenir des données comparables dans un milieu tamponné acceptable, ces diagrammes de phase seront également réalisés dans le tampon citrate ( $\text{pH} = \text{pKa} = 4.7$ ) avec les mêmes CDs.

#### II.1.2.4.2. Diagrammes de solubilité de phase

Les diagrammes de phase sont des expériences à partir desquelles de nombreuses informations peuvent être obtenues. L'expérience consiste à ajouter en large excès la substance investiguée dans des solutions aqueuses de CDs à différentes concentrations afin de déterminer quel est l'effet des CDs sur sa solubilité. Ces diagrammes ont été réalisés dans 3 mL le tampon citrate 0.1M avec la  $\gamma\text{CD}$ , l'HP $\gamma\text{CD}$  et la RAMEB dont la concentration varie de 0 à 100 mM (Figure 38), la quantité de carvédilol solide ajoutée correspondant à 10 mg/mL. Les résultats obtenus sont en bon accord avec les expériences réalisées précédemment à une concentration en CD fixe, le classement suivant pouvant être établi en terme d'efficacité de solubilisation : RAMEB > HP $\gamma\text{CD}$  >  $\gamma\text{CD}$ . Il est notable que les diagrammes de phase obtenus sont de type  $A_L$ , quelle que soit la CD utilisée, ce qui contraste avec la littérature rapportant principalement des diagrammes de type  $A_N$  [69,146,148]. Cette différence peut s'expliquer par la nature du milieu utilisé, les diagrammes de type  $A_N$  ayant été obtenus dans l'eau pure. Dans notre cas, le caractère ionisé du carvédilol dû au pH acide du tampon citrate peut être à l'origine de l'augmentation de la solubilité des complexes formés, menant à l'obtention de diagrammes de type  $A_L$ .

L'utilisation du facteur CE (efficacité de complexation), basé sur la pente des droites obtenues, permet une observation de l'efficacité des différentes CDs sur la solubilisation de la substance et sa comparaison avec d'autres substances, permettant une interprétation objective des résultats. Les CE

obtenus ici ont une valeur de 0.04, 0.05 et 0.14 pour le  $\gamma$ CD, l'HP $\gamma$ CD et la RAMEB respectivement. En comparaison avec les données issues de la littérature, ces valeurs sont considérées comme faibles, Loftsson *et coll.* ayant reporté pour le carvedilol des valeurs comprises entre 0.02 et 1.62, obtenues respectivement avec l' $\alpha$ CD en milieu non-tamponné et avec l'HP $\beta$ CD en présence de 1% (v/v) d'acide acétique [157]. Ces diagrammes de phase permettent de mettre en évidence que la concentration cible fixée en carvedilol ne sera pas atteignable, dans ce tampon citrate, grâce à l'effet solubilisant de la  $\gamma$ CD et de l'HP $\gamma$ CD. La RAMEB est plus efficace, mais une forte concentration est nécessaire à solubiliser 12.3 mM de carvedilol (environ 100 mM, soit un rapport molaire CD/SA de 8).

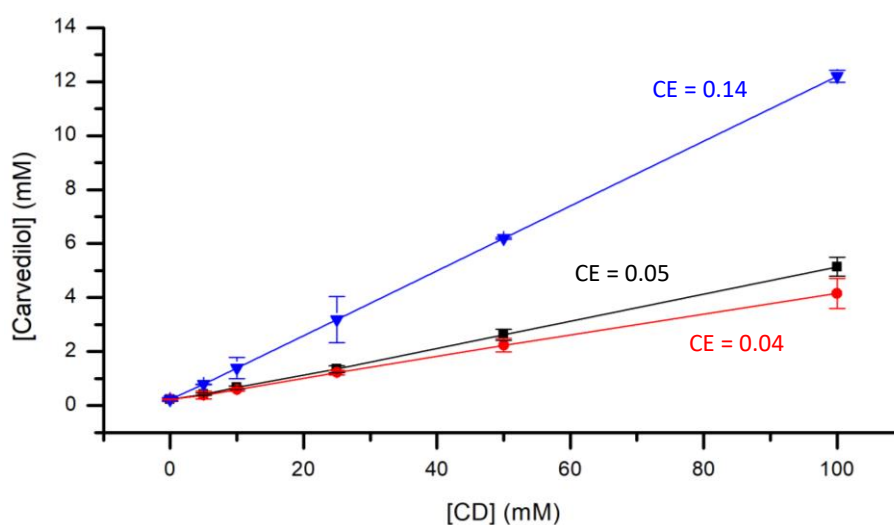


Figure 38 : Diagramme de phase du carvedilol en tampon citrate 0.1 M (pH = 4.7) en présence de  $\gamma$ CD (rouge), d'HP $\gamma$ CD (noir) ou de RAMEB (bleu) obtenues par dosage UV du carvedilol après 72h d'agitation à température ambiante suivie d'une filtration. Les CE calculées sont indiquées de la même couleur que les courbes tracées.

Le milieu déterminé le plus efficace et acceptable est HCl, c'est pourquoi des diagrammes de phase ont ensuite été réalisés dans ce milieu avec les mêmes CDs afin d'estimer si la concentration cible est atteignable dans ces conditions. Ce milieu ayant montré une dépendance entre la solubilité du carvedilol et la quantité de solide ajoutée, la décision d'ajouter la quantité cible a été prise, soit 5 mg/mL (contre 10 mg/mL en tampon citrate). La quantité d'HCl ajoutée a été ajustée en conséquence à 13 mM, respectant le rapport molaire défini précédemment. Sachant que HCl est un milieu non tamponné et que la concentration en CDs varie lors de la réalisation des diagrammes de phase, il est difficile de conserver un pH constant dans tous les échantillons. Avant toute analyse des résultats, il est important de préciser que la cinétique de solubilisation du carvedilol dans ce milieu est qualitativement particulière. En effet, lors de l'ajout d'HCl à la suspension aqueuse de carvedilol en présence ou en absence de CDs, sa solubilisation totale est observée dans un premier temps, suivie de sa précipitation. En absence de CDs, la précipitation est observée après quelques minutes d'agitation alors que quelques heures sont nécessaires en présence de CDs.

Dans un premier temps, les échantillons ont été agités durant seulement 24 heures (contre 72h dans les études préliminaires, Figure 37), conduisant aux courbes de solubilité représentées sur la Figure 39.

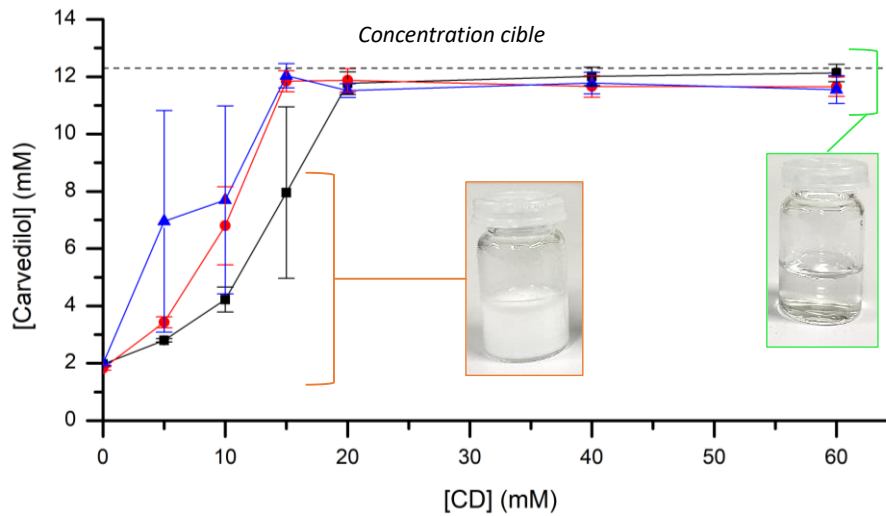


Figure 39 : Diagrammes de solubilité du carvedilol en milieu HCl 13 mM (pH ~ 3.5) en présence de  $\gamma$ CD (noir), d'HP $\gamma$ CD (rouge) ou de RAMEB (bleu) à différentes concentrations (0 – 60 mM) obtenus après 24h d'agitation à température ambiante. (Ecart type représentatif de la précipitation du carvedilol dans certains échantillons)

Les interprétations de l'allure des courbes et des écart-types seront d'abord décrites séparément pour davantage de clarté :

- L'allure des courbes et l'atteinte d'un plateau signifient que la totalité de la quantité de carvedilol ajoutée a été solubilisée, soit la concentration cible représentée en pointillé sur la Figure 39. Les solutions (triplicata) à cette concentration sont limpides comme montré par la photographie insérée. En raison de l'absence de carvedilol solide dans ces échantillons, cette expérience ne correspond pas à un réel diagramme de phase, les courbes obtenues sont donc considérées comme étant des diagrammes de solubilité. A partir d'une concentration en CDs de 20 mM ( $\gamma$ CD, HP $\gamma$ CD ou RAMEB), le carvedilol est donc soluble à hauteur de la cible fixée 24 heures après la préparation des échantillons. Il est également remarquable que seules l'HP $\gamma$ CD et la RAMEB offrent également cette solubilisation lorsqu'elles sont concentrées à 15 mM. Cette expérience met donc en évidence que l'effet solubilisant de la  $\gamma$ CD est inférieur à celui de l'HP $\gamma$ CD et de la RAMEB.
- Il est notable que l'écart-type des mesures de solubilité, en présence de 5 mM et 10 mM ( $\gamma$ CD, HP $\gamma$ CD, RAMEB) ainsi qu'à 15 mM ( $\gamma$ CD) de CDs est particulièrement élevé, de l'ordre de 5 mM. Ces valeurs s'expliquent par le fait qu'au sein du triplicata effectué, certains échantillons ont précipité tandis que d'autres sont restés limpides. Le triplicata ayant été réalisé simultanément, l'hypothèse d'une erreur de manipulation ou de modification de conditions (température, agitation, CDs) peut être exclue. Il est également remarquable que les écart-types obtenus en

absence ou en présence d'au moins 20 mM de CDs sont quant à eux acceptables, attribuables aux variations de préparations et analytiques. D'après ces observations, il est possible de conclure que ces écart-types sont un indicateur d'instabilité, sur 24 heures, des solutions de carvédilol ( $\approx 12$  mM) en présence de CDs concentrées de 5 mM à 15 mM. A l'inverse, les solutions de carvédilol solubilisé à hauteur de la concentration cible sont stables après 24 heures en présence de CDs concentrées à 20 mM ou plus.

Cette expérience permet donc de mettre en évidence un retard de précipitation par la présence de CDs. Il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle les CDs forment une association avec le carvédilol, constituant un équilibre en compétition avec celui de la précipitation. Le déplacement des équilibres par cette compétition est donc fonction de la concentration en CDs, permettant d'expliquer l'absence de précipité à partir de 20 mM de CDs. Ces observations ont motivé la mise en place de deux expériences complémentaires afin de vérifier 1) l'effet du temps sur la précipitation du carvédilol en présence de  $\gamma$ CD pour obtenir des triplicatas homogènes et 2) l'effet de l'augmentation de la quantité de carvédilol ajoutée en présence de RAMEB pour tenter d'obtenir un diagramme de phase aux concentrations de 5 à 60 mM de CD.

D'une part, le diagramme de solubilité en présence de  $\gamma$ CD a été répété en augmentant le temps de mélange à 1 semaine afin d'évaluer la concentration en CDs nécessaire pour ne plus observer ce phénomène de précipitation. La Figure 40 reprend les résultats obtenus après 24h d'agitation superposés à ceux mesurés après une semaine. Il est notable que les écart-types représentés sur la courbe obtenue après une semaine sont acceptables en comparaison de ceux à 24h, les triplicatas étant homogènes. En l'état, les 5 premiers points constituent un diagramme de phase dont l'alignement permet l'extrapolation affine et le calcul du CE pour ce système. Avec l'obtention d'une valeur de 0.16, l'efficacité de complexation de la  $\gamma$ CD est significativement supérieure dans ce milieu en présence d'HCl que dans le tampon citrate investigué. Cette partie du diagramme permet également d'extrapoler la quantité de carvédilol qui serait théoriquement solubilisée avec 60 mM de  $\gamma$ CD, menant à une valeur de 10.3 mM. Cependant, il est observable sur la Figure 40 que les solutions concentrées à 40 et 60 mM sont restées limpides, avec la solubilisation de la quantité totale ajoutée en carvédilol après 24h ou une semaine. Il est alors possible de supposer que la cinétique de précipitation du carvédilol, dans ces conditions, est supérieure à une semaine.

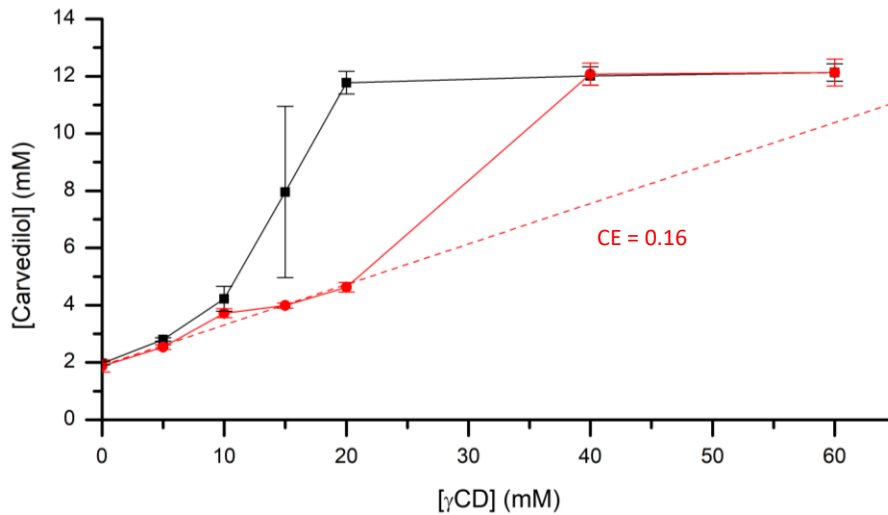


Figure 40 : Diagrammes de solubilité du carvedilol en milieu HCl 13 mM (pH ~ 3.5) en présence de  $\gamma$ CD obtenus après 24h (noir) ou 1 semaine (rouge) d'agitation à température ambiante. La droite en pointillé correspondant à l'extrapolation affine sur les 5 premiers points de la courbe rouge, de 0 à 20 mM de  $\gamma$ CD.

D'autre part, la RAMEB ayant présenté les meilleurs effets solubilisant, l'essai d'obtention d'un diagramme de phase couvrant une concentration en CD allant de 5 à 60 mM en présence de carvedilol solide a été réalisé. Pour ce faire, le double de la concentration cible a été ajouté (10 mg/mL au lieu de 5 mg/mL) et une molarité double en HCl a été ajoutée (26 mM au lieu de 13 mM). La Figure 41 montre que malgré seulement 24h de mélange, les solutions en triplicata ont un comportement similaire, mis en évidence par le faible écart-type des points correspondant aux échantillons dans lesquels un précipité est observé (0, 5, 10, 15 et 20 mM de RAMEB).

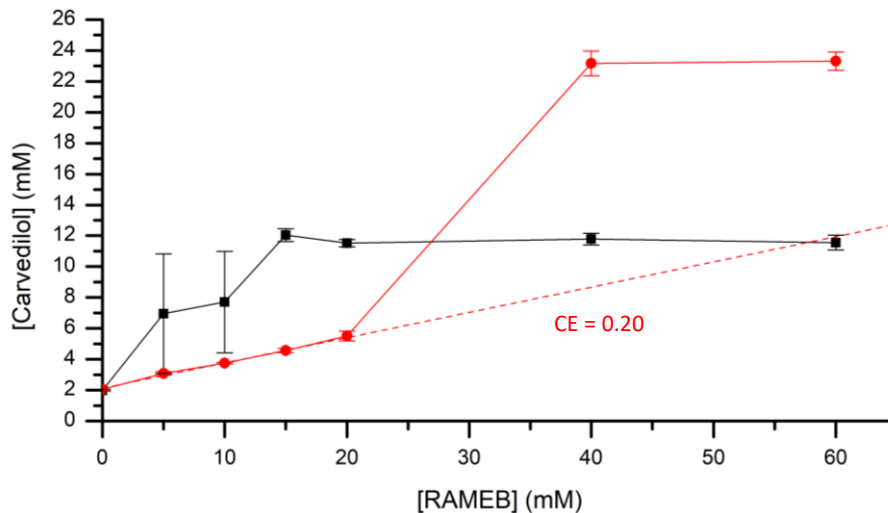


Figure 41 : Diagrammes de solubilité du carvedilol en milieu HCl 13 mM (pH ~ 3.5) en présence de RAMEB obtenus après 24h, lors de l'ajout initial de 5 mg/mL (noir) ou de 10 mg/mL (rouge) d'agitation à température ambiante. La droite en pointillé correspondant à l'extrapolation affine sur les 5 premiers points de la courbe rouge, de 0 à 20 mM de RAMEB.

Ces résultats indiquent que l'équilibre est atteint plus rapidement lorsqu'une quantité de solide est ajoutée en large excès, confortant la discussion précédente sur la compétition des équilibres de solubilisation et de précipitation dépendante de la quantité de solide ajoutée. Néanmoins,

l'observation de la solubilisation totale du carvédilol est une nouvelle fois observée en présence de 40 mM et 60 mM de CD, mise en évidence par l'obtention d'un plateau. En analogie avec la démarche effectuée avec la  $\gamma$ CD, le calcul du CE à partir des 5 premiers points contenant un précipité de carvédilol mène à une valeur de 0.20, supérieure à celle calculée en tampon citrate pour la même CDs. L'extrapolation du diagramme de phase indique une solubilité du carvédilol à 12.15 mM en présence de 60 mM de RAMEB, proche de la concentration cible de 12.3 mM. En opposition aux résultats obtenus avec la  $\gamma$ CD, cela indique que la solubilité du carvédilol mesurée après 24 heures en présence de RAMEB à 60 mM, lors de l'ajout de la cible exactement (Figure 41, courbe noir), correspondrait à sa solubilité à l'équilibre.

Les résultats obtenus par les expériences de diagrammes de solubilité dans HCl en présence de  $\gamma$ CD et de RAMEB montrent que les objectifs de solubilité fixés sont atteints, avec un rapport [CD] / [SA] égale à 5 et un milieu acceptable [31,164,165]. Ces expériences permettent également de montrer que la RAMEB a un effet solubilisant plus fort et/ou plus stable que la  $\gamma$ CD. Cependant, les observations concernant la précipitation du carvédilol avec le temps nécessiteront par la suite la mise en place d'une étude de stabilité sur plusieurs mois afin d'évaluer si 1) la  $\gamma$ CD et la RAMEB concentrées à 61.5 mM permettent la solubilisation du carvédilol à une concentration de 12.3 mM sur une longue période et 2) l'éventuel effet stabilisant de ces CDs sur le carvédilol en conditions oxydantes par photo-exposition. Jusqu'à présent, la solubilité du carvédilol est le seul indicateur observé, n'apportant aucune information sur la nature de l'association entre les CDs étudiées et cette substance active. Afin de mieux appréhender l'effet solubilisant observé, une étude structurale et thermodynamique de mélanges CDs – Carvédilol sera réalisée, notamment dans le tampon acétate qui offre une bonne flexibilité de concentration en carvédilol en présence ou absence de CDs.

### II.1.3. Etude des interactions CDs-Carvédilol

*Afin d'étudier les interactions impliquant le carvédilol et les CDs, la RMN sera principalement utilisée pour sa capacité à observer simultanément les CDs et le carvédilol. De plus, l'observation des interactions à l'échelle des protons représente une précision intéressante et atteignable uniquement par cette technique d'analyse. Enfin, en terme de preuve d'inclusion, la RMN et les différentes expériences réalisables représentent l'outil analytique de choix pour obtenir une preuve d'inclusion et élucider la géométrie des objets formés.*

#### II.1.3.1. Auto-association du carvédilol

Afin de pouvoir déterminer, par RMN, si des groupements du carvédilol forment des interactions non-covalentes avec les CDs étudiées, il est nécessaire d'effectuer l'attribution des signaux observés en RMN  $^1\text{H}$ . Dans un premier temps, les déplacements chimiques des H ont été attribués dans une solution de carvédilol solubilisé dans le DMSO- $d_6$ , afin de pouvoir observer les protons labiles portés par l'alcool et les deux amines secondaires. Dans un second temps cette attribution a été réalisée en milieu aqueux, dans le tampon acétate discuté précédemment, qui apporte une solubilité confortable en carvédilol en absence de CDs. Pour ce faire, les expériences  $^1\text{H}$  (Figure 42), COSY (Figure 43), HSQC et HMBC en milieu aqueux tamponné acétate ont apporté un ensemble d'informations cohérentes, permettant les attributions annotées sur la Figure 42 et la Figure 43. Néanmoins, la différenciation des protons H3 et H6 ainsi que H11 et H12 n'a pu être obtenue simplement par l'expérience HMBC en raison des systèmes aromatiques dans lesquels ils sont impliqués, responsables de l'observation de nombreux couplages  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  d'intensités similaires correspondant pourtant à des distances variables. Afin d'attribuer ces signaux dont la différenciation est importante pour l'étude de la géométrie des complexes d'inclusion potentiellement formés, l'expérience NOESY dans le DMSO- $d_6$  a été mise en place pour observer les H spatialement voisins de celui porté par l'azote du groupement carbazole (Figure 44). Ce groupement présente l'intérêt d'être rigide et plan, en raison de la présence de trois cycles dont deux aromatiques, ce qui permet une interprétation fiable des corrélations dipolaires observées dans le DMSO- $d_6$ . Enfin, les attributions effectuées sont en accord avec celles reportées dans la littérature dans le méthanol  $\text{CD}_3\text{OD}$  [137].

Dans la mesure où le carvédilol est une molécule très peu soluble dans l'eau et qu'elle possède plusieurs groupements aromatiques (carbazole, méthoxyphényle), l'hypothèse selon laquelle des interactions intermoléculaires telles que le  $\pi$ -stacking peuvent être à l'origine de cette insolubilité peut être émise. Afin de déterminer si un phénomène d'auto-association est effectivement présent dans l'eau, des solutions de carvédilol à différentes concentrations, de 5 mM à 0.5 mM, ont été analysées par RMN  $^1\text{H}$  dans le tampon acétate. Pour ce faire, une solution mère concentrée à 5 mM a été



préparée par agitation à 40°C du carvédilol dans le D<sub>2</sub>O tamponné acétate, permettant l'obtention d'une solution limpide après une nuit. Les solutions moins concentrées en carvédilol ont été préparées par dilutions successives de cette solution mère dans le même D<sub>2</sub>O tamponné acétate.

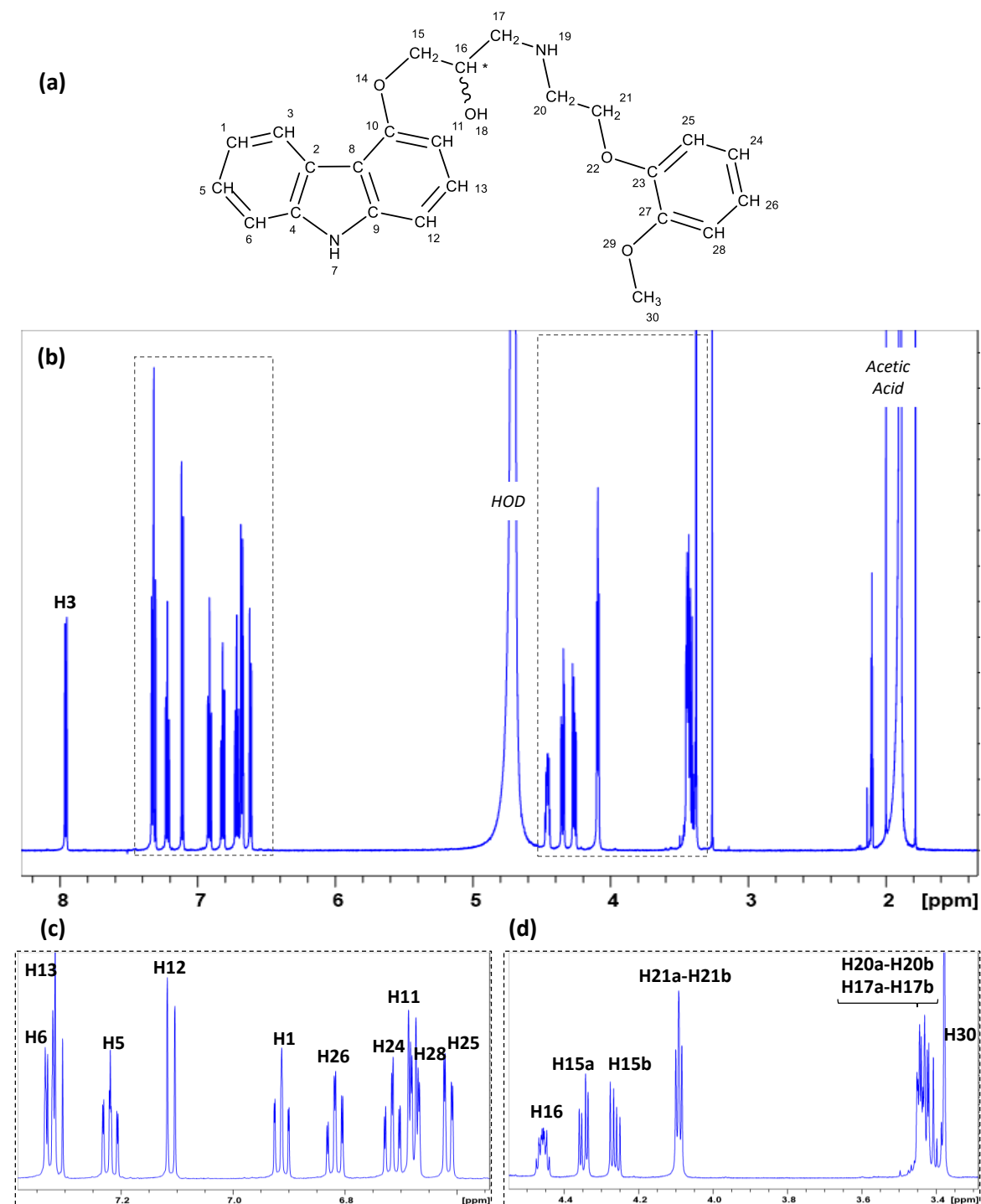


Figure 42 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, 298 K) d'une solution de carvedilol (5 mM) dans le D<sub>2</sub>O tamponné acétate 0.1 M (pH = 4.7). (a) Structure numéroté du carvedilol. (b) Spectre <sup>1</sup>H complet. (c) Agrandissement de la région aromatique. (d) Agrandissement de la région aliphatique. Relevé des déplacements chimique et des constante de couplages lisibles : 6.90 (H1, <sup>3</sup>J<sub>1,3</sub> = 7.85 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1,5</sub> = 7.22 Hz, <sup>4</sup>J<sub>1,6</sub> = 0.94 Hz), 7.95 (H3, <sup>4</sup>J<sup>3,5</sup> = 1.17 Hz), 7.21 (H5), 7.32 (H6, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 8.19 Hz), 6.67 (H11, <sup>3</sup>J<sub>11,13</sub> = 7.97 Hz, <sup>4</sup>J<sub>11,12</sub> = 0.40 Hz), 7.11 (H12, <sup>3</sup>J<sub>12,13</sub> = 8.10 Hz), 7.31 (H13), 4.45 (H16, <sup>3</sup>J<sub>16,15a</sub> = 4.02 Hz, <sup>3</sup>J<sub>16,15b</sub> = 5.49 Hz), 6.71 (H24, <sup>3</sup>J<sub>24,25</sub> = 7.95 Hz, <sup>3</sup>J<sub>24,26</sub> = 7.86 Hz), 6.60 (H25), 6.81 (H26, <sup>3</sup>J<sub>26,28</sub> = 7.96 Hz), 6.67 (H28), 3.37 (H30), 4.34 (H15a, <sup>2</sup>J<sub>15a,15b</sub> = 10.30 Hz), 4.26 (H15b), 4.42 (H17), 3.42 (H20, <sup>3</sup>J<sub>20,21</sub> = 5.60 Hz), 4.08 (H21).

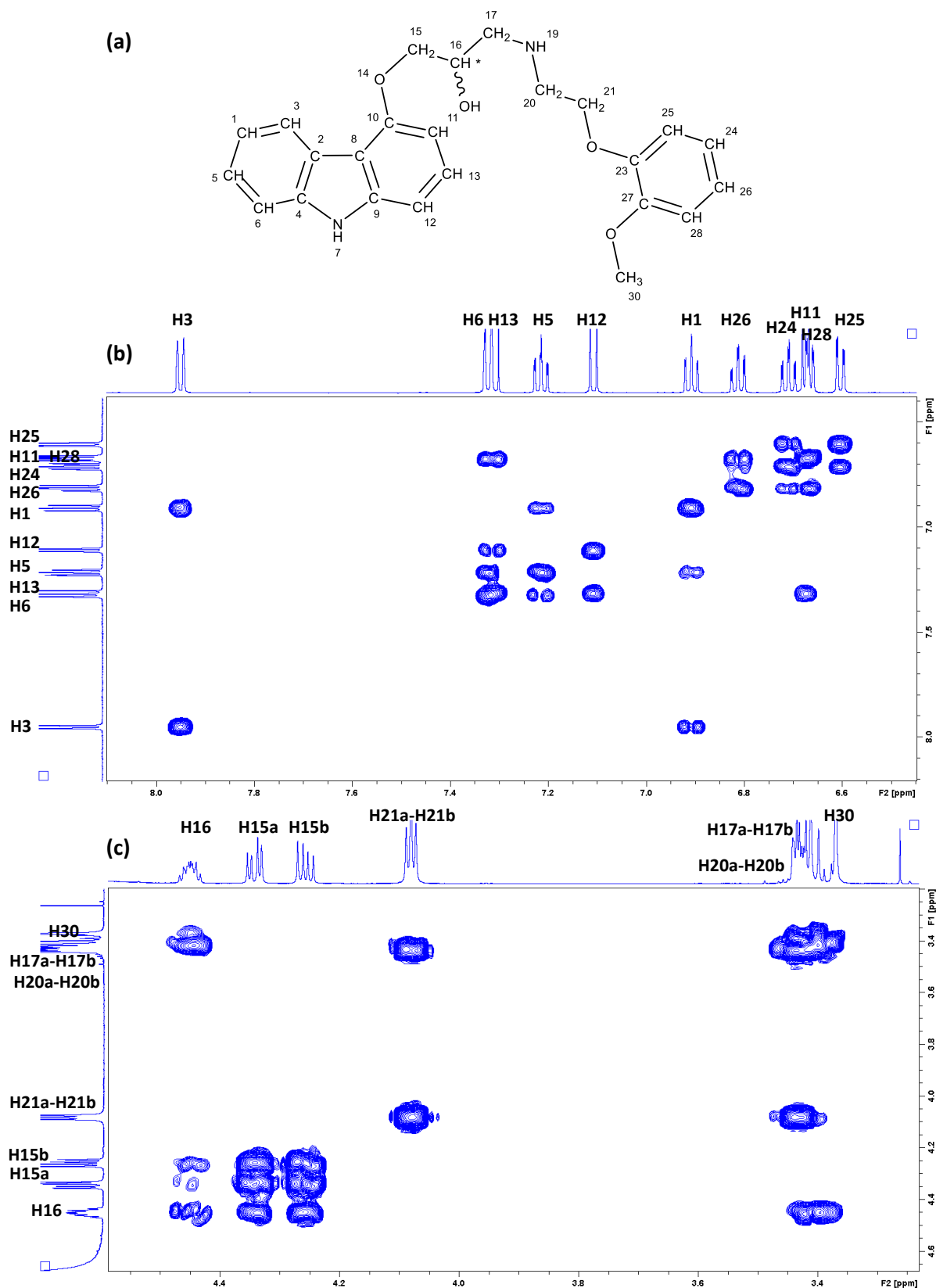


Figure 43 : Expérience RMN COSY (600 MHz, 298 K) d'une solution de carvedilol dans le  $D_2O$  tamponné acétate 0.1 M. (a) Structure numérotée du carvedilol. (b) Agrandissement de la région aromatique. (c) Agrandissement de la région aliphatique.

Il est remarquable que l'obtention d'une solution limpide est contradictoire avec les résultats de solubilité exposés précédemment (Figure 37), mais qui n'est pas surprenante au vu du phénomène de

diminution de solubilité observée dans le milieu mis à pH par HCl en fonction de la quantité de solide ajoutée (Figure 36, (b)). En effet, pour cette expérience, il a été ajouté une quantité permettant l'obtention d'une solution concentrée à 5 mM, soit 2 mg/mL, correspondant à environ 5 fois moins que lors de l'expérience discutée précédemment. De plus, l'ajout d'un chauffage léger a permis d'accélérer la cinétique de solubilisation.

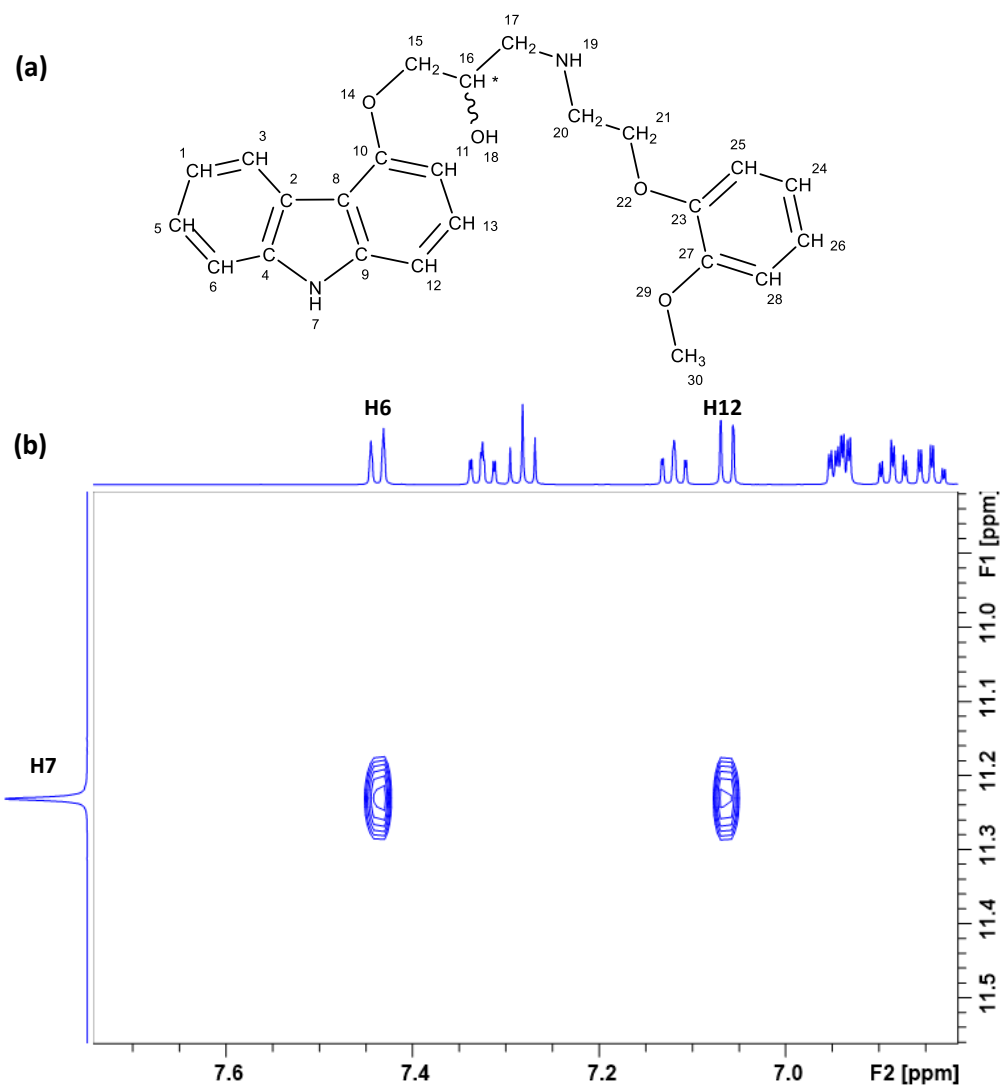


Figure 44 : Expérience RMN NOESY 2D (600 MHz, 298 K,  $t_m = 0.9$  ms) d'une solution de carvedilol (5 mM) dans le DMSO- $d_6$ . (a) Structure numérotée du carvedilol. (b) Agrandissement de la corrélation dipolaire observée entre le H7 porté par l'azote et les H spatialement voisins.

La Figure 45 montre une variation de déplacements chimiques de tous les  $^1\text{H}$  du carvedilol en fonction de sa concentration. La variation des déplacements chimiques des H de la partie aliphatique (droite) du carvedilol peut être attribuée soit à une modification de l'environnement chimique, soit un changement conformationnel en raison de sa flexibilité intrinsèque. En revanche, l'observation d'une variation des déplacements chimiques des  $^1\text{H}$  aromatiques met en évidence une modification de l'environnement chimique de ces protons dans la mesure où ces groupements sont rigides et ne peuvent subir de modifications conformationnelles, comme supposé sur la partie aliphatique. Cette

expérience montre que la concentration du carvédilol en milieu aqueux influence de manière significative son environnement, permettant d'émettre l'hypothèse d'une agrégation. Cette observation a également été réalisée lors de la mise en place de la même expérience dans le D<sub>2</sub>O + HCl (Figure 46). Il est également notable que les spectres RMN <sup>1</sup>H du carvédilol sont très similaires dans les deux milieux (Figure 45, Figure 46), cette équivalence permettra par la suite une liberté de choix de milieux pour les différentes études.

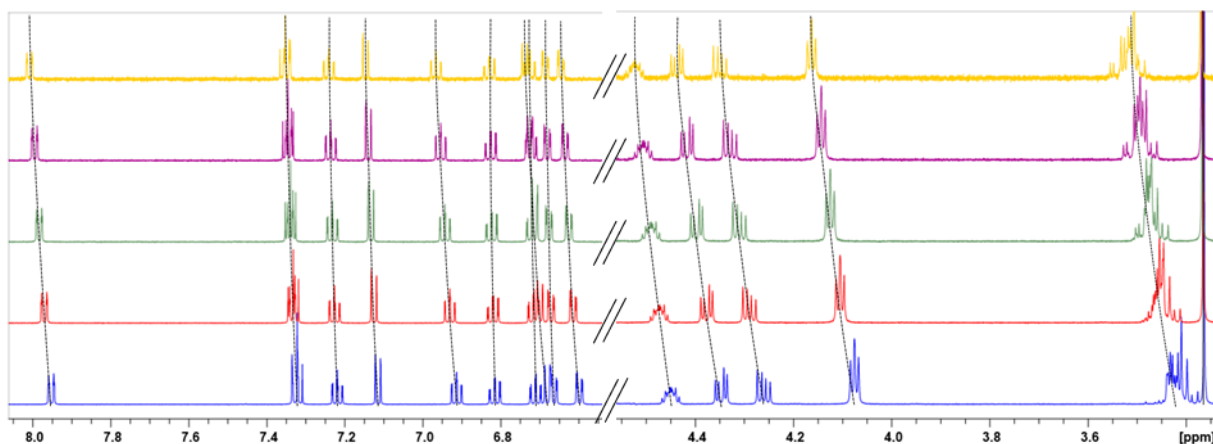


Figure 45 : Spectres RMN <sup>1</sup>H partiels (600 MHz, 298 K, D<sub>2</sub>O tamponné acétate 0.1 M) du carvédilol à 0.5 mM (jaune), 1.5 mM (violet), 2.5 mM (vert), 3.5 mM (rouge) et 5 mM (bleu).

Il est observé dans le milieu en présence d'HCl une moindre variation de l'ensemble des protons du carvédilol en comparaison du tampon acétate, appuyant l'idée selon laquelle ce tampon, et plus généralement l'acide acétique, induit la formation d'un agencement supramoléculaire particulier du carvédilol qui augmente sa solubilité en milieu aqueux.

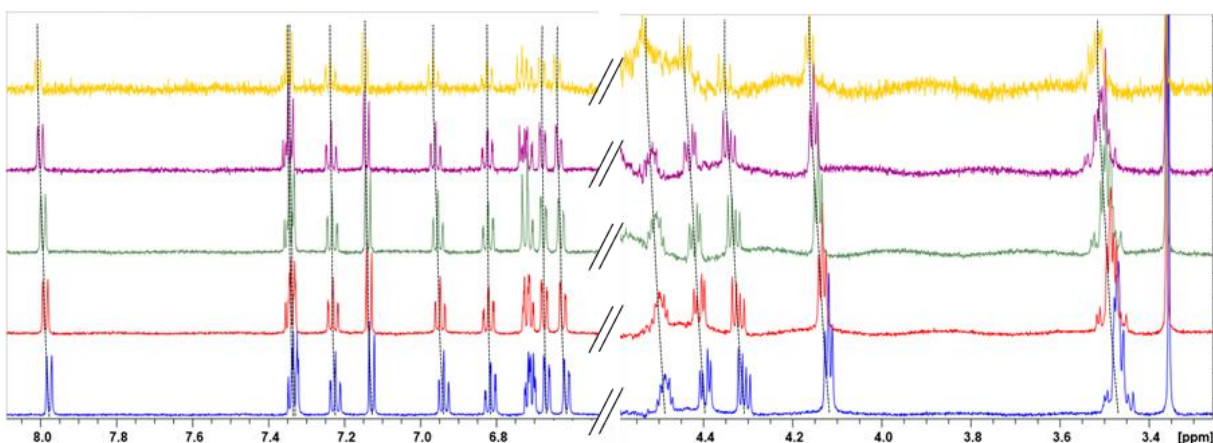


Figure 46 : Superposition des spectres RMN <sup>1</sup>H partiels (600 MHz, 298 K, D<sub>2</sub>O + HCl 13 mM) du carvédilol à 0.27 mM (jaune), 0.88 mM (violet), 1.49 mM (vert), 2.10 mM (rouge) et 2.71 mM (bleu).

Pour déterminer si cette agrégation mène à la formation d'objets de tailles différentes, l'expérience DOSY a été réalisée par RMN sur les échantillons de carvédilol concentré à 5 mM et 0.5 mM dans le tampon acétate (Figure 47). A 5 mM, un coefficient de diffusion de  $4.7 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s est mesuré, contre  $5 \cdot 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s dans une solution dix fois moins concentrée, à 0.5 mM. Malgré l'observation d'une

différence entre ces deux solutions, cet écart est relativement faible lorsqu'il est mis en comparaison de la différence de concentration et de la résolution des spectres obtenus. Ces résultats indiqueraient que malgré la formation d'un ou plusieurs objets non-covalents avec l'augmentation de la concentration, la taille de ces objets est voisine de celle du carvédilol seul. Les expériences  $^1\text{H}$  et DOSY mènent donc à la conclusion que l'augmentation de la concentration en carvédilol implique des agencements supramoléculaires, davantage solubles en tampon acétate, mais de taille proche de celle du carvédilol comme peuvent l'être des dimères.

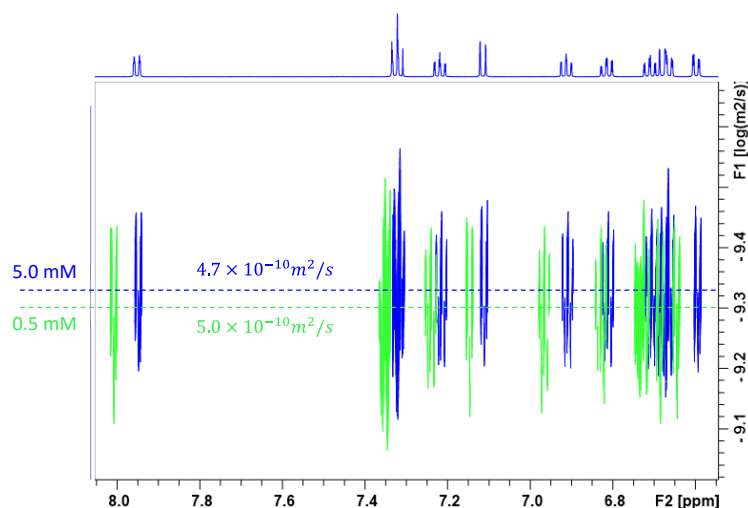


Figure 47 : Expérience RMN DOSY (600 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M,  $D_{20} = 100 \text{ ms}$ ,  $P_{30} = 1.9 \text{ ms}$ ) du carvédilol à 0.5 mM (vert) et à 5 mM (bleu).

Afin d'évaluer si ce phénomène d'agrégation peut être thermodynamiquement quantifié, deux analyses par ITC ont été réalisées. Ces expériences consistent à injecter une solution de carvédilol, solubilisé dans le tampon acétate (0.1 M) à hauteur de 0.5 mM ou de 5 mM, dans le même tampon afin de déterminer si les variations de chaleur sont dépendantes de la concentration. En effet, si aucun phénomène d'agrégation n'est présent, les variations de chaleur observées lors de l'injection de la solution à 0.5 mM ou de 5 mM seront voisines et attribuables à des chaleurs de dilution. A l'inverse, si un phénomène d'agrégation est présent et fonction de la concentration, les variations de chaleur devraient être différentes en raison de la dissociation des agrégats présents à 5 mM et théoriquement absents, ou en quantité moindre, à 0.5 mM.

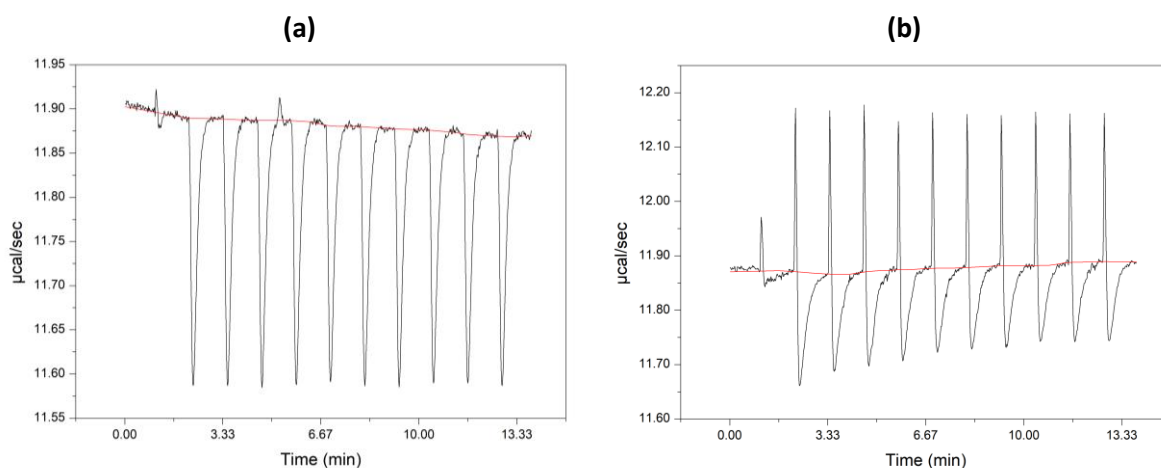


Figure 48 : Thermogrammes obtenus par ITC de la dilution d'une solution de carvédilol (tampon acétate 0.1 M (pH = 4.7), 298 K) à 0.5 mM (a) et à 5 mM (b) dans le même tampon acétate.

La Figure 48 présente les thermogrammes obtenus lors de l'injection de ces solutions, mettant en évidence une différence significative des variations de chaleur. A 0.5 mM (Figure 48, (a)), un phénomène exothermique est observé, attribuable à la chaleur de dilution du carvédilol dans le tampon lors des injections successives. A l'inverse, des changements d'allure du thermogramme sont observés lors de l'utilisation d'une solution concentrée à 5 mM (Figure 48, (b)), notamment un retour à la ligne de base plus long après chaque injection et l'apparition d'un pic endothermique. L'observation qualitative d'une différence significative entre les thermogrammes obtenus après l'injection de solutions à ces deux concentrations met en évidence la présence d'un phénomène lié à la concentration du carvédilol. Néanmoins, outre cette observation qualitative, aucune information supplémentaire ne peut être obtenue suite à cette expérience car les phénomènes responsables des pics endothermiques et exothermiques ont une cinétique voisine, induisant une compensation des valeurs d'intégration et donc à des valeurs similaires pour les deux expériences.

La présence d'un phénomène lié à la concentration en carvédilol, thermiquement observable par ITC et supposé être de l'auto-association sur la base des variations de déplacements chimiques observées en RMN, sera à prendre en considération par la suite. Malgré une taille proche du carvédilol, la formation d'agrégats est un équilibre supplémentaire en solution qui peut, lors de l'analyse de mélange carvédilol-CDs par RMN, induire des variations de déplacements chimiques comme observé Figure 45 et Figure 46. En revanche, l'obtention par ITC d'aire équivalente à 5 mM et à 0.5 mM grâce à la compensation endothermique et exothermique permettra de s'affranchir quantitativement de ce phénomène lors de l'étude thermodynamique de l'association carvédilol-CDs en tampon acétate.

## II.1.3.2. Analyse du complexe carvédilol/CD

### II.1.3.2.1. Caractérisation des complexes par RMN

Dans un premier temps, l'analyse par RMN  $^1\text{H}$  de solutions de carvédilol (5 mM) dans le  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M (pH = pKa = 4.7) a été réalisée en présence d'une quantité équimolaire des CDs discutées précédemment. La Figure 49 présente les spectres RMN  $^1\text{H}$  partiels correspondant à l'observation des déplacements chimiques des protons aromatiques (Figure 49, (a)) et aliphatique (Figure 49, (b)). Plusieurs observations informatives sur les interactions entre le carvédilol et les CDs étudiées sont notables sur ces spectres RMN  $^1\text{H}$ .

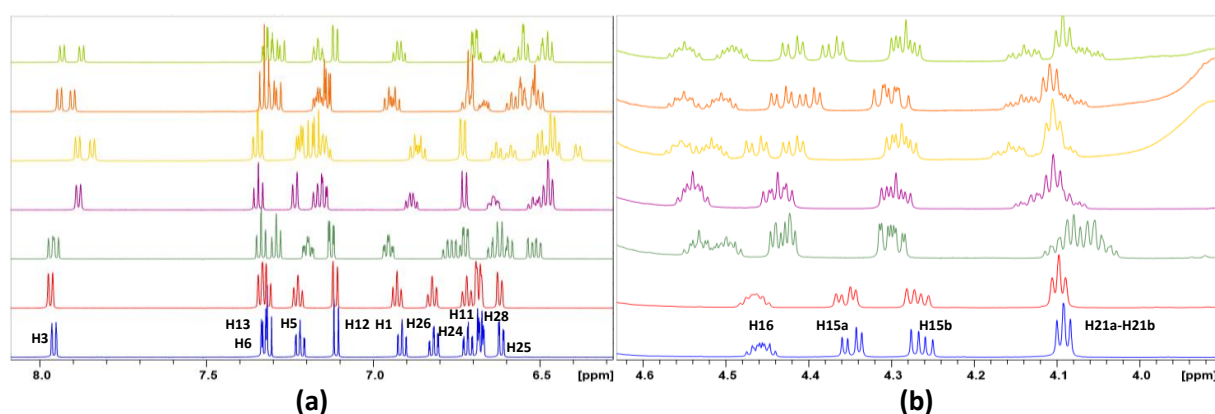


Figure 49 : Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  partiels (600 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M) correspondant aux régions aromatiques (a) et aliphatique (b) du carvédilol (5mM) en absence de CDs (bleu) ou en présence d'une quantité équimolaire d' $\alpha\text{CD}$  (rouge), de  $\beta\text{CD}$  (vert foncé), de  $\gamma\text{CD}$  (violet), d' $\text{HP}\beta\text{CD}$  (jaune), d' $\text{HP}\gamma\text{CD}$  (orange) ou de RAMEB (vert clair).

D'une part, la présence d' $\alpha\text{CD}$  ne génère pas de variations de déplacements chimiques significatives, démontrant une absence d'interaction du carvédilol avec cette CD, ce qui est en accord avec les mesures de solubilité réalisées précédemment. D'autre part, une variation de déplacements chimiques de tous les  $^1\text{H}$  du carvédilol est observée en présence des autres CDs, accompagnée d'un dédoublement des signaux sauf en présence de  $\gamma\text{CD}$ . Le carvédilol étant sous forme racémique et les CDs connues pour leur capacité à différencier les énantiomères grâce à leurs cavités et aux nombreux carbones asymétriques qu'elles contiennent, cette observation est un premier indicateur de la présence d'interactions. Le  $\gamma\text{CD}$  possède la cavité la plus large, ce qui peut expliquer une différenciation énantiomérique moins prononcée en comparaison de la  $\beta\text{CD}$ , en raison des plus faibles contraintes stériques que cette cavité peut générer. Il est notable que cette différenciation énantiomérique est particulièrement observée en présence de l' $\text{HP}\beta\text{CD}$ , de l' $\text{HP}\gamma\text{CD}$  et de la RAMEB, ce qui mène à deux interprétations possibles qui peuvent se compléter : Soit l'ajout de groupement hydroxypropyl ou méthyl augmente le nombre d'interactions intermoléculaires, soit l'utilisation d'un mélange de différents degrés de substitution et d'isomères augmente la probabilité de présence d'une structure offrant une forte association avec le carvédilol.

Cette observation par RMN est une nouvelle fois en accord avec les expériences de solubilité décrites précédemment pour lesquelles les dérivés HP et la RAMEB ont globalement montré des effets solubilisants plus efficaces que leurs homologues naturels. Enfin, cette différenciation indique que les carvédilol (R) et (S) ont une affinité différente pour les CDs et probablement leur cavité, le proton H21 (a et b) du carvédilol étant un bon exemple de cette différence. En effet, sa multiplicité initiale est un triplet (H21a et H21b apparemment équivalent) en raison de son couplage à H20a et H20b (équivalents) alors qu'en présence de  $\beta$ CD, un changement significatif de la multiplicité (système du 2<sup>nd</sup> ordre) est observé et accompagné d'un dédoublement du multiplet. En présence de  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, HPyCD et de RAMEB, le triplet est conservé mais superposé à un multiplet, montrant d'une part la conservation de l'équivalence des H21 et d'autre part la création d'une inéquivalence de ces mêmes H21, ce qui peut s'interpréter comme des contraintes différentes en fonction de l'énantiomère, provoquées par la présence de CDs.

L'expérience DOSY a été réalisée sur les solutions de carvédilol en absence de CDs ou en présence d'une quantité équimolaire de  $\beta$ CD ou de  $\gamma$ CD afin d'évaluer si une association est présente. Le résultat de ces expériences est présenté Figure 50 (a), sur laquelle est observée une diminution de la mobilité du carvédilol en présence des deux CDs étudiées. En effet, par l'observation des protons aromatiques du carvédilol qui sont isolés de ceux des CDs, le coefficient de diffusion du carvédilol a été mesuré à  $4.7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $3.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  et  $3.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  en absence de CDs ou en présence de  $\beta$ CD et de  $\gamma$ CD, respectivement (Figure 50 (b)). Cette diminution de la mobilité observée par DOSY est une preuve d'association entre le carvédilol et ces CDs et l'ordre de grandeur de cette diminution correspond à ce qui est attendu lors de l'analyse de complexes de cyclodextrines [79]. Il est à noter que la mobilité du carvédilol en présence de  $\gamma$ CD est légèrement plus faible que celle mesurée avec la  $\beta$ CD. L'observation des signaux des CDs, sur ces mêmes expériences, mène à la même tendance avec une mobilité légèrement inférieure de la  $\gamma$ CD à une valeur de  $2.7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  contre  $2.9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  pour la  $\beta$ CD (Figure 50 (c)). Outre la différence de taille et donc de diffusion intrinsèque de ces deux CDs, cette différence peut également être due à une différence de constante d'association avec le carvédilol, comme semblent indiquer les R calculés en présence de  $\beta$ CD (2.28) et de  $\gamma$ CD (4.78) dans ce même tampon acétate (Tableau 8). En effet, les variations observées à travers les expériences (déplacement chimique, diffusion, temps de relaxation, etc..) sont une moyenne des valeurs de la molécule observée à l'état libre et complexée, pondérée par la valeur de constante d'association. Il s'en suit que les variations observées lors de l'ajout de CDs sont liées à la valeur de la constante considérée, laissant supposer dans ce cas, que la constante d'association du carvédilol est légèrement supérieure avec  $\gamma$ CD.



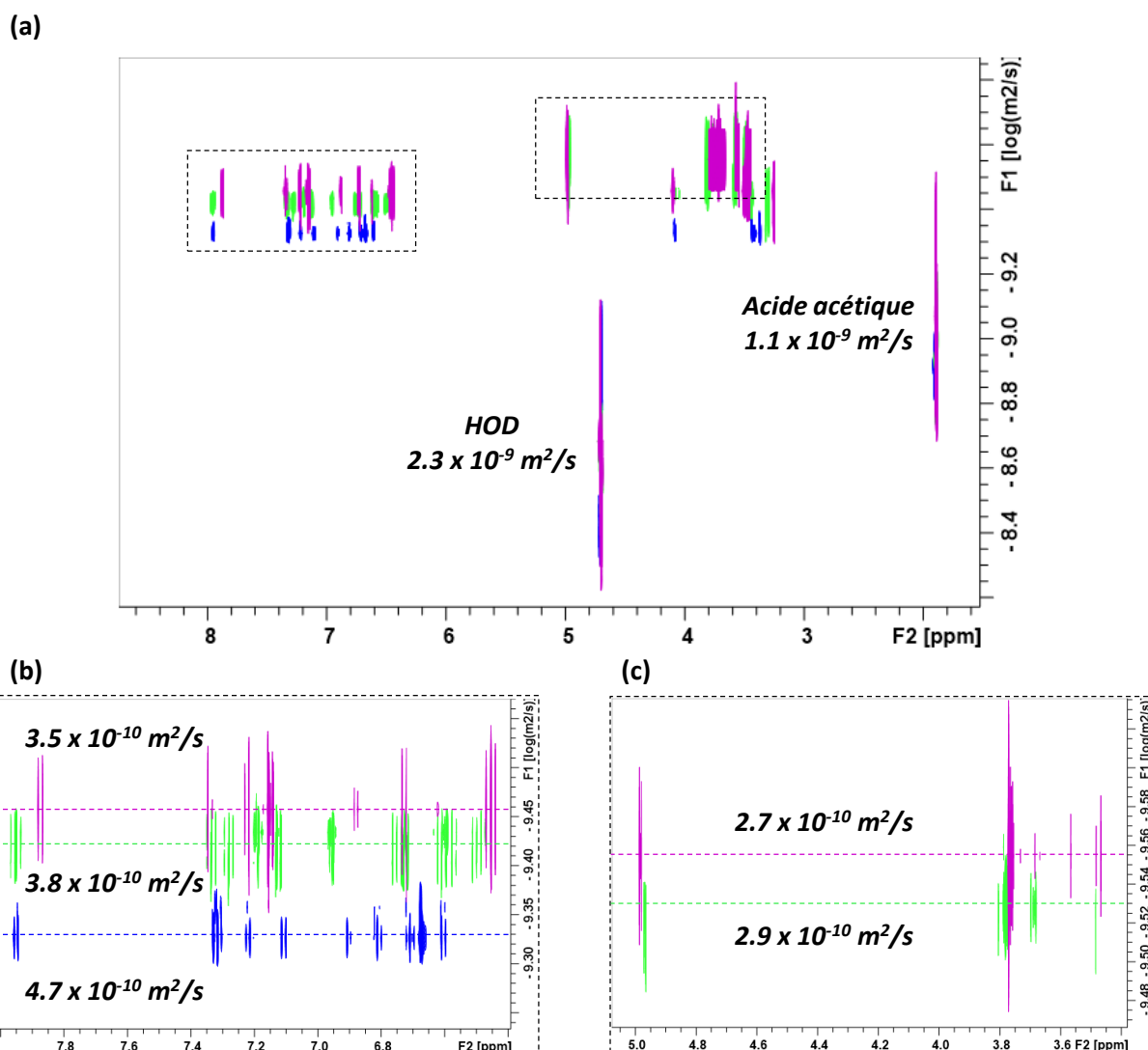


Figure 50 : Superposition des expériences RMN DOSY (600 Mhz, 298 K,  $D_2O$  tamponné acétate 0.1 M) du carvedilol (5 mM) en absence de CDs (bleu), en présence d'une quantité équimolaire de  $\beta$ CD (vert) ou de  $\gamma$ CD (violet). (a) Expériences complètes; (b) Agrandissement de la région représentative du carvedilol; (c) Agrandissement de la région des CDs.

Jusqu'à présent des variations de déplacements chimiques des protons du carvedilol ont été observées, permettant de prouver la présence d'une association avec les CDs grâce à la différenciation énantiomérique et à l'expérience DOSY, mais la nature de cette association n'est pas démontrée. Pour cela, l'observation des H des CDs est une première approche, afin de déterminer si des variations de déplacements chimiques caractéristiques de l'inclusion d'un composé sont présentes. En effet, les protons H3 et H5 des CDs étant orientés à l'intérieur de la cavité, la variation de leurs déplacements chimiques en présence d'un composé est indicatrice de la formation d'un complexe d'inclusion. Néanmoins, cette approche se limite à l'utilisation des CDs naturelles ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD) en raison de l'asymétrie des CDs modifiées et des mélanges qu'elles constituent. Les interactions avec la RAMEB peuvent toutefois être approchées par l'utilisation de la DIMEB, son homologue symétrique grâce à une méthylation régiosélective des positions 2 et 6 sur les 7 unités glucosidiques.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de solutions d' $\alpha\text{CD}$ , de  $\beta\text{CD}$ , de  $\gamma\text{CD}$  et de DIMEB ont donc été réalisés dans le  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M en absence ou en présence d'une quantité équimolaire de carvédilol (Figure 51). Comme attendu avec l' $\alpha\text{CD}$ , de faibles variations de déplacements chimiques sont observés pour tous ses H ( $\approx 0.01$  ppm), indiquant une faible interaction qui n'est pas spécifique à la cavité (Figure 51 (a)). A l'inverse, les spectres correspondant aux solutions de  $\beta\text{CD}$  montrent une plus forte variation des déplacements chimiques des protons H3 et H5 ( $\approx 0.05$  ppm) en comparaison des protons situés à l'extérieur à la cavité ( $\approx 0.01$  ppm) (Figure 51 (b)).

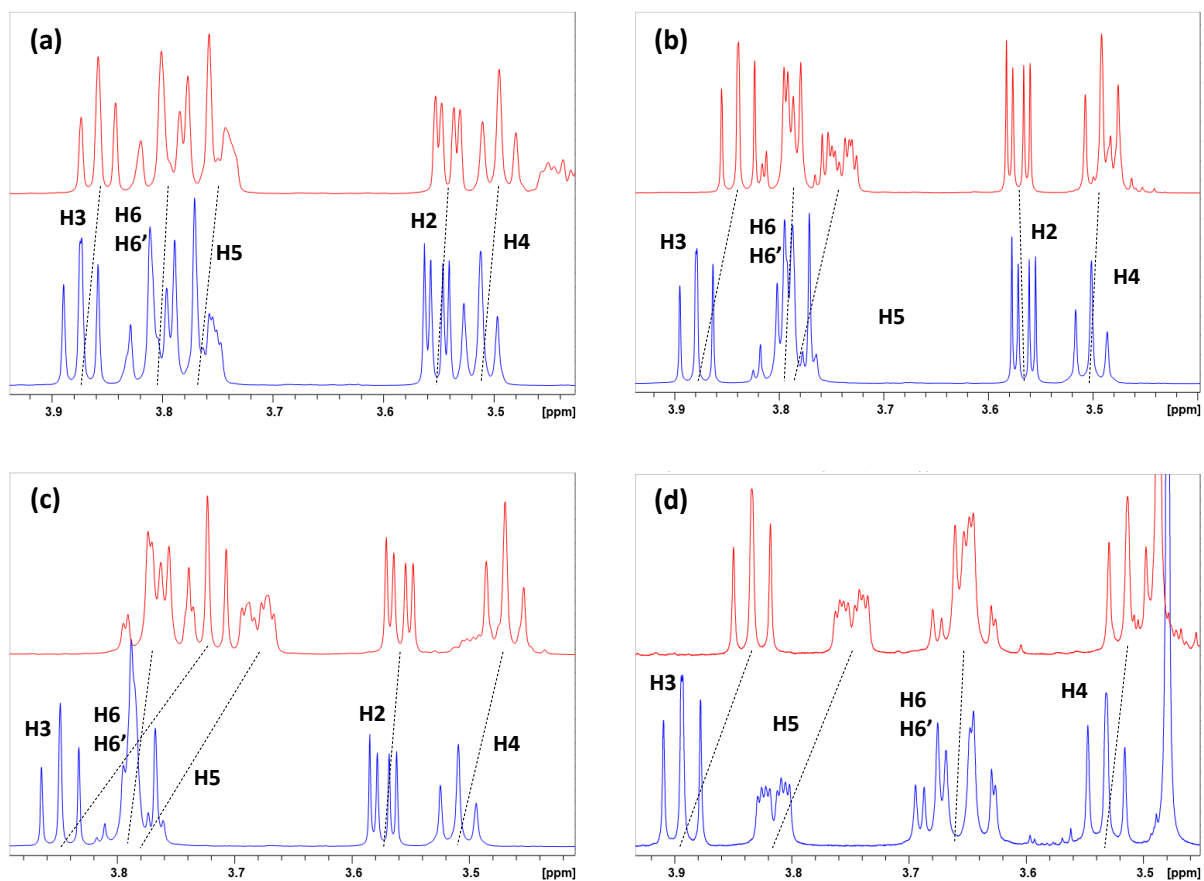


Figure 51 : Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  partiels (600 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M) de l' $\alpha\text{CD}$  (a), le  $\beta\text{CD}$  (b), le  $\gamma\text{CD}$  (c) et la Dimeb (d) en absence (bleu) ou en présence d'une quantité équimolaire de carvédilol (rouge).

Les mêmes variations spécifiques sont observées sur les spectres  $^1\text{H}$  des solutions contenant la  $\gamma\text{CD}$  ou la DIMEB, mettant ainsi en évidence la formation de complexes d'inclusion du carvédilol avec ces trois CDs. Il est à noter que les variations des H3 et H5 de la  $\gamma\text{CD}$  sont les plus importantes ( $\approx 0.1$  ppm), suivi de la DIMEB ( $\approx 0.07$  ppm) puis de la  $\beta\text{CD}$ .

Afin d'investiguer la géométrie de l'inclusion du carvédilol dans la  $\beta\text{CD}$ , la  $\gamma\text{CD}$  et la DIMEB, l'expérience T-ROESY a été réalisée dans le  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M sur des mélanges équimolaires. Un temps de mélange efficace a été déterminé par la réalisation successive de plusieurs expériences pour lesquelles ce temps d'impulsion varie de 200 ms à 1000 ms. La visualisation des taches de corrélation dipolaires fut optimale dès 800 ms (équivalente à 1000 ms), cette valeur a donc été conservée pour

l'ensemble des ROESY visant à l'analyse des complexes de CDs. Les *Figure 52*, *Figure 53* et *Figure 54* présentent les expériences ROESY réalisées avec la  $\beta$ CD, la  $\gamma$ CD et la DIMEB respectivement, démontrant la présence de nombreuses corrélations dipolaires entre ces CDs et le carvédilol. L'inclusion du carvédilol dans ces trois CDs, déterminée sur la base de la variation des déplacements chimiques des H3 et H5 en présence de carvédilol, est confirmée par l'observation de corrélations dipolaires entre certains protons du carvédilol et les protons situés à l'intérieur de la cavité de ces CDs. La meilleure résolution spectrale dans la dimension F2 et la symétrie des expériences 2D homonucléaires permettent une observation fine des H corrélés ((b), (c) des Figures 22-24). Ces expériences permettent de mettre en évidence que les deux groupements aromatiques du carvédilol, le groupement carbazole et méthoxyphényle, sont à proximité des protons situés à l'intérieur de la cavité de ces trois CDs. Le groupement carbazole, volumineux, semble être partiellement inclus dans la cavité des CDs, de son côté non-substitué. En effet, il est notable que les seuls signaux aromatiques ne générant pas ou peu de taches de corrélation avec les protons situés à l'intérieur des trois CDs sont les H11 et H13, situés du côté substitué du carbazole.

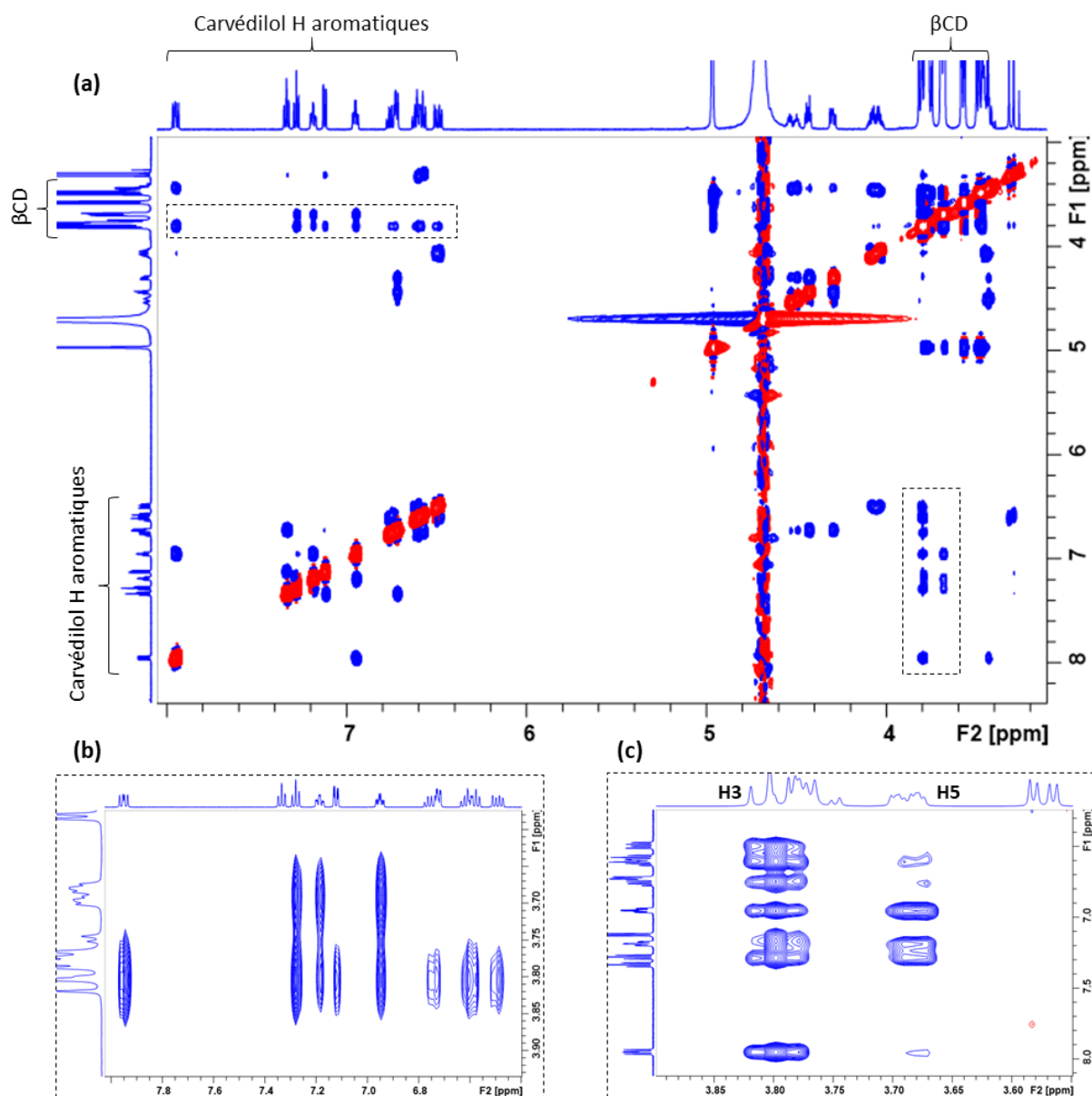


Figure 52 : Expérience RMN ROESY 2D (600 MHz, 298 K, D<sub>2</sub>O tamponné acétate 0.1 M, P15 = 800 ms) d'un mélange équimolaire de βCD et du carvedilol. (a) Expérience 2D complète; Agrandissement des zones correspondant aux corrélations dipolaires d'intérêts entre le carvedilol et la βCD permettant d'observer en F2 les signaux des parties aromatiques du carvedilol (b) ou les protons situés à l'intérieur de la cavité de la CD (c).

La comparaison qualitative de l'intensité relative des taches de corrélation, observées avec les H3 et H5 met en évidence une différence notable de l'inclusion entre les cavités des dérivés β (βCD, DIMEB) et la γCD. Reportées dans le Tableau 9, ces intensités montrent que l'inclusion du carvedilol se fait par la face secondaire des dérivés β par la présence de plus nombreuses taches de corrélation avec H3, notamment avec les H portés par le méthoxyphényle. L'expérience en présence de γCD met en évidence une géométrie d'inclusion différente, par une plus forte intensité des taches de corrélation entre les H5 de la CD et les H aromatiques du carvedilol. En effet, plusieurs hypothèses peuvent être formulées suite à cette observation :

- L'inclusion du carvedilol, et particulièrement du groupement méthoxyphényle, est plus profonde avec la  $\gamma$ CD qu'avec les dérivés  $\beta$  ;
- L'inclusion du groupement méthoxyphényle se fait par la face primaire de la  $\gamma$ CD ;
- Une combinaison des deux hypothèses précédentes correspondant à une moyenne des observations (deux géométries, deux équilibres).

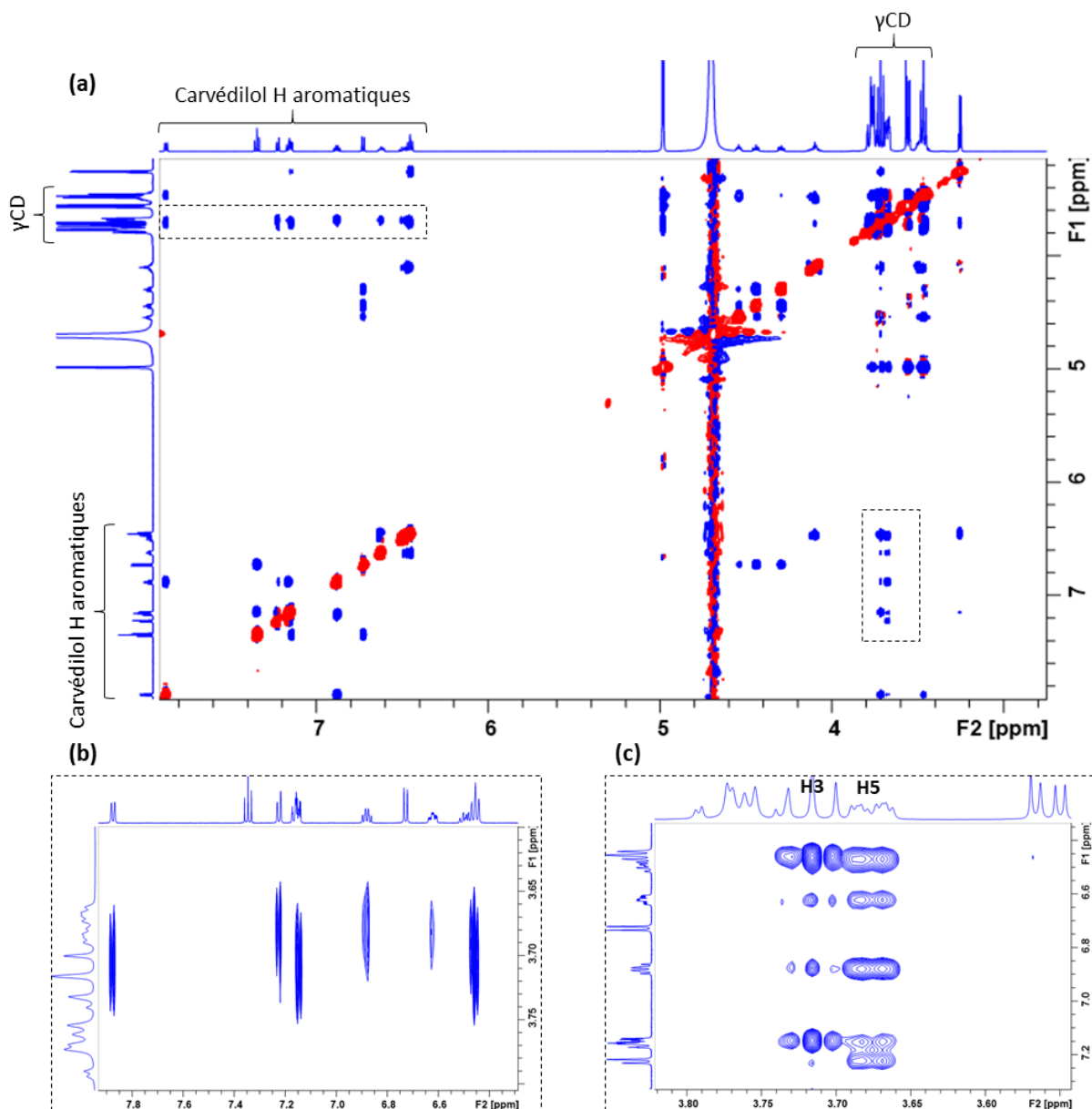


Figure 53 : Expérience RMN ROESY 2D (600 MHz, 298 K,  $D_2O$  tamponné acétate 0.1 M,  $P_{15} = 800$  ms) d'un mélange équimolaire de  $\gamma$ CD et du carvedilol. (a) Expérience 2D complète; Agrandissement des zones correspondant aux corrélations dipolaires d'intérêt entre le carvedilol et la  $\gamma$ CD permettant d'observer en F2 les signaux des parties aromatiques du carvedilol (b) ou les protons situés à l'intérieur de la cavité de la CD (c).

Il est à noter que la différence de taille de la cavité entre la  $\beta$ CD et la  $\gamma$ CD peut expliquer cette différence d'inclusion du groupement méthoxyphényle, dont la substitution en ortho génère une augmentation de son diamètre et une gêne potentielle à son inclusion profonde dans les cavités  $\beta$  ( $\beta$ CD et DIMEB).

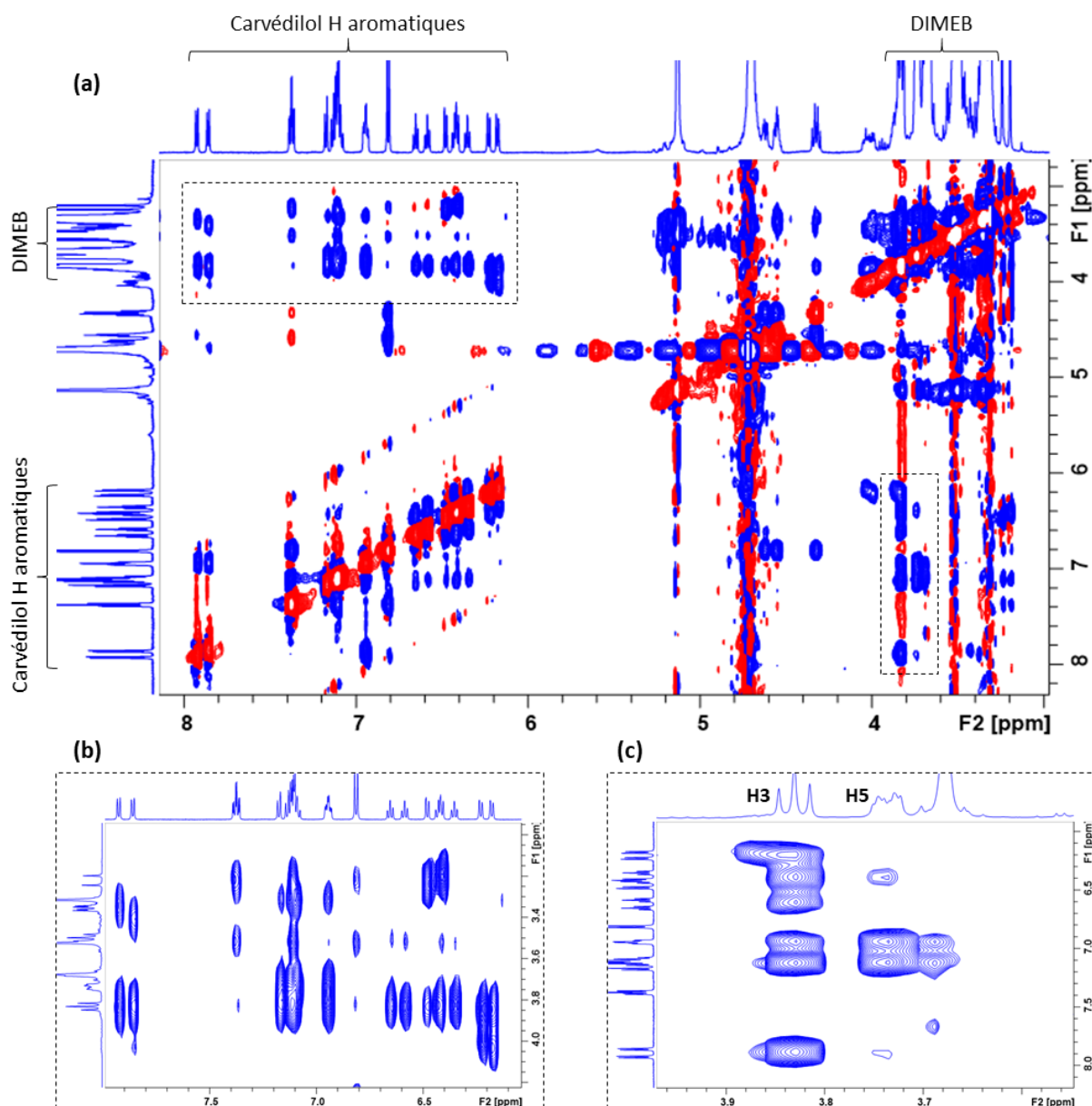
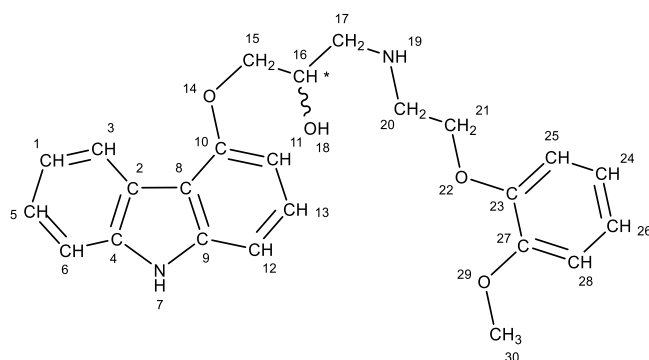


Figure 54 : Expérience RMN ROESY 2D (600 MHz, 298 K, D<sub>2</sub>O +HCl 13 mM, P15 = 800 ms) d'un mélange équimolaire de Dimeb et du carvedilol. (a) Expérience 2D complète; Agrandissement des zones correspondant aux corrélations dipolaires d'intérêts entre le carvedilol et la Dimeb permettant d'observer en F2 les signaux des parties aromatiques du carvedilol (b) ou les protons situés à l'intérieur de la cavité de la CD (c).

Enfin, outre son analogie avec la RAMEB, l'utilisation de la DIMEB apporte des informations supplémentaires concernant la géométrie de l'inclusion. En effet, la présence de groupements méthyle (visibles dans le D<sub>2</sub>O et plus volumineux que les alcools naturels) permet l'observation de davantage de corrélations dipolaires avec le carvedilol. Comme visible dans le Tableau 9, les méthyles situés sur la face secondaire de la DIMEB sont à proximité des H portés par le côté non-substitué du carbazole. Ces taches de corrélation apportent la confirmation que l'inclusion de ce groupement se fait par la face secondaire de la DIMEB, permettant de supposer une géométrie similaire avec la  $\beta$ CD qui possède une cavité de même taille et les mêmes corrélations dipolaires avec le carvedilol.

Tableau 9 : Intensités relatives des corrélations dipolaires observées par ROESY 2D, entre les protons des CDs et ceux du carvédilol.



	Carbazole							Aliphatic						Methoxyphenyl				
	H1	H3	H5	H6	H11	H12	H13	H15a	H15b	H16	H17	H20	H21	H28	H26	H24	H25	
βCD	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H3	++	+++	++	+++	-	++	+	-	+	-	ND	ND	+	++	++	++	++
	H4	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
	H5	+++	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	+	+	-
	H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γCD	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H3	++	+++	+	+	+	+++	+	-	+	+	ND	ND	+	+++	++	+	ND
	H4	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
	H5	+++	++	++	++	-	ND	-	-	-	-	ND	ND	-	++	++	++	+++
	H6	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIMEB	H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H3	++	+++	++	++	+	++	+	-	+	-	ND	ND	+	++	++	+++	+++
	H4	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
	H5	+++	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	+	+	+	-
	H6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-
	CH3(2)	+	-	-	-	++	++	++	-	-	-	ND	ND	-	-	+	+	-
	CH3(6)	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	-	-	-

ND : Non déterminé pour cause de superposition des signaux. (-) Aucune corrélation n'est observée. (+), (++) et (+++) correspondent respectivement à une intensité faible, moyenne et forte des taches de corrélations observées.

L'ensemble des expériences RMN décrites ci-dessus ont permis de conclure de la présence d'associations entre le carvédilol et la βCD, la γCD et la DIMEB en milieu aqueux avec une équivalence entre le tampon acétate 0.1 M et HCl 13 mM. Cette association a été définie comme étant un complexe d'inclusion grâce aux variations de déplacements chimiques spécifiques et l'expérience ROESY a mis en évidence une géométrie d'inclusion complexe. En effet, les corrélations dipolaires intermoléculaires observées peuvent être dues à la présence simultanée de différents complexes en solution, menant à

une ambiguïté concernant la stœchiométrie du complexe dans la mesure où deux groupements distant corrélerent avec l'intérieur des CDs. La Schéma 13 schématise les possibilités d'inclusion du carvédilol dans les CDs, sur la base des expériences ROESY, afin de visualiser les différentes stœchiométries compatibles avec les données expérimentales. Sans discuter de l'orientation des CDs (face primaire ou face secondaire), l'inclusion démontrée du groupement carbazole et du groupement méthoxyphényle mènent à trois interprétations possibles :

- Deux complexes de stœchiométrie 1 :1 sont présents en équilibre : dans ce cas l'observation des taches de corrélations dipolaires avec l'intérieur de la cavité des CDs s'explique par la formation de deux objets distincts.
- Un seul complexe de stœchiométrie 1 :2 (carvédilol :CD) est présent : Dans ce cas la formation d'un complexe impliquant une molécule de carvédilol et deux molécules de CDs se forme en solution, par l'inclusion des deux groupements aromatique séquentiellement ou simultanément.
- La présence des deux possibilités précédentes, en équilibre et en proportion non déterminable.

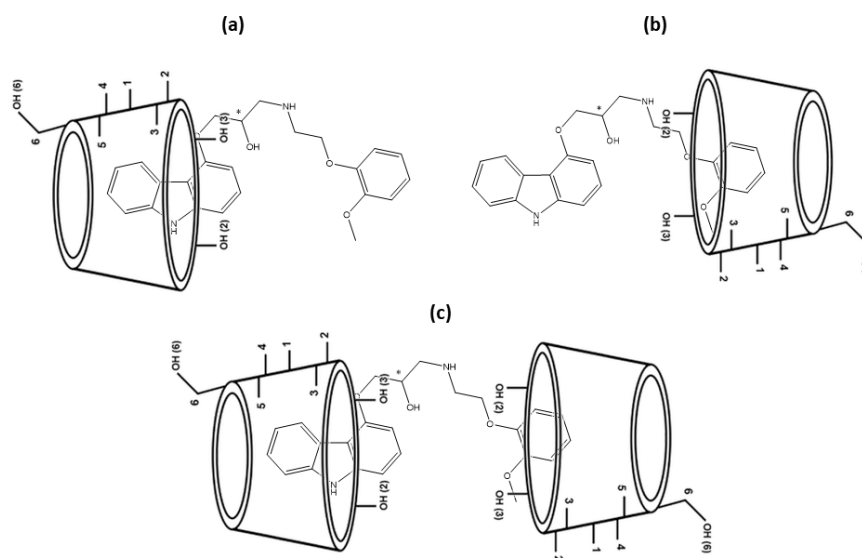


Schéma 13 : Schématisation des complexes potentiels en accord avec les expériences RMN ROESY correspondant à l'inclusion du groupement carbazole (a), méthoxyphényle (b) ou les deux simultanément (c).

Il convient de préciser que, malgré la bonne résolution obtenue pour l'ensemble de ces expériences ROESY, la différence de déplacements chimiques entre les deux énantiomères est trop faible pour pouvoir évaluer si les géométries d'inclusion sont identiques ou non, nous menant à attribuer ces observations sans distinctions énantiomérique du carvédilol (R) ou (S).

Afin de déterminer la stœchiométrie de ces complexes, l'expérience de Job a été mise en place, suivie par RMN  $^1\text{H}$ , dans le tampon acétate 0.1 M deutéré ( $\beta\text{CD}$ ,  $\gamma\text{CD}$ ) et HCl 13 mM dans le  $\text{D}_2\text{O}$  (DIMEB).



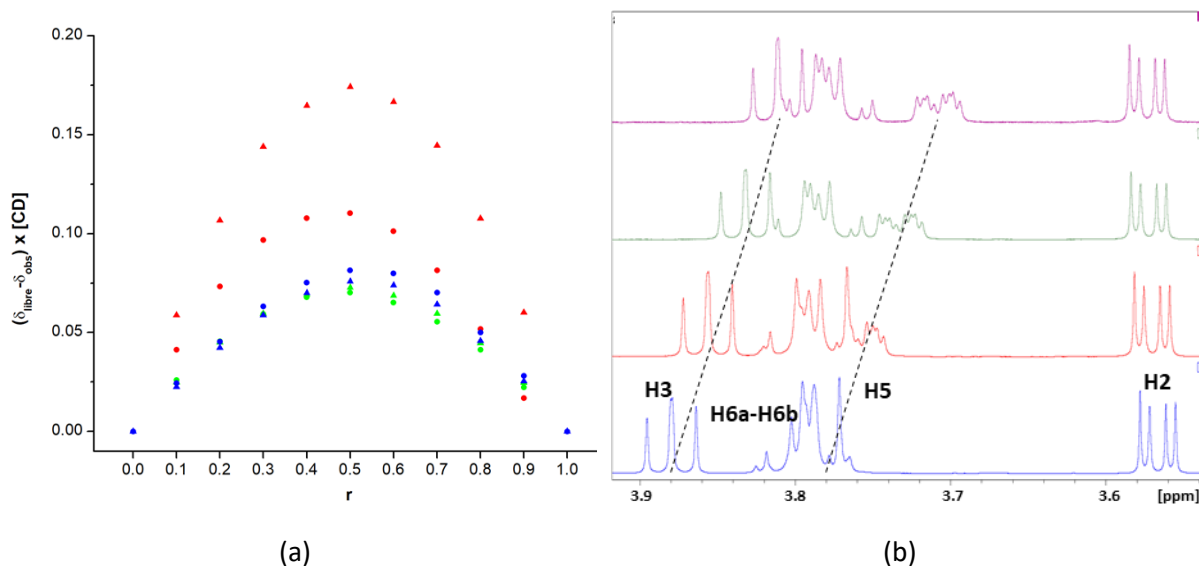


Figure 55 : (a) Superposition des Job's plot obtenus par l'analyse des variations de déplacements chimiques (RMN  $^1\text{H}$ , 600 MHz, 298 K) des signaux correspondant aux protons situés à l'intérieur de la cavité des CDs (rond, H5; triangle, H3). Les expériences en présence de  $\beta\text{CD}$  (vert) ou de  $\gamma\text{CD}$  (rouge) ont été réalisées dans le  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1M. L'expérience en présence de Dimeb (bleu) a été réalisée dans le  $\text{D}_2\text{O}$  + HCl 13 mM.  $r = \frac{[\text{CD}]}{[\text{CD}] + [\text{carvédilol}]}$ . (b) Exemples de spectres RMN  $^1\text{H}$  partiels obtenus avec la  $\beta\text{CD}$  à différentes valeurs de r (bleu 1.0, rouge 0.7, vert 0.4, violet 0.1).

Dans un premier temps, l'observation de la variation des déplacements chimiques des H situés à l'intérieur des CDs a permis de tracer les Job's plot représentés sur la Figure 55. Pour les trois CDs étudiées, le tracé est parfaitement centré autour de  $r = 0.5$  pour les protons H3 et H5, permettant de conclure que la stœchiométrie des complexes formés est de 1 :1 (Schéma 13 (a), (b)). Au vu de ces résultats, la formation d'un complexe de stœchiométrie 1 :2 peut être exclue ou si elle existe, possède une constante d'association suffisamment faible en comparaison des complexes de stœchiométrie 1:1 pour ne pas impacter le sommet du Job's plot [96]. L'utilisation de la RMN comme technique d'analyse pour la réalisation de cette expérience offre l'avantage de pouvoir observer les deux composés en une unique expérience. C'est pourquoi dans un second temps, l'observation des H portés par le carvedilol a été réalisée pour vérifier si le même résultat est obtenu que par l'observation des H des CDs. La Figure 56 présente la superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  aux fenêtres de déplacements chimiques du carvedilol en présence de  $\beta\text{CD}$  à différentes fractions molaires (r variant de 0 à 0.9), mettant en évidence une forte variation des déplacements chimiques et une différenciation énantiomérique en fonction de la quantité de CDs.

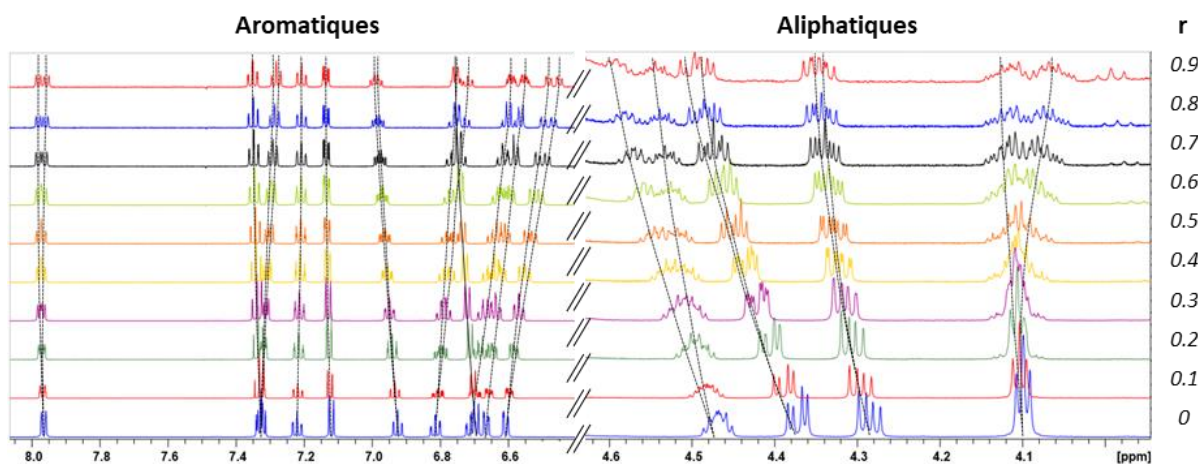


Figure 56 : Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$  tamponné acétate 0.1 M) obtenus par l'expérience de Job avec le carvedilol en présence de  $\beta\text{CD}$  ( $[\beta\text{CD}] + [\text{carvédilol}] = 3.65 \text{ mM}$ ),  $r$  correspondant à la fraction molaire de la  $\beta\text{CD}$ .

Les Job's plot correspondant à tous les H du carvedilol visibles (non confondus avec les H des CDs) sont majoritairement interprétables par une stœchiométrie de 1 :1 avec un sommet proche de 0.5. La Figure 57 reprend les tracés pour deux protons, le H25 situé sur le groupement méthoxyphényle (Figure 57, (a)) et le H3 porté par la partie non-substituée du carbazole (Figure 57, (b)). Le tracé par le suivi des variations de déplacement chimique du H25 est parfaitement centré à 0.5, comme obtenu par l'observation des H des CDs, pour les trois CDs étudiées et les deux énantiomères du carvedilol. À l'inverse, le Job's plot du H3 réalisé en présence de  $\beta\text{CD}$  ne possède pas de sommet correctement défini et notamment un changement de signe, alors qu'un sommet à 0.5 est obtenu en présence de  $\gamma\text{CD}$  et de DIMEB. Comme observé sur la Figure 56 à 8 ppm environ, la variation de déplacements chimiques de H3 est visible dès  $r = 0.1$  alors que la différenciation énantiomérique apparaît à partir de  $r = 0.3$ . Il en est de même pour les H21, pour lesquels un énantiomère est déblindé et l'autre blindé à partir de  $r = 0.6$ , menant au tracé d'un Job's plot avec un changement de signe. De manière intéressante, les H pour lesquels des changements de signes ou un sommet non centré autour de 0.5 correspondent à ceux portés par la partie non-substituée du groupement carbazole ou la partie aliphatique du carvedilol. Ces informations sont une indication de la présence d'un ou plusieurs équilibres supplémentaires interférant la lisibilité de la variation des déplacements chimiques.

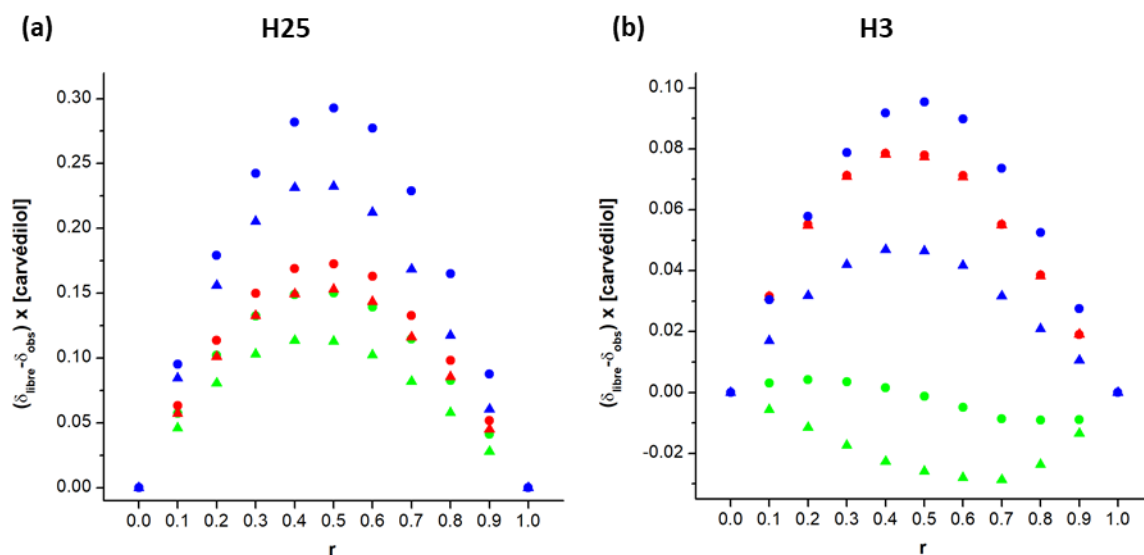


Figure 57 : Superposition des Job's plot obtenus par l'analyse des variations de déplacements chimiques (RMN  $^1\text{H}$ , 600 MHz, 298 K) de deux signaux du carvedilol, le proton H25 situé sur le groupement méthoxyphényle (a) et le proton H3 situé sur la partie non-substituée du groupement carbazole (b), en présence de  $\beta$ CD (vert), de  $\gamma$ CD (rouge) ou de Dimeb (bleu). La différenciation entre les triangles et les ronds correspond au suivi d'un même proton pour les deux énantiomères.  $r = \frac{[\text{carvédilol}]}{[\text{CD}] + [\text{carvédilol}]}$

Dans la mesure où tous les Job's plot correspondant aux H portés par le groupement méthoxyphényle sont symétriques et centrés à 0.5, cette partie du carvedilol semble ne pas être impliquée dans un équilibre régi par une constante suffisamment forte pour influencer le sommet du Job's plot. La partie aliphatique n'étant pas incluse dans la cavité des CDs d'après les ROESY réalisées, leur observation n'est pas pertinente car la présence des deux complexes de stœchiométrie 1 :1 induisent des environnements chimiques différents autour des H aliphatiques, ce qui peut expliquer une perte de symétrie et des Job's plot aux allures non exploitables. Concernant la partie carbazole inclus dans les CDs étudiées, la partie non-substituée contient deux protons (H3 et H5) dont le Job's plot n'est pas interprétable. Etant distant du groupe méthoxyphényle, le complexe d'inclusion formé sur cette partie du carvedilol n'influence probablement pas l'environnement du groupement carbazole. Au vu des différences de solubilités obtenues avec la  $\beta$ CD ( $R = 2.28$ ) d'une part, et la  $\gamma$ CD ( $R = 4.78$ ) et la DIMEB ( $R = 5.09$ ) d'autre part, l'hypothèse suivante peut être formulée : l'association de la  $\beta$ CD avec le carvedilol et plus précisément le groupe carbazole, est en compétition avec un équilibre supplémentaire régi par une constante significative en comparaison de celle de l'inclusion dans la  $\beta$ CD. L'obtention de Job's plot symétriques avec la  $\gamma$ CD et la DIMEB pour ces mêmes protons, ainsi que les résultats de solubilité indiqueraient que les complexes formés par l'inclusion du groupe carbazole avec ces CDs possèdent une valeur de constante de formation suffisamment forte pour masquer cet équilibre tiers, à priori d'auto-association.

La dernière observation réalisée à partir des expériences RMN  $^1\text{H}$  mise en place pour l'expérience de Job se porte sur les constantes de couplage du H15b de carvedilol. La Figure 58 présente le suivi de la

constante  $^3J_{H15b-H16}$  en fonction du rapport molaire  $[CD]/[carvédilol]$ . Un exemple du suivi de cette constante de couplage sur les spectres protons, dans le cas de la DIMEB (HCl 13 mM dans  $D_2O$ ), est présentée sur la Figure 58 (b) et le tracé de ces variations sur la Figure 58 (c). En absence de CDs, la constante de couplage mesurée est, dans tous les échantillons ( $D_2O$  tamponné acétate 0.1 mM ou HCl 13 mM), aux alentours de 5.5 Hz, proche de la  $^3J_{H15a-H16}$  (4.0 Hz). L'obtention de valeurs de constantes  $^3J$  proches entre H15a-H16 et H15b-H16 peut indiquer une liberté de la rotation de la liaison CH16-CH15. L'ajout de CDs augmente significativement la  $^3J_{H15b-H16}$  alors que la  $^3J_{H15a-H16}$  reste inchangée, quelle que soit la proportion  $[CD]/[carvédilol]$ .

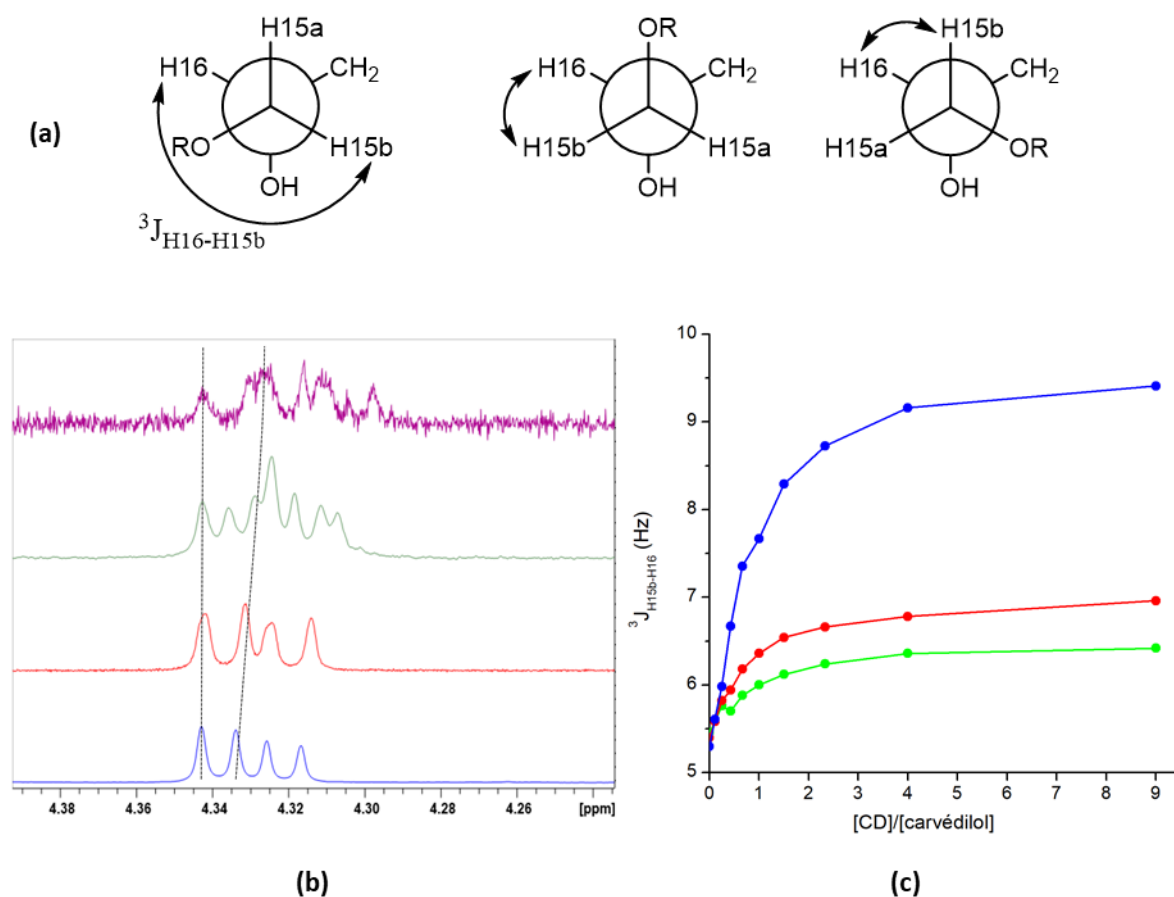


Figure 58 : (a) Représentation de Newman de la constante de couplage  $^3J_{H16-H15b}$  observée selon différentes conformations. (b) Superposition de spectres RMN  $^1H$  (600 MHz, 298 K,  $D_2O$  + HCl 13 mM) partiels focalisés et alignés sur le H15 du carvedilol en présence de Dimeb aux rapports  $[CD]/[carvédilol]$  suivants : 0 (bleu), 0.43 (rouge), 1.5 (vert) et 9 (violet). (c) Variation de la constante de couplage  $^3J_{H15b, H16}$  observée lors des expériences de Job en présence de  $\beta$ CD (vert), de  $\gamma$ CD (rouge) ou de Dimeb (bleu).

Le changement de la valeur de la constante de couplage  $^3J$ , observé seulement avec l'un des deux H portés par un CH<sub>2</sub> inéquivalent et les courbes tracées sur la Figure 58 (b) indiquent que la formation du complexe d'inclusion avec ces CDs induit une contrainte limitant cette libre rotation. L'augmentation de la proportion jusqu'à un rapport  $[CD]/[carvédilol] = 9$  augmente la constante de couplage jusqu'à obtenir une valeur proche d'un plateau, d'une valeur de 6.42 Hz avec la  $\beta$ CD, de 6.96 Hz avec la  $\gamma$ CD et de 9.41 Hz avec la DIMEB. Les observations réalisées étant des moyennes des

différents états du carvédilol en solution, sous forme complexée ou libre, il est admissible qu'à ce rapport molaire la fraction complexée du carvédilol est optimisée, ce qui explique l'atteinte d'un plateau. Il est notable que la variation observée est maximale en présence de DIMEB, avec une variation finale de 4.11 Hz, ce qui est une nouvelle fois en accord avec les expériences de solubilité. Etant donné la plus grande proximité du groupement carbazole avec ces protons H15, l'inclusion de ce groupement est probablement responsable de la création de cette contrainte. De ce fait, la différence observée entre les trois CDs étudiées peut être expliquée comme suit : L'inclusion du carbazole est plus profonde avec la  $\gamma$ CD qu'avec la  $\beta$ CD, se basant notamment sur la différence de la taille des cavités et les expériences ROESY, la  $\gamma$ CD est donc plus proche de H15. La contrainte étant liée à la proximité des CDs avec ce proton et des interactions que cela engendre, la comparaison de la  $\beta$ CD et de  $\gamma$ CD et les conclusions qui en découlent sont justifiables par le fait que ces deux CDs possèdent tous leurs hydroxyles libres. Concernant la DIMEB, la variation conséquente de cette constante de couplage indique que la liberté de rotation de la liaison CH16-CH15 est considérablement restreinte par l'inclusion du carvédilol, à priori de la partie carbazole. Par comparaison avec la  $\beta$ CD qui possède le même diamètre de cavité, la présence de groupements méthyle modifie les interactions induites par l'inclusion. Cette observation permet de supposer que les contraintes liées à l'inclusion sont dues aux hydroxyles libres présents sur la face secondaire des CDs et leur capacité à former des liaisons hydrogène avec l'alcool du carvédilol porté par le CH16 et l'oxygène séparant le carbazole de la partie aliphatique. De ce fait, la  $\beta$ CD et la  $\gamma$ CD disposant de tous leurs hydroxyles libres, les liaisons hydrogènes sont partagées réduisant leur force et les probabilités d'une unique conformation contrainte. A l'inverse, la DIMEB ne possède qu'un hydroxyle libre par glucose sur sa face secondaire, limitant le nombre de liaisons hydrogène, ce qui est davantage favorable à la présence d'une conformation stable, par la force de ces liaisons qui se voit augmentée en comparaison de celles formées par les CDs naturelles. L'hypothèse de la présence de liaisons hydrogène entre la DIMEB et la carvédilol a permis, en collaboration avec le Pr. David Landy de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), de proposer une structure 3D du complexe d'inclusion du groupement carbazole, Figure 59.

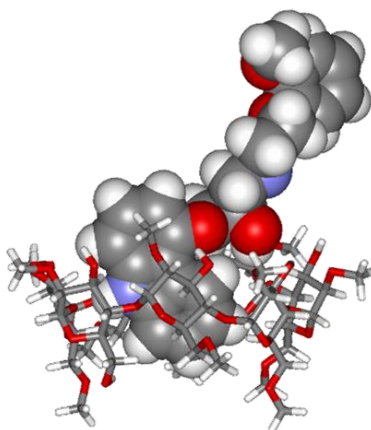


Figure 59 : Géométrie du complexe d'inclusion du groupement carbazole par la DIMEB, orientée par la présence de liaisons hydrogène formées par les hydroxyles libres de la face secondaire de la DIMEB avec l'alcool du carvédilol (R) et l'oxygène lié au carbazole. Cette conformation a été extraite d'une simulation de dynamique moléculaire réalisée à 298 K avec la présence implicite d'eau (Abalone software).

L'ensemble des informations obtenues, mène donc aux conclusions suivantes :

- La présence de CDs et l'association qu'elles génèrent mènent à la formation d'un objet de plus grande taille que le carvédilol ;
- Cette association est caractérisée comme étant un complexe d'inclusion avec les trois CDs étudiées, sur la base des variations de déplacements chimiques des protons de l'hôte et de l'invitée et des taches de corrélation observées entre ces deux derniers lors d'expériences ROESY.
- La ROESY a permis de mettre en évidence l'inclusion des deux groupements aromatiques (carbazole, méthoxyphenyle) du carvédilol dans les 3 CDs étudiées ;
- La stœchiométrie 1 :1 a été déterminée par l'expérience de Job : deux complexes d'inclusion sont présents en solution, par l'inclusion du groupe carbazole ou du groupe méthoxyphenyle ;
- Ces inclusions sont plus profondes avec la  $\gamma$ CD ;
- La présence de DIMEB induit une forte contrainte stérique sur le carvédilol, à priori liée à la présence de liaisons hydrogène entre les OH libres de la face secondaire de la CD, le OH du carvédilol et l'oxygène lié au carbazole.

L'obtention de ces informations structurales converge donc vers le fait que le carvédilol est réellement inclus dans la cavité des trois CDs étudiées en solution. Ces informations mettent également en évidence que le carvédilol est un cas complexe dans la mesure où cette substance active est sous forme de mélange racémique et qu'elle possède deux sites d'inclusion potentiels. Sa capacité à s'auto-associer ajoute un équilibre tiers qui est partiellement responsable de son insolubilité dans l'eau et qui représente une compétition avec la formation des complexes d'inclusion, mis en évidence par les essais de diagrammes de phase dans HCl. Afin d'approfondir la caractérisation de ce système, la

détermination des paramètres thermodynamiques sera réalisée avec la  $\gamma$ CD et la RAMEB par titration calorimétrique isotherme.

#### II.1.3.2.2. Détermination des paramètres thermodynamiques par ITC

*Préambule : Toutes les expériences de trituration par ITC ont été réalisées à l'ULCO en collaboration avec le Pr. David Landy grâce à son expertise dans cette technique d'analyse et des protocoles à mettre en place permettant l'obtention de données thermodynamiques fiables [84]. Le traitement des données expérimentales a donc été réalisé par ses soins, par les regressions appropriées suivant des modèles mathématiques correspondant à différents phénomènes. Toutes les analyses ont été effectuées par l'injection de 1  $\mu$ L suivie de 10 injections de 3.5  $\mu$ L. La première injection permet de s'assurer de l'absence de bulles dans l'aiguille de la seringue et n'est pas prise en compte dans l'exploitation des données. Le volume de la seringue étant de 40  $\mu$ L, le volume des injections visant à être exploitées a été déterminé afin de pouvoir obtenir 10 points par expérience, un nombre suffisant pour vérifier la qualité des extrapolations réalisées. Il est à noter que l'augmentation du nombre de points implique une diminution du volume injecté et donc de chaleur générée. C'est pourquoi le nombre de 10 points obtenus par les injections successives de 3.5  $\mu$ L correspond à un compromis acceptable entre terme de qualité de l'extrapolation et chaleurs mesurées.*

L'ITC est une technique d'analyse mesurant les variations de chaleur par plusieurs injections successives d'une solution dans la cellule de mesure calorifugée. Lorsqu'une variation de la température est détectée par l'appareil, ce dernier ajuste l'énergie nécessaire à conserver la température initiale, permettant de quantifier les variations de chaleur. C'est une technique d'analyse qui peut détecter de faibles variations de chaleur, telles que celles générées par la dilution d'un composé ou la simple friction engendrée par l'injection. Les variations de pH génèrent également de la chaleur détectable par l'ITC, c'est pourquoi l'utilisation d'un milieu tamponné est indispensable lors de la réalisation de titration par cette technique, pour s'affranchir au maximum des variations de pH. Le tampon acétate (0.1 M, pH = pKa = 4.7) ayant permis l'obtention d'une solubilité correcte du carvédilol, en absence de CDs, ce milieu a été choisi pour l'ensemble des expériences réalisées par la suite.

Avant toute analyse des complexes d'inclusion entre les CDs ( $\gamma$ CD, RAMEB) et le carvédilol, il est nécessaire de déterminer les chaleurs générées par les phénomènes attribuables aux blancs d'injection des composés seuls. En effet, les observations de chaleurs obtenues par cette technique correspondent à une superposition de l'ensemble des phénomènes induits par l'injection de la solution de la seringue dans celle de la cellule de mesure. Il convient donc d'effectuer au préalable une série d'expériences pour mesurer indépendamment ces chaleurs de blancs afin de pouvoir les soustraire lors de l'analyse des complexes.

Tableau 10 : Détail des expériences réalisées pour évaluer les chaleurs des blancs

	Expérience 1		Expérience 2		Expérience 2'		Expérience 3	
	Seringue	Cellule	Seringue	Cellule	Seringue	Cellule	Seringue	Cellule
[carvédilol] (mM)	0	0	5	0	0	0.5	0	0
[CD] (mM)	0	0	0	0	0	0	5	0
Effet recherché	Chaleur d'injection		Chaleur de dilution / dissociation d'auto-association du carvédilol				Chaleur de dilution / dissociation des CDs	

Comme indiquée dans le Tableau 10 la première expérience consiste à la simple injection du tampon dans le tampon permettant de mesurer la chaleur que provoque, pour ce système, la friction liée à l'injection. Les expériences 2 et 2', dont les résultats ont été discutés précédemment (Figure 48), visent à déterminer si la dilution du carvédilol crée une variation de chaleur et si cette variation est dépendante de la concentration. D'une part, la dilution du carvédilol à 0.5 mM (expérience 2') génère une variation de chaleur (exothermique) plus importante que celle mesurée lors de l'expérience 1. D'autre part, la dilution d'une solution concentrée à 5 mM (expérience 2) génère l'augmentation du pic exothermique observé à 0.5 mM et l'apparition d'un pic endothermique absent à 0.5 mM. L'intégration des pics observés à 0.5 mM et à 5 mM mène finalement à des aires similaires en raison de la compensation endothermique / exothermique. Cette expérience permet donc de montrer qu'il est possible de s'affranchir de l'effet thermodynamique lié à la concentration du carvédilol lors de l'analyse des complexes avec les CDs. Il est judicieux de préciser que pour la réalisation de ces expériences, l'emplacement de la solution de carvédilol n'a pas d'influence significative sur l'interprétation des résultats. En effet, l'injection d'une solution concentrée de carvédilol dans le tampon implique une forte dilution de la solution injectée et un nombre de moles restreint. A l'inverse, l'injection du tampon dans la solution de carvédilol induit une dilution moins importante mais implique un nombre de moles plus important, menant à une équivalence en terme de chaleur/mol générée. Enfin, l'expérience 3 est analogue à celle réalisée avec le carvédilol, consistant à injecter une solution de CD dans le tampon afin de mesurer la chaleur de dilution qu'elle génère.

Les expériences précédentes ont donc permis de dissocier les phénomènes thermiques afin d'isoler, après la soustraction des blancs, les chaleurs générées par l'association CD – carvédilol décrites dans le Tableau 11. La méthode de détermination des constantes d'association du carvédilol avec la  $\gamma$ CD et la RAMEB se décompose en trois protocoles distincts. Le protocole A consiste à injecter une solution concentrée en CD (5 mM) dans une solution de carvédilol dix fois moins concentrée (0.5 mM),



permettant de mesurer la chaleur de formation du complexe. A l'inverse, le protocole B mène à l'obtention de la chaleur de dissociation du complexe, par l'injection dans le tampon d'un mélange carvédilol – CD dans lequel se trouve le complexe déjà formé. Le protocole C représente l'intermédiaire des A et B, soit l'injection du mélange CD – carvédilol dans une solution de carvédilol. Cette dernière expérience a pour objectif l'obtention un thermogramme plat, la proportion de carvédilol sous forme libre dans la seringue et dans la cellule étant proche.

Tableau 11 : Détail des protocoles utilisés en ITC pour déterminer les constantes thermodynamiques impliquées dans la formation des complexes entre le carvédilol et la  $\gamma$ CD ou la Rameb en milieu tampon acétate 0.1M ( $pH = pKa = 4.7$ ).

	Protocole A		Protocole B		Protocole C	
	Seringue	Cellule	Seringue	Cellule	Seringue	Cellule
[carvédilol] (mM)	0	0.5	1	0	1	0.5
[CD] (mM)	5	0	5	0	5	0
Effet	Formation du complexe		Dissociation du complexe		Formation + Dissociation (équilibre)	

Il a été démontré que l'exploitation de ces trois expériences diminue significativement l'erreur associée à la détermination de la constante d'association en comparaison à la simple titration classiquement utilisée (protocole A) [84]. Ces expériences ont également été réalisées à trois températures, 288 K, 298 K et 308 K. A titre illustratif, la Figure 60 présente les thermogrammes obtenues à 298 K, avant la soustraction des blancs, suite à la réalisation des protocoles A (Figure 60, (a)), B (Figure 60, (b)) et C (Figure 60, (c)). Qualitativement, il est observable que la formation du complexe est exothermique et donc sa dissociation endothermique. Il est également notable que le protocole C mène à l'obtention d'un thermogramme proche de la combinaison de ceux obtenus par les protocoles A et B, comme souhaité. Sachant que la chaleur des blancs (non représentée) est exothermiques et que les thermogrammes repris sur la Figure 60 correspondent aux données brutes, la présence de pics exothermiques lors de la dissociation du complexe est attribuable aux blancs.

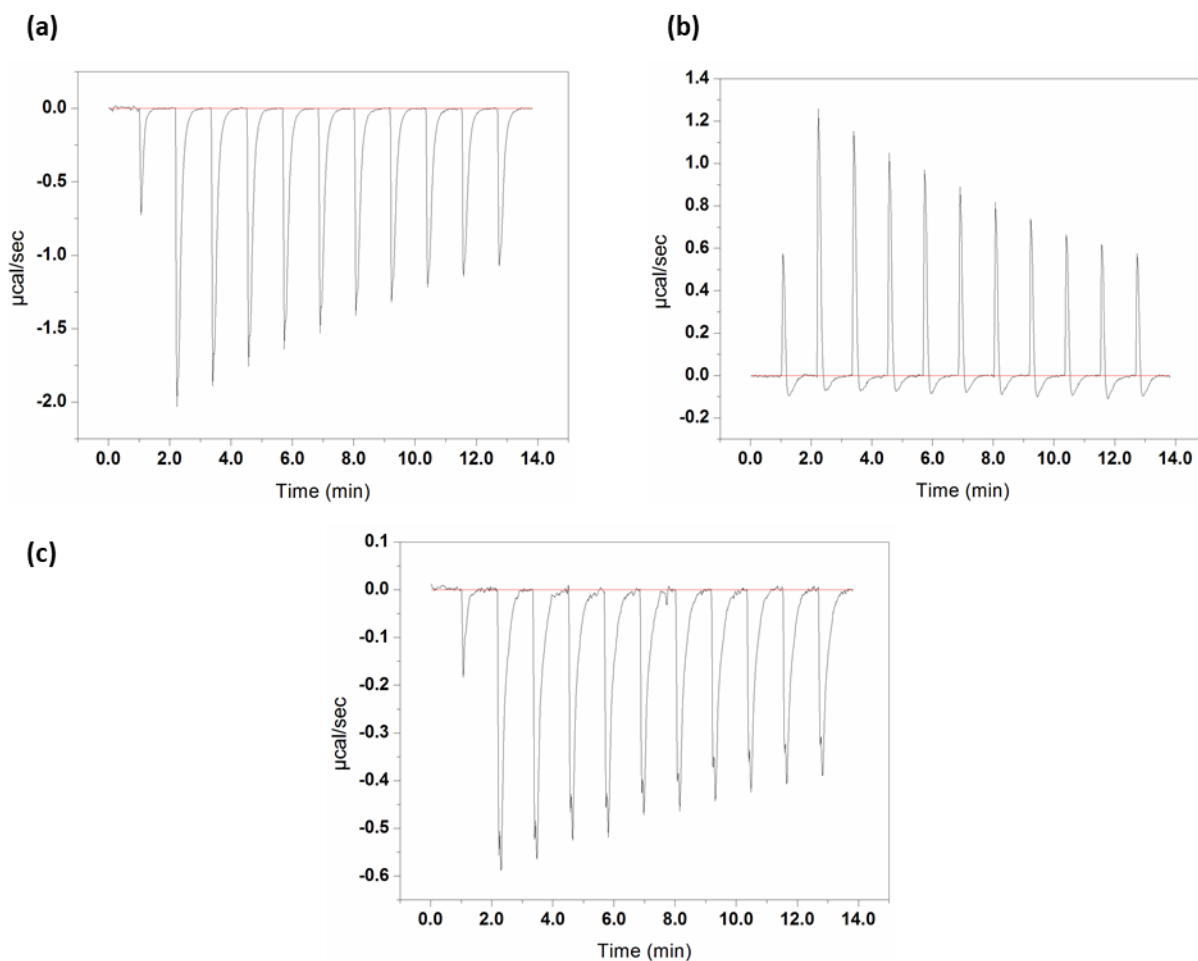


Figure 60 : Exemple de thermogrammes obtenus par ITC selon les protocoles A (a), B (b) et C (c) pour le couple carvedilol/ $\gamma$ CD dans le tampon acétate 0.1 M (pH = 4.7), à 298 K.

Les isothermes correspondant à l'ensemble des expériences réalisées, après soustraction des chaleurs de blancs, sont présentés Figure 61. Après différents essais, la qualité de l'extrapolation (lignes) des données expérimentales (points) a été optimale lors de l'utilisation d'un modèle correspondant à une stœchiométrie 1:1. L'extrapolation a été faite simultanément sur les données issues des trois protocoles, contribuant à la diminution des erreurs sur la détermination des constantes d'association. Les paramètres thermodynamiques correspondant à ces extrapolations, pour les trois températures, sont indiqués dans le Tableau 12. Il est à noter que le carvedilol analysé est sous forme racémique et que deux complexes de stœchiométrie 1:1 sont présents en solution (observation issue de la RMN), les constantes d'inclusion mesurées sont donc des moyennes de tous les complexes présents en solution. Il est remarquable que les stœchiométries déterminées sur la base des variations de déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (Job's plot) sont également de 1 :1, confortant cette information par l'obtention du même résultat à partir d'une autre technique d'analyse. Les constantes d'association mesurées entre le carvedilol et la  $\gamma$ CD ( $225 \text{ M}^{-1}$ ) sont inférieures à celles mesurées avec la RAMEB ( $317 \text{ M}^{-1}$ ) et sont dans l'ensemble relativement faibles (inférieures à  $500 \text{ M}^{-1}$ ). Ces résultats

sont en accord avec les résultats de solubilité obtenus dans le tampon acétate et ces valeurs de constantes sont appropriées pour une utilisation pharmaceutique. En effet, cet ordre de grandeur de constante d'association permet une dissociation correcte du complexe, et donc une libération de la substance active, lors de son ingestion par voie orale et de la dilution ainsi générée [31].

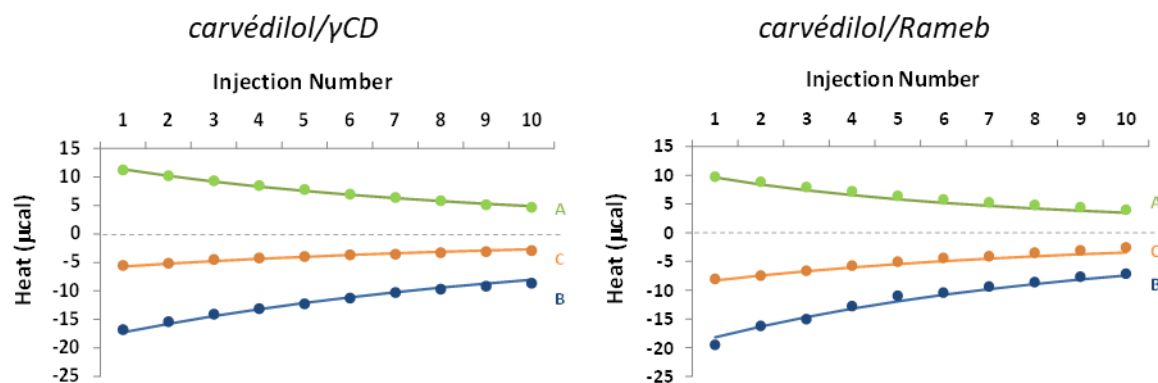


Figure 61 : Isothermes obtenues par les expériences ITC (points) suivant les protocoles A, B et C à 298 K pour les couples carvédilol/γCD et carvédilol/Rameb. Les courbes sont tracées par extrapolation suivant un modèle correspondant à une stœchiométrie de complexe 1:1.

Outre l'obtention des constantes d'inclusion, l'ITC permet également d'accéder aux paramètres thermodynamiques  $\Delta H^\circ$  (enthalpie d'inclusion),  $\Delta S^\circ$  (entropie d'inclusion) et  $\Delta G^\circ$  (énergie libre d'inclusion). De plus, la réalisation des expériences de titration à différentes températures rend possible l'obtention de la capacité calorifique d'inclusion  $\Delta C_p$ , considérée en milieu aqueux comme en partie représentative de l'exposition de groupements polaires ou apolaires à l'eau.

Tableau 12 : Paramètres thermodynamiques obtenus par ITC pour les couples carvédilol/γCD et carvédilol/RAMEB en tampon acétate 0.1 M (pH = pKa = 4.7)

	Température (K)	K (M <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$-\Delta S^\circ$ (J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
carvédilol/γCD	288	296 ± 39	-18.3 ± 0.4	4.7 ± 0.7	-13.6 ± 0.3
	298	225 ± 30	-21.4 ± 0.5	8.4 ± 0.9	-13.0 ± 0.3
	308	166 ± 22	-24.4 ± 0.7	11.3 ± 1.1	-13.1 ± 0.3
carvédilol/RAMEB	288	408 ± 60	-17.7 ± 0.7	3.3 ± 1.0	-14.4 ± 0.4
	298	317 ± 47	-18.0 ± 0.8	3.7 ± 1.2	-14.3 ± 0.4
	308	250 ± 37	-18.3 ± 0.9	4.1 ± 1.3	-14.1 ± 0.4

L'obtention de ces grandeurs thermodynamiques permet une interprétation plus complète des systèmes étudiés dans la mesure où les interactions électrostatiques hôte – invité sont considérées comme régies par l'enthalpie et les interactions hydrophobes par l'entropie [83]. Comme observé classiquement lors de l'analyse thermodynamique des complexes d'inclusion avec les CDs, les deux systèmes étudiés ont une enthalpie de formation favorable ( $\Delta H^\circ < 0$ ) partiellement compensée par une entropie défavorable ( $\Delta S^\circ < 0$ ). Les valeurs négatives de  $\Delta G^\circ$  et de  $\Delta H^\circ$  indiquent également que la

formation des complexes, avec la  $\gamma$ CD et la RAMEB, est un phénomène spontané et exothermique. Il est intéressant d'observer que les valeurs de  $\Delta H^\circ$  et de  $\Delta S^\circ$  sont similaires pour les deux systèmes à 288 K et se différencient avec l'augmentation de la température, ce qui peut s'expliquer par la différence de  $\Delta C_p$  d'une valeur de -304 J/mol/K avec la  $\gamma$ CD et de -25 J/mol/K avec la RAMEB. Les valeurs d'entropie d'inclusion et la plus faible capacité calorifique en présence de  $\gamma$ CD permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle la contribution des forces hydrophobes et la réorganisation des molécules d'eau est davantage présente dans ce système que dans celui en présence de RAMEB, avec laquelle la balance forces d'interactions– forces hydrophobes est différente. Il est à préciser que cette hypothèse s'affranchit de la différence de nature des CDs utilisées dans ces deux systèmes, la  $\gamma$ CD étant pure avec tous les OH libres alors que la RAMEB est un mélange de  $\beta$ CD partiellement méthylée.

#### II.1.3.2.3. Analyse des complexes par MS

Afin d'évaluer l'apport de la spectrométrie de masse à l'analyse des complexes d'inclusion impliquant le carvédilol et les cyclodextrines étudiées, l'injection par introduction directe (Flow Injection Analysis, FIA : injection automatique de 1  $\mu$ L dans un flux d' $H_2O$  à 0.2 mL/min) de mélanges aqueux CDs – carvédilol a été réalisée. L'eau a été choisie comme solvant de poussée afin de conserver une phase 100% aqueuse jusqu'à l'arrivée de la solution dans la source ESI, évitant la dissociation des complexes par l'ajout de solvant organique. Deux milieux ont été testés : l'eau pure et le tampon acétate. Afin d'augmenter la proportion de carvédilol sous forme complexée en minimisant l'effet de compétition d'ionisation, la concentration en CDs a été fixée à 10  $\mu$ M et celle du carvédilol à 5  $\mu$ M. La Figure 62 présente les courants ioniques reconstitués de la  $\beta$ CD (Figure 62, (a)), du carvédilol (Figure 62, (b)) lors de l'injection de ce mélange dans un tampon acétate 0.1 mM. Il est observable que la dispersion de l'arrivée de la  $\beta$ CD dans la source de la MS est acceptable, sur une durée de 0.1 seconde, ce qui est classique lors de l'injection d'une solution par FIA. A l'inverse, le courant ionique reconstitué du carvédilol a un profil opposé avec une détection sur les 2 min d'analyse sans aucun maximum réellement défini. Ce profil, associé à la concentration injectée permet d'exclure une éventuelle saturation et/ou pollution de la source ESI.

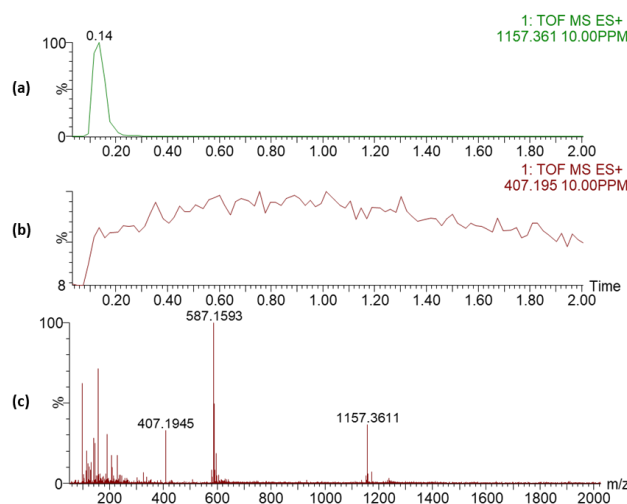


Figure 62 : Analyse en FIA-HRMS d'une solution (tampon acétate 0.1 mM, pH = 4.7) de carvedilol (5  $\mu$ M) en présence de  $\beta$ CD (10  $\mu$ M). Courant ionique reconstitué du m/z correspondant à  $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$  (a), à  $[\text{carvédilol}+\text{H}]^+$  (b). (c) Spectre HRMS (5 scans, 0.2 sec/scan) correspondant au pic à 0.14 min.

Le spectre de masse moyen issu des scans où la  $\beta$ CD est présente (pic à 0.14 min) permet d'observer les deux espèces du mélange, soit le carvedilol ( $m/z$  407.1929,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) et la  $\beta$ CD ( $m/z$  1157.3611,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), mais aucun  $m/z$  correspondant à leur association n'est visible (Figure 62, (c)). La différence d'arrivée des deux molécules dans la source d'ionisation implique qu'il n'y a pas, dans cette expérience, l'analyse d'un mélange aux proportions correspondant à la préparation ( $[\text{carvédilol}] / [\text{CD}] = 0.5$ ), le carvedilol étant donc en concentration inférieure. Prenant en compte l'hydrophobicité de cette substance active et le flux d' $\text{H}_2\text{O}$  utilisé lors de l'injection par FIA, une rétention et/ou précipitation partielle du carvedilol dans les tubulures séparant le port d'injection et la source de la MS est envisageable. Au vu de ces premiers résultats, la méthode d'injection des mélanges a été modifiée, privilégiant une infusion directe dans la source de la MS.

Les analyses par infusion en MS de mélanges carvedilol – CDs en proportion équimolaire (8  $\mu$ M) ont donc été réalisées, en tampon acétate 0.1 mM ou dans l'eau pure. La Figure 63 reprend, à titre d'exemple, les résultats obtenus lors de l'infusion du mélange carvedilol –  $\beta$ CD (tampon acétate). Comme précédemment, le courant ionique de la  $\beta$ CD et du carvedilol sont représentés, en (a) et (b) respectivement. Il est observable que cette méthode d'introduction permet l'obtention d'un courant ionique stable, pour les deux espèces constitutives du mélange, validant le choix de l'analyse par infusion. Il convient de préciser que les diminutions d'intensités observées à intervalles réguliers pour les deux espèces correspondent à la LockSpray, une référence infusée périodiquement pour corriger les éventuelles variations de mesures de masses précises.

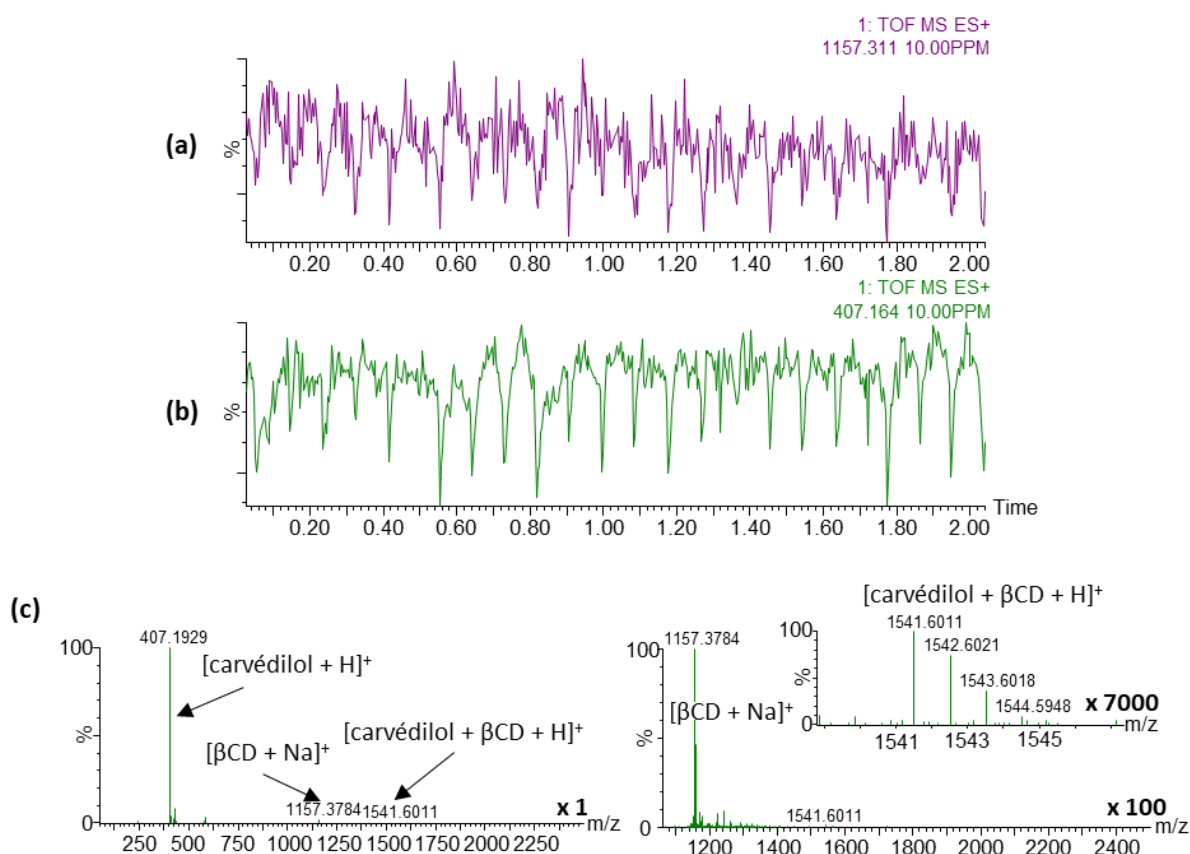


Figure 63 : Analyse HRMS par infusion d'une solution (tampon acétate 0.1 mM, pH = 4.7) de carvedilol (8  $\mu$ M) en présence de  $\beta$ CD (8  $\mu$ M). Courant ionique reconstitué du m/z correspondant à  $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$  (a) et  $[\text{carvédilol}+\text{H}]^+$  (b). (c) Spectres HRMS (200 scans, 0.2 sec/scan) à différents intervalles de m/z, annotés des facteurs d'agrandissement correspondant.

Le spectre de masse obtenu par la moyenne de 200 scans permet cette fois d'observer, malgré une faible intensité, un rapport m/z correspondant à l'association entre la  $\beta$ CD et le carvedilol (m/z 1541.6011,  $[\text{carvédilol} + \beta\text{CD} + \text{H}]^+$ ) (Figure 63, (c)). Les résultats de l'infusion des solutions de carvedilol en présence de  $\gamma$ CD ou de RAMEB en tampon acétate sont présentés Figure 64. De manière générale, il est notable que le m/z correspondant au carvedilol est fortement plus intense que ceux des CDs comme le montre les facteurs d'agrandissement indiqués sur les spectres de masse. Sachant que lors de ces expériences les CDs et le carvedilol sont en proportion équimolaires, il est possible d'en déduire que le facteur réponse en MS du carvedilol est supérieur à celui des CDs, ce qui introduit une variable supplémentaire lors de la recherche d'analyse des complexes à travers cette technique. Néanmoins, ces facteurs d'agrandissement ont ici été utilisés afin de comparer la visibilité des complexes dans toutes les solutions analysées, la concentration en carvedilol y étant identique. Reporté dans le Tableau 13, ce facteur d'agrandissement met en évidence que la RAMEB permet la meilleure visibilité des associations carvedilol-CDs, avec des valeurs inférieure à 350.

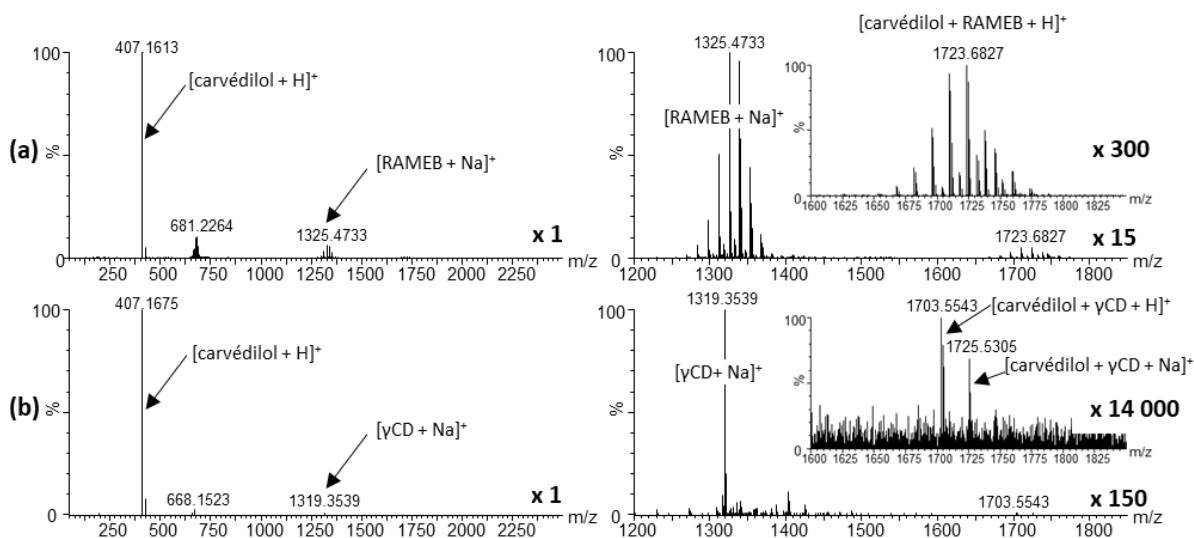


Figure 64 : Spectres HRMS (200 scans, 0.2 sec/scan) d'une solution de carvedilol (8  $\mu$ M) en présence d'une quantité équimolaire de RAMEB ou de  $\gamma$ CD (b) en tampon acétate (0.1 mM), à différents intervalles de m/z, annotés des facteurs d'agrandissement correspondant.

Afin de contrôler si les m/z correspondant aux complexes CDs-carvédilol sont réellement des complexes spécifiques ou des adduits générés en source, un témoin a été réalisé avec le maltoheptaose, l'homologue linéaire de la  $\beta$ CD. D'une part, il est notable qu'un m/z correspondant à l'association entre le maltoheptaose et le carvedilol est observé, indiquant la formation d'adduit entre le carvedilol et ce sucre linéaire. D'autre part, le facteur d'agrandissement nécessaire à l'observation de ce m/z (1350) est nettement inférieur à ceux nécessaires à l'observation d'une association entre le carvedilol et les CDs (minimum de 3500 avec l'HP $\beta$ CD), à l'exception de la RAMEB ( $\approx$ 350). Il en résulte une ambiguïté à propos de la nature des m/z observés correspondant à l'association carvedilol – CDs dans la mesure où l'hypothèse de formation d'adduits ne peut être exclue suite à l'expérience en présence de maltoheptaose.

Il est à noter que le carvedilol est majoritairement visible sous forme d'adduit  $[M + H]^+$ , les CDs sous forme  $[M + Na]^+$  et les m/z correspondant à leur association sous forme  $[CD + carvedilol + H]^+$ . La RAMEB étant la seule CD offrant une bonne visibilité de son association avec le carvedilol, une analyse par MS/MS via la sélection du m/z le plus intense (1709,  $[Me_{12}\beta CD + carvedilol + H]^+$ ) a été réalisée, générant uniquement un m/z correspondant à  $[carvédilol + H]^+$ , quelle que soit l'énergie de collision appliquée (de 5 eV à 60 eV).

Tableau 13 : Récapitulatif des résultats obtenus par analyse HRMS en infusion des mélanges équimolaires carvédilol – CDs dans l'eau ou dans un tampon acétate 0.1 mM.

Milieu	CD	Intensité carvédilol	Intensité CD	Intensité m/z correspondant au complexe	Facteur d'agrandissement pour observer le complexe
Non tamponné	β-CD	1.49E+08	2290000	26700	5843
	γCD	1.03E+08	1580000	13000	9451
	HP-β-CD	1.19E+08	2600000	32200	3696
	HP-γ-CD	1.55E+08	735000	10100	10198
	Rameb	1.56E+08	12200000	456000	327
	Maltoheptaose	2.38E+08	930000	178000	1337
Tampon acétate	β-CD	2.14E+08	2460000	30800	6850
	γCD	1.63E+08	1470000	16400	13476
	HP-β-CD	1.59E+08	2550000	48800	3258
	HP-γ-CD	2.21E+08	728000	16400	9939
	Rameb	2.11E+08	12700000	640000	334

La faible intensité des m/z correspondant à l'association CD – carvédilol, la visibilité de cette association avec le maltoheptaose et l'analyse peu informative par MS/MS mènent à conclure que la spectrométrie de masse, dans le cas du carvédilol, est une technique d'analyse peu informative pour l'analyse des complexes d'inclusion avec les CDs. La faible constante d'association déterminée et l'hydrophobicité du carvédilol permettent en partie d'expliquer ces résultats. En effet, le cas du complexe αCD-moringin reporté dans la littérature a été analysé avec succès par spectrométrie de masse (FIA), notamment grâce à la plus forte solubilité intrinsèque de ce composé (limitant les effets de rétention/précipitation), à la constante d'association plus forte ( $1300 \text{ M}^{-1}$ ) et à la présence d'une forte liaison hydrogène intermoléculaire [92]. Dans cette étude, une fragmentation spécifique du complexe d'inclusion αCD – moringin a été observée, ce qui n'est pas le cas ici avec le carvédilol ou une simple dissociation est observée.

Les analyses présentées ont permis de caractériser finement les complexes d'inclusion formés par le carvédilol et différentes CDs naturelles (βCD et γCD), et la RAMEB. D'une part, la RMN a apporté une preuve de l'inclusion du carvédilol dans la cavité de ces CDs, la stœchiométrie des complexes (1 :1) et les sites d'inclusion du carvédilol (carbazole et méthoxyphényle). D'autre part, l'ITC a confirmé la stœchiométrie de 1:1, permis l'obtention des valeurs de constantes d'inclusion moyennes avec une



erreur faible, et ajouté une caractérisation thermodynamique des complexes, mettant en évidence une différence d'interaction hôte – invité avec la  $\gamma$ CD et la RAMEB. Enfin, la spectrométrie de masse a été investiguée afin d'évaluer son intérêt dans l'analyse des complexes d'inclusion du carvédilol mais n'a pas permis l'obtention d'informations supplémentaires.

Les complexes étant caractérisés et les valeurs de constantes d'association acceptables pour une utilisation pharmaceutique, l'efficacité de la  $\gamma$ CD et de la RAMEB pour solubiliser le carvédilol à la concentration cible sur une longue durée sera investiguée. De plus, l'effet protecteur de ces CDs sera analysé en conditions photo-oxydantes, à travers une exposition à une lumière standardisée, afin d'évaluer si l'inclusion des groupements carbazole et méthoxyphényle diminue la dégradation du carvédilol en solution aqueuse.

#### II.1.4. Photostabilité en présence de $\gamma$ CD ou de RAMEB

##### II.1.4.1. Dosage de la teneur en carvédilol

Afin d'évaluer la stabilité chimique des solutions aqueuses de carvédilol à la concentration cible de 12.3 mM, en présence et en absence de CDs ( $\gamma$ CD, RAMEB), une étude de stabilité a été mise en place selon les recommandations ICH Q1A et Q2B. Les solutions en présence de CDs ont été préparées en fioles jaugées, par l'ajout de 13 mM d'HCl et de 61.5 mM de CDs (5 eq carvédilol) agités jusqu'à la solubilisation totale du carvédilol (succession d'agitation/sonication de 30 secondes). La solution témoin, en absence de CDs, a été préparée en présence de 13 mM d'HCl dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN (50/50), un solvant organique étant nécessaire à solubiliser 12.3 mM de carvédilol en absence de CDs. L'acétonitrile a été privilégié à l'éthanol ou au méthanol car c'est un solvant plus inerte qui est supposé induire moins de dégradation. Les solutions ont ensuite été placées, durant 9 mois, dans une enceinte climatique tempérée à 25°C sous exposition à une lumière standardisée (UV-Visible). Il est à noter que chaque solution a été filtrée (0.2  $\mu$ m) sous hotte stérile puis répartie dans 18 piluliers stérilisés permettant l'analyse de la solution initiale (M0) et un triplicata d'échantillon par analyse (1 mois, 2 mois, 3 mois, 6 mois et 9 mois). La Figure 65 reprend les résultats du dosage par UHPLC-UV (241 nm) du carvédilol en fonction du temps, représenté sous forme de pourcentage de la teneur initiale.

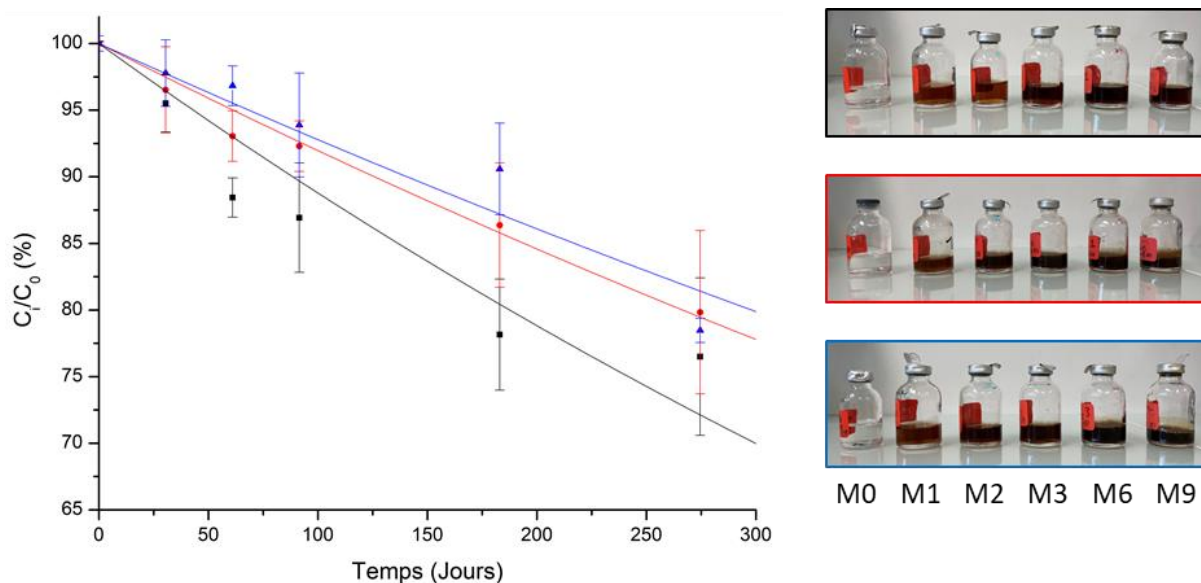


Figure 65 : Moyenne et écart-type de la quantité relative de carvedilol mesurée durant l'étude de photostabilité en condition acide (13 mM HCl) avec le mélange ACN/H<sub>2</sub>O (contrôle, noir), 61.5 mM de  $\gamma$ CD (rouge) ou 61.5 mM de Rameb (bleu). Les courbes correspondent à la regression des données expérimentales selon un modèle de cinétique de dégradation d'ordre 1. Les photographies ont été réalisées après l'analyse des échantillons au 9<sup>ème</sup> mois.

La première observation réalisée, qualitative, est l'apparition d'une coloration brune des échantillons dès le premier mois en conditions photo-exposées accompagnée d'un léger précipité dans les solutions contenant les CDs. Il est à noter que les échantillons M0, correspondant à la solution initiale (avec ou sans CD), n'a pas été mise dans la chambre climatique en stabilité et est restée incolore et limpide après 9 mois de stockage à l'abri de la lumière à température ambiante ( $23 \pm 2$  °C). L'apparition de cette coloration peut donc être attribuée à l'exposition prolongée à la lumière, pouvant induire des réactions d'oxydation [16].

Il a été reporté, lors d'une première étude de dégradation forcée, que le carvedilol est une substance active stable en milieu acide (HCl 1M) mais sensible aux milieux basiques (NaOH 1 M) et oxydants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7.5 %) [166]. Cette étude a également montré qu'une solution méthanolique de carvedilol est stable après sept jours d'exposition aux UV. Une seconde étude de photostabilité du carvedilol a été décrite, réalisée par l'exposition aux UVB de solutions éthanoliques de carvedilol en absence ou en présence de CDs ( $\beta$ CD, HP $\beta$ CD) [154]. Il est montré que les CDs étudiées ont un effet protecteur significatif après 1500 secondes d'irradiation, menant à une chute de la teneur en carvedilol de 6.5 %, 9 % et 12 % en présence de  $\beta$ CD, d'HP $\beta$ CD et en absence de CDs respectivement. Cependant, les courbes présentées montrent pour toutes les conditions une chute significative de 5 % dès 30 secondes d'exposition et l'HP $\beta$ CD ne présente plus d'effet protecteur après 3500 secondes. Au vu de ces résultats, d'une part en contradiction avec la première étude évoquée et d'autre part obtenus par l'analyse de solutions en phase organique, l'effet photo protecteur des CDs sur le carvedilol en solution semble ambiguë dans la littérature.

Dans notre cas, l'étude de photostabilité a été réalisée avec des solutions aqueuses pour lesquelles la caractérisation des complexes d'inclusion a été réalisée (HCl 13 mM), nous assurant de la présence de cet équilibre. Dans un premier temps il est observable que la regression des points, selon une cinétique de dégradation d'ordre 1 (courbes), montre que la  $\gamma$ CD et la RAMEB ont un effet protecteur sur le carvedilol en comparaison du témoin. En effet les constantes de cinétique de dégradation sont de  $119.0 \cdot 10^{-5} \text{ jours}^{-1}$ ,  $83.7 \cdot 10^{-5} \text{ jours}^{-1}$  et  $74.9 \cdot 10^{-5} \text{ jours}^{-1}$  pour la solution en absence de CDs, en présence de  $\gamma$ CD ou de RAMEB respectivement. Dans un second temps, l'observation des valeurs mesurées (points) permet de montrer que la plus forte différenciation des échantillons est apparue au sixième mois (M6, 183 jours). A ce point de cinétique, la teneur moyenne en carvedilol mesurée a chuté de 10 % en présence de RAMEB, de 14 % en présence de  $\gamma$ CD et de 22% en absence de CDs. Jusqu'au sixième mois, la stabilité du carvedilol dans les conditions étudiées a donc été significativement augmentée par la présence de CDs, et notamment de la RAMEB. Le plus fort effet protecteur de la RAMEB peut s'expliquer par la valeur de constante d'association déterminée plus haute qu'avec la  $\gamma$ CD. De plus, la présence de groupements méthyle diminue la quantité d'hydroxyle libre en comparaison de la  $\gamma$ CD, ces derniers ayant été reportés comme pouvant catalyser la dégradation de certaines substances [16,41].

Cependant, la concentration mesurée en carvedilol après 9 mois d'étude de photostabilité chute significativement en présence de RAMEB et semble se stabiliser dans la solution témoin. A l'inverse, il n'y a pas de changement de pente significatif dans les solutions contenant la  $\gamma$ CD. Il en résulte qu'après 9 mois, dans les conditions étudiées, il n'y a pas de différence significative entre les trois conditions testées et l'effet protecteur des CDs est négligeable. A titre illustratif, le chromatogramme UV-Vis présenté Figure 66 correspondant à l'analyse de la solution témoin à M9 atteste de la présence d'un grand nombre de produits de dégradation.

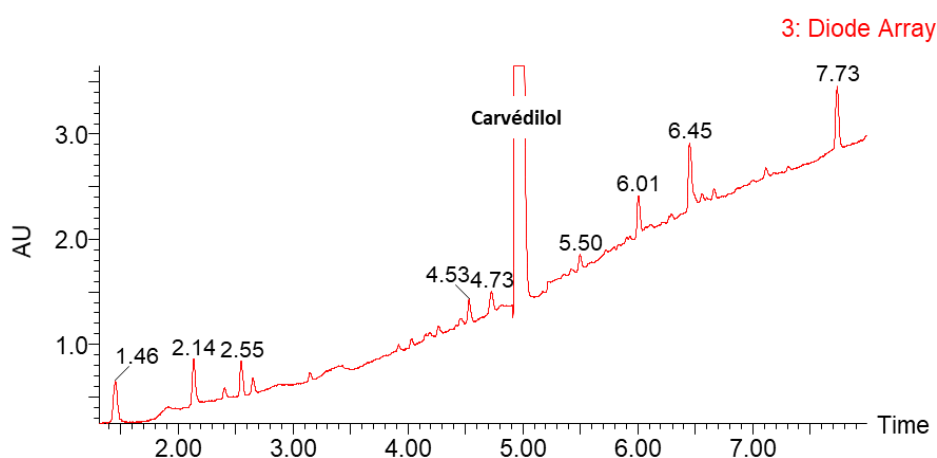


Figure 66 : Chromatogramme UV-Vis (200 – 750 nm) obtenu par l'analyse de la solution témoin de carvedilol (12.3 mM, H<sub>2</sub>O/ACN, 50/50) exposée à une lumière standardisée à 25°C pendant 9 mois.

Les résultats commentés jusqu'ici ne se basant que sur la teneur en carvédilol, l'analyse approfondie par UHPLC-UV-HRMS des solutions en présence ou en absence de CDs a ensuite été réalisée. Cette analyse des produits de dégradation permettra de caractériser au mieux ces échantillons placés 9 mois en conditions photo-exposées et d'évaluer si l'inclusion des groupements aromatiques du carvédilol et la nature des CDs influence la nature des produits générés dans les conditions étudiées.

#### II.1.4.2. Analyses des produits de dégradation (UHPLC-UV-HRMS) à M9

##### II.1.4.2.1. Analyse des phases liquide et solide

Comme évoqué précédemment, les solutions en présence de CDs contiennent un précipité dont la quantité a significativement augmenté au fur et à mesure de l'étude, alors que la solution témoin est restée limpide. La quantité de solide généré dans les différentes solutions à M9 a donc été quantifiée comme suit : 1 mL de chaque solution a été filtré sur un filtre préalablement séché sous vide 48 heures (0.2  $\mu$ m, 13 mm, PVDF). 5 mL d'air ont ensuite été injectés à travers le filtre pour éliminer les traces de liquide adsorbé avant de le sécher sous vide 48h. Les masses pesées, reportées dans le Tableau 14, attestent d'une part l'absence de solide dans la solution témoin et d'autre part une quantité de précipité largement supérieure dans la solution contenant la  $\gamma$ CD (4.9 mg) en comparaison de celle en présence de RAMEB (0.9 mg). Il est à noter que dans les deux cas, le précipité est de la même couleur brune que les solutions.

Tableau 14 : Masse de solide mesurée dans 1 mL de solution de carvédilol (HCl 13 mM) après 9 mois d'étude de photostabilité, en présence de  $\gamma$ CD, de RAMEB ou en absence de CDs (Témoin, H<sub>2</sub>O/ACN).

Echantillon	m <sub>solide</sub> (mg)
$\gamma$ CD	4.9
RAMEB	0.9
Témoin (H <sub>2</sub> O/ACN)	0

La présence d'une quantité de solide significativement différente dans les trois conditions étudiées associée à une teneur en carvédilol similaire impose différentes préparations d'échantillons afin d'observer tous les composés et d'attribuer à quelle phase ils appartiennent. C'est pourquoi, trois préparations distinctes ont été réalisées :

- ① : Analyse de la fraction soluble : Les solutions ont été simplement filtrées (1 mL, 0.2 $\mu$ m, 13 mm, PVDF), correspondant à la préparation réalisée pour le dosage du carvédilol.
- ② : Analyse de l'ensemble de l'échantillon : Les solution aqueuses ont été lyophilisées puis reprises dans un volume équivalent de DMSO, menant à l'obtention de solutions limpides pour les trois

échantillons. La comparaison des résultats avec ceux obtenus par l'analyse des échantillons préparés par le protocole ① permettra de déterminer en partie la composition de la phase solide.

- ③ : Analyse du solide, fraction insoluble à l'eau : 1 mL de chaque solution a été prélevé puis centrifugé. Après le retrait du surnageant, le solide a été lavé avec 4 mL d'eau (4\*1mL séparés par centrifugation/retrait du surnageant). Séché sous vide 24h, le solide ( $m_{\gamma\text{CD}} = 2.3 \text{ mg}$  ;  $m_{\text{RAMEB}} < 1 \text{ mg}$ ) a ensuite été repris dans 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Ce lavage permet de s'assurer que le solide recueilli ait été rincé de la solution initiale adsorbée.

Il est à noter qu'une nouvelle fois et dans ces conditions, la quantité de solide pesée est nettement supérieure en présence de  $\gamma\text{CD}$ . Les analyses de solide de la solution témoin n'ont pas été réalisées car aucun dépôt n'a été observé lors de sa centrifugation, en accord avec les mesures lors de la pesée sur filtre (Tableau 14).

Dans un premier temps, l'analyse des liquides (protocole ① et ②) a été réalisée. Comme observé sur la Figure 67, les profils chromatographiques UV-Visible sont similaires, d'une part en présence ou en absence de CDs et d'autre part selon la méthode de préparation de l'échantillon. A l'exception de certains pics, de nombreux produits de dégradation sont élués à des temps de rétention identiques dans les trois échantillons. Globalement, la solution en présence de  $\gamma\text{CD}$  possède un nombre de produits de dégradation inférieur aux autres conditions, notamment par l'absence de certains pics aux temps de rétention inférieurs à celui du carvédilol (5 min) et à 7.7 min. Des variations de hauteurs relatives des pics en fonction de la méthode de préparation sont également constatées, indiquant que les précipités observés correspondent à des produits partiellement solubles dans les solutions aqueuses en présence de CDs.

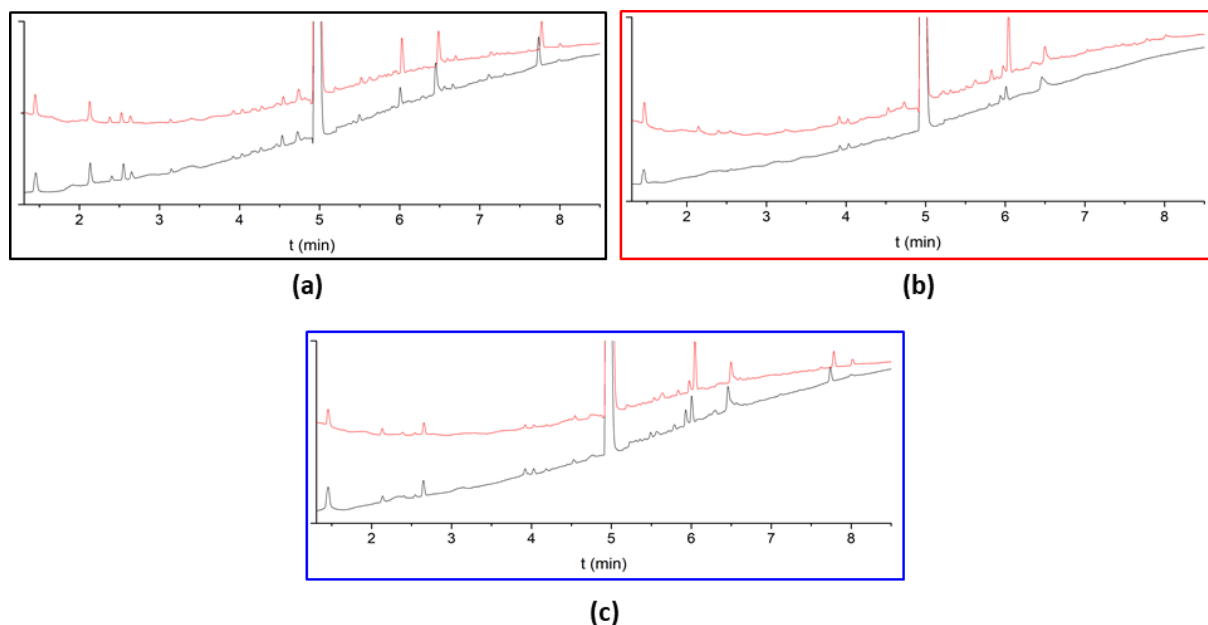


Figure 67 : Superposition des chromatogrammes UV-Vis (200-750 nm) des échantillons exposés à une lumière standardisée à 25°C durant 9 mois (témoin (a);  $\gamma$ CD (b); RAMEB (c)). Les échantillons ont été préalablement filtrés (①, courbes noires) ou entièrement solubilisé dans le DMSO après lyophilisation (②, courbes rouges).

Le couplage UHPLC-UV-HRMS permet de s'assurer, par la mesure de la masse précise, que les composés élués aux mêmes temps de rétention dans les différents échantillons sont identiques. Pour davantage de lisibilité, la Figure 68 reprend les valeurs d'intégration (chromatogramme UV-Vis, PDA) et les m/z des pics observés, dans les différents échantillons pour les deux méthodes de préparation. D'une part, les m/z correspondant aux pics communs observés en UV-Vis sont identiques dans tous les échantillons, confirmant ainsi qu'il s'agit des mêmes composés. D'autre part, la tendance générale est une augmentation de la valeur d'intégration de certains produits de dégradation lors de la solubilisation complète des échantillons avec le DMSO. Particulièrement, le produit de dégradation élué à 6 min (m/z 602.23,  $[M+H]^+$ ) est le composé dont la variation d'intégration est la plus importante en fonction de la méthode de préparation, il correspond également au produit de dégradation majoritaire. A titre indicatif, les aires mesurées de ce composé sont comprises entre 3.5 % ( $\gamma$ CD, ②) et 1.5 % (RAMEB, ①) de l'aire du carvédilol. Étonnement, l'aire de ce composé augmente également dans la solution témoin dans l'échantillon repris dans le DMSO, signifiant soit qu'il est partiellement adsorbé sur le filtre lors de la filtration (PVDF), soit qu'une fraction insoluble non visible est présente.

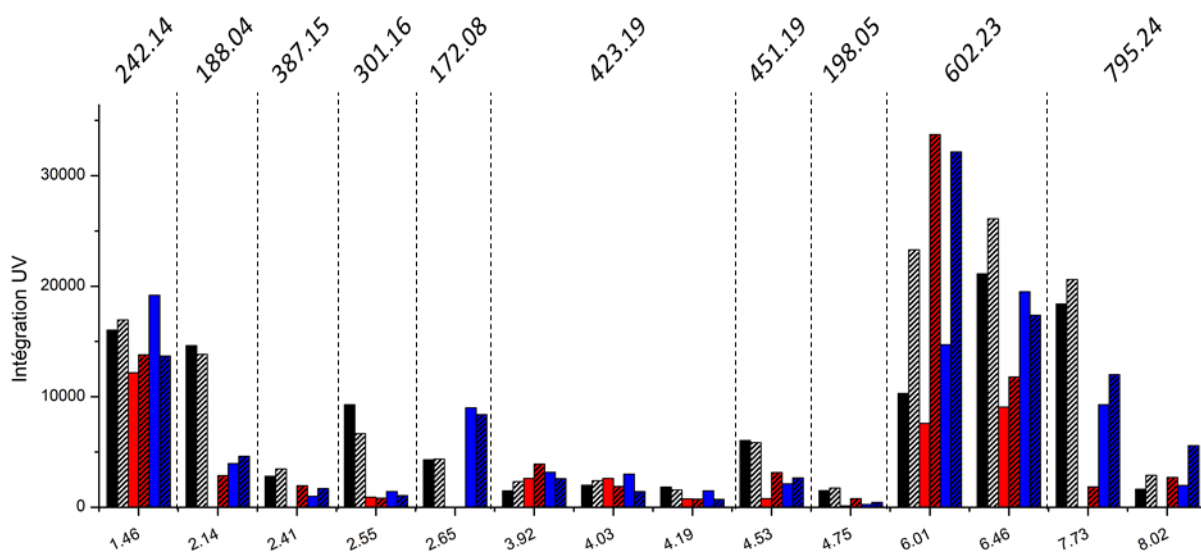


Figure 68 : Intégration des pics observés en UV-Vis (200 – 750 nm) dans les solutions de carvedilol exposées à la lumière standardisée à 25°C durant 9 mois en absence de CDs (noir) ou en présence de  $\gamma$ CD (rouge) ou de Rameb (bleu). Les intégrations représentées sans hachures correspondent aux filtrats des solutions (①, fraction soluble) et celle hachurées aux échantillons lyophilisés puis repris dans le DMSO (②, fraction soluble + précipité). En abscisse sont indiqués les temps de rétention (bas) et les m/z correspondant (haut).

Malgré la variation du facteur réponse des composés élués, dépendant de leur structure, quatre produits de dégradation semblent être en plus grande quantité. Le composé le plus polaire, élué à 1.46 min (m/z 242.14) est en quantité similaire dans tous les échantillons et semble être totalement soluble en phase aqueuse. Le composé discuté précédemment, élué à 6.01 min et un isomère à 6.46 min (m/z 602.23) semblent peu solubles en phase aqueuse, particulièrement dans la solution contenant la  $\gamma$ CD. Enfin le composé élué à 7.73 min est en plus grande quantité dans la solution témoin et absent dans la solution contenant la  $\gamma$ CD.

La diversité et la nature des produits de dégradation visibles sur les chromatogrammes UV-Vis semblent donc similaires dans les trois échantillons, en nombre et en quantité moins importante dans la solution en présence de  $\gamma$ CD. L'autre similitude est la coloration brune des solutions, visible dès le premier mois et accentuée avec le temps d'exposition. L'utilisation d'un détecteur à barrette de diodes permet de reconstruire le chromatogramme aux longueurs d'onde du visible afin de déterminer les produits de dégradation responsables d'une coloration. La Figure 69 (a) correspond à la reconstruction du chromatogramme issu de la solution témoin aux longueurs d'onde 400 – 750 nm. La visualisation de nombreux pics sur cette reconstruction souligne la présence de plusieurs composés responsables de la coloration de cette solution, notamment les isomères de m/z 602.23. Le spectre UV-Vis du composé élué à 6.02 min a été extrait, mettant en évidence une large bande d'absorption comprise entre 350 nm et 550 nm, en accord avec la teinte des solutions (Figure 69, (b)). Sachant que ces composés sont également présents dans les solutions en présence de CDs, les chromatogrammes reconstitués (400 – 750 nm) sont similaires. Il est à noter que tous ces composés absorbant dans le

visible possèdent une bande d'absorption large ( $\lambda_{\max} = 400 \pm 50$  nm), menant à penser qu'un groupement similaire est responsable de cette absorption. Enfin, cette reconstruction du chromatogramme met également en évidence qu'un composé plus polaire que le carvedilol ( $t_r = 4.74$  min) au faible  $m/z$  de 198.0548 absorbe dans le visible.

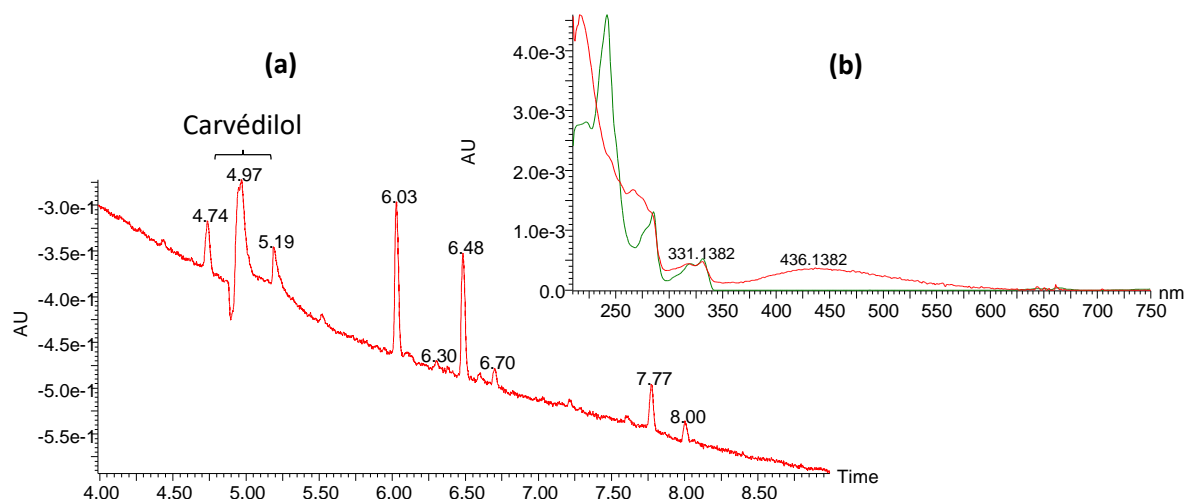


Figure 69 : (a) Chromatogramme reconstitué aux longueurs d'onde du visible (400 – 750 nm) de la solution de carvedilol exposée à une lumière standardisée à 25°C durant 9 mois en absence de CDs. L'élution correspondant à la fenêtre de temps de rétention du carvedilol a été dirigée vers la poubelle pour éviter la saturation de la source ESI, le résidu de carvedilol est observable à 4.97 min. (b) Superposition des spectres UV-Vis (250 – 750 nm) correspondant au composé élué à 6.03 min (rouge) et au carvedilol (vert).

Dans un second temps, l'analyse des solides isolés issus des solutions en présence de CDs a été réalisée (protocoles ③). La Figure 70 présente les chromatogrammes UV-Vis obtenus par l'analyse de ces solutions. Avant toute interprétation, il convient de préciser que la préparation des solutions mères par le protocole ③ mène à des concentrations en précipité de 23 mg/mL ( $\gamma$ CD) et d'environ 5 mg/mL (RAMEB). La dilution effectuée avant l'analyse par MS a été déterminée expérimentalement afin d'observer au mieux les composés en évitant de saturer la source de l'appareil, menant à des concentrations en précipité de 0.3 mg/mL ( $\gamma$ CD) et de 2.4 mg/mL (RAMEB). Il en résulte que l'échantillon contenant le précipité de la solution de RAMEB est 7 fois plus concentré que celui de la solution de  $\gamma$ CD. Cette différence de concentration implique donc que la visibilité des produits de dégradation de la solution de RAMEB est augmentée d'un facteur 7 en comparaison de celle de la solution de  $\gamma$ CD.



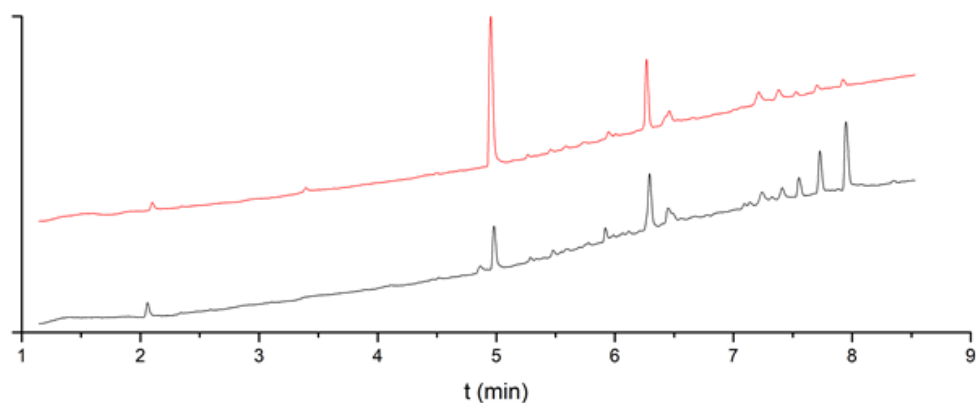


Figure 70 : Chromatogrammes UV-Vis (200 – 750 nm) correspondant aux précipités observés dans les solutions de carvédilol en présence de  $\gamma$ CD (rouge) et de RAMEB (noir) après 9 mois d'exposition à une lumière standardisée à 25°C. Le solide prélevé a été lavé à l'aide d'eau milliQ. Les profils obtenus lors du lavage au cyclohexane sont similaires.

Il est notable que malgré une plus faible concentration, la quantité de carvédilol est nettement supérieure dans la solution de  $\gamma$ CD, indiquant qu'une part non négligeable du solide observé correspond au carvédilol. Sachant que la solution M0 est restée limpide après 9 mois stockée à l'abri de la lumière, cette précipitation du carvédilol est attribuable à l'exposition prolongée à la lumière.

Cette expérience a également pour objectif de déterminer si les CDs ont précipité avec le temps. Les reconstitutions des courants ioniques des CDs et du carvédilol sont présentées Figure 71. D'une part, le carvédilol est moins intense dans l'échantillon issu de la solution en présence de RAMEB ( $4.79 \cdot 10^5$ ) que dans celle en présence de  $\gamma$ CD ( $1.56 \cdot 10^6$ ), en adéquation avec les chromatogrammes UV-Vis. D'autre part, il est notable que la RAMEB est absente de l'échantillon (ou en très faible quantité et se confond avec la ligne de base). A l'inverse, la  $\gamma$ CD est présente dans la phase solide ( $t_r = 0.54$  min) malgré 4 lavages à l'eau, indiquant sa précipitation avec le temps sous forme libre ou complexée (avec le carvédilol ou les produits de dégradation). Cette observation permet également d'expliquer la quantité de solide pesée sur le filtre, de 4.9 mg/mL, comprenant donc également la  $\gamma$ CD.

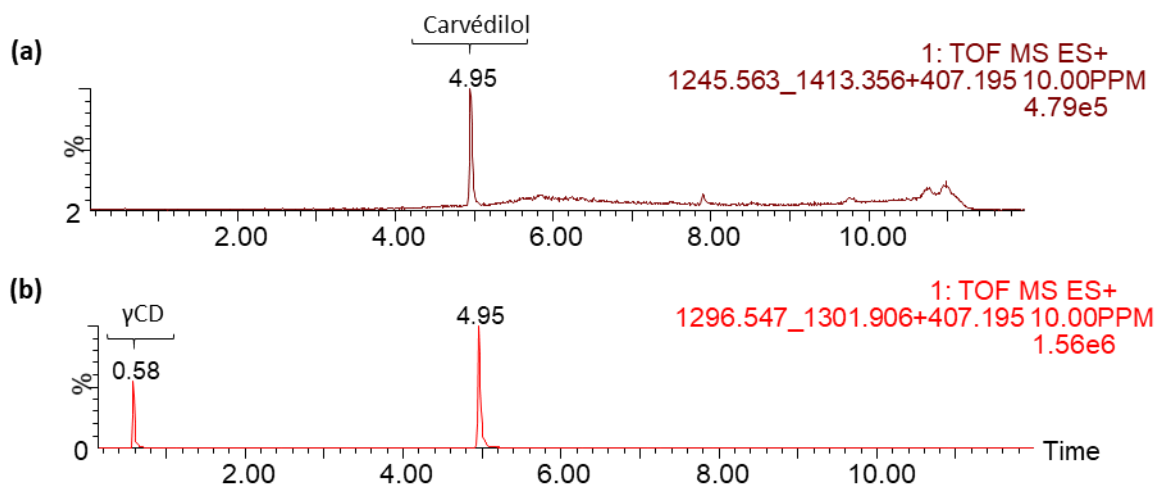


Figure 71 : Chromatogrammes RIC des  $m/z$  (CDs + carvédilol) dans les précipités observés dans les solutions de carvédilol en présence de RAMEB (a) et de  $\gamma$ CD (b) après 9 mois d'exposition à une lumière standardisée à 25°C. Le solide prélevé a été lavé d'eau milliQ.

La concentration de 61.5 mM étant largement inférieure à la solubilité aqueuse de cette CD (179 mM), et les lavages réalisés à l'eau, il est envisageable que la formation d'un ou plusieurs complexes insolubles soient responsables de cette précipitation. Cependant, au vu du nombre de produits de dégradation, il n'est pas possible de déterminer quel composé est responsable de la formation d'un tel objet.

Il en résulte, d'après l'ensemble de ces analyses, que malgré une teneur en carvédilol similaire après 9 mois en enceinte climatique photo-exposée, la composition des échantillons diffère en certains points en fonction de l'absence ou la présence de CDs et de leur nature. Tout d'abord, un précipité est présent dans les solutions aqueuses contenant les CDs et absent de la solution témoin. De nombreux produits de dégradation sont communs aux trois échantillons, dont certains observés comme partiellement solubles dans les solutions en présence de CDs. Les composés concernés par l'augmentation de la valeur de leurs aires lors de l'analyse par UHPLC en phase inverse des solutions reprises dans le DMSO ont un temps de rétention supérieur au carvédilol, supposant une plus faible polarité. De plus, cette augmentation d'aire est davantage marquée dans la solution de  $\gamma$ CD, notamment pour le composé discuté élué à 6.02 min. Ces observations pourraient indiquer la présence d'un effet solubilisant des CDs sur les produits de dégradation du carvédilol peu solubles et générés dans les conditions étudiées. L'observation de la  $\gamma$ CD dans le solide analysé pourrait également indiquer la formation d'un complexe insoluble avec un ou plusieurs produits de dégradation, alors que l'absence de RAMEB dans le solide correspondant indiquerait l'inverse. Enfin, le carvédilol est en quantité majoritaire dans le précipité issu de la solution de  $\gamma$ CD, et inversement, les produits de dégradation sont majoritaires dans le solide généré dans la solution de RAMEB. Cette dernière observation implique que la précipitation du

complexe  $\gamma$ CD – carvédilol est une hypothèse qui ne peut être exclue, appuyée par les diagrammes de solubilité réalisés précédemment.

Avec l'objectif de comprendre le changement d'allure des courbes de solubilité obtenues entre le 6<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> mois d'étude de photostabilité observé sur la Figure 65, l'hypothèse suivante peut être formulée sur la base des observations précédentes : La chute de la teneur en carvédilol dans la solution en présence de RAMEB peut s'expliquer par l'augmentation progressive de la quantité de produits de dégradation, partiellement solubilisés par la RAMEB. Il s'en suit un nombre important de composés en solution, induisant potentiellement de nouveaux équilibres avec les CDs, jusqu'à un déplacement des équilibres engendrant la précipitation du carvédilol et un effet protecteur moins efficace. Suivant cette hypothèse, la constante d'association du carvédilol avec la  $\gamma$ CD ( $225 \text{ M}^{-1}$ ) étant plus faible qu'avec la RAMEB ( $317 \text{ M}^{-1}$ ), cette compétition peut avoir un effet plus fort sur la précipitation du carvédilol dans la solution de  $\gamma$ CD.

Cette discussion est basée sur la teneur en carvédilol, les différences et les ressemblances des produits de dégradation, mais leur nature n'a pas été discutée dans un premier temps pour davantage de clarté. Afin de terminer cette étude de photostabilité du carvédilol en présence ou en absence de CDs ( $\gamma$ CD, RAMEB), l'identification de la nature des produits de dégradation par UHPLC-HRMS a donc été développée.

#### II.1.4.2.2. Identification des masses et hypothèses de structures des produits de dégradation

La spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie liquide est la technique d'analyse idéale pour déterminer la nature des composés contenus dans un mélange complexe. Particulièrement dans le cas de l'analyse de produits de dégradation (DP), la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) peut apporter des informations à propos de la position des modifications apportées sur la molécule dégradée. La Figure 72 reprend les spectres de fragmentation MS/MS du carvédilol ( $[M+H]^+$ ) réalisés à deux énergies de collision, utile pour déterminer les principaux sites de coupures et les fragments caractéristiques de cette structure. Le spectre réalisé en mode négatif ( $[M-H]^-$ ) n'est pas représenté en raison de la faible quantité d'informations que cette fragmentation génère, redondantes avec le mode positif. Néanmoins, la correspondance de l'ensemble des fragments obtenus dans les deux modes d'ionisation est schématiquement représentée sur la Figure 72 (c), mettant en évidence des fragments caractéristiques telles que la perte du groupement carbazole hydroxylé ( $m/z$  224.1283) ou du méthoxyphényle hydroxylé ( $m/z$  283.1454). Il est également notable que cette structure génère un grand nombre de fragments correspondant à différents sites de coupures le long de la chaîne aliphatique, permettant d'envisager la position de modifications portées par les produits de dégradation.

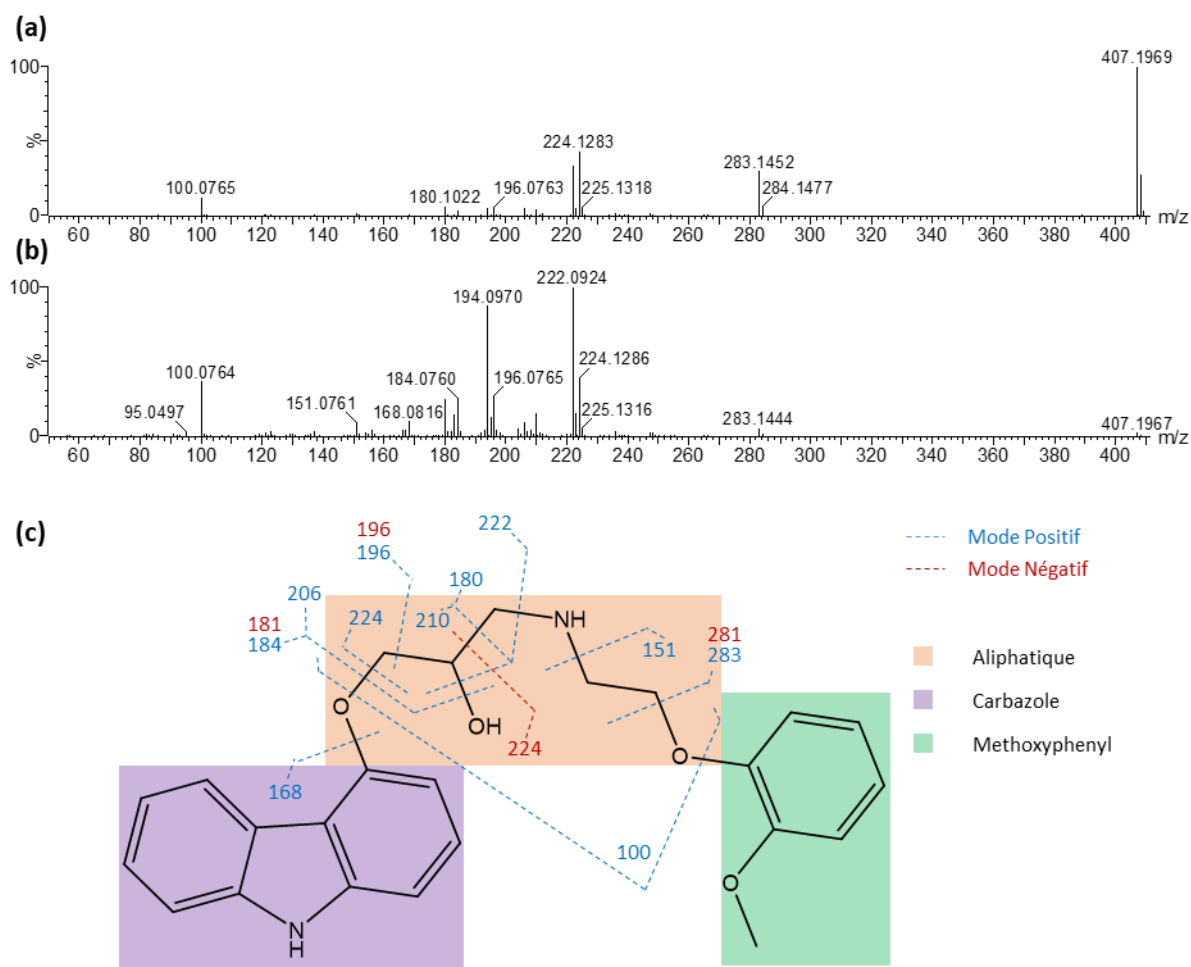


Figure 72 : Spectre de fragmentation MS/MS de l'ion  $[\text{carvédilol} + \text{H}]^+$  obtenu à une énergie de collision (EC) de 20 eV (a) et de 30 eV (b). (c) Schéma représentatif des fragments observés sur les spectres MS/MS obtenus en mode positif et négatif.

Afin de déterminer les structures des principaux produits de dégradation discutés précédemment et repris par la Figure 68, la mesure de masse précise permet dans un premier temps de proposer des formules brutes, par comparaison avec la masse exacte théorique. Le Tableau 15 reprend les m/z mesurés mis en comparaison avec les m/z théoriques de formules brutes en adéquation avec les constituants des solutions analysées (carvédilol, H<sub>2</sub>O, HCl, CDs).

Tableau 15 : Masses précises mesurées de certains produits de dégradation associées aux propositions de masses exactes théoriques et des formules brutes correspondantes

Produit de dégradation (DP)	Temps de rétention (min)	m/z expérimental	m/z théorique	$\Delta$ (ppm)	$\Delta$ (mDa)	Formule brute proposée	Excès de masse relatif*
<b>Carvédilol</b>	4.95	407.1972	407.1971	0.2	0.1	$C_{24}H_{27}N_2O_4^+$	1.00
<b>1</b>	1.46	242.1401	242.1387	5.8	1.4	$C_{12}H_{20}NO_4^+$	1.19
<b>2**</b>	2.14	188.0359	188.0348	5.8	1.1	$C_{10}H_6NO_3^+$	0.39
<b>3**</b>	2.41	387.1541	387.1556	-3.9	-1.5	$C_{20}H_{23}N_2O_6^+$	0.82
<b>4</b>	2.55	301.1557	301.1552	1.7	0.5	$C_{17}H_{21}N_2O_3^+$	1.07
<b>5**</b>	2.65	172.0764	172.0762	1.2	0.2	$C_{11}H_{10}NO^+$	0.92
<b>6</b>	3.92	423.1915	423.1920	-1.2	-0.5	$C_{24}H_{27}N_2O_5^+$	0.93
<b>7</b>	4.03						
<b>8</b>	4.19						
<b>9</b>	4.53	451.1865	451.1869	-0.9	-0.4	$C_{25}H_{27}N_2O_6^+$	0.85
<b>10</b>	4.75	198.0548	198.0555	-3.5	-0.7	$C_{12}H_8NO_2^+$	0.57
<b>11</b>	6.01	602.2291	602.2291	0.0	0	$C_{36}H_{32}N_3O_6^+$	0.79
<b>12</b>	6.46						
<b>13**</b>	7.73	795.2415	795.2431	-2.0	-1.6	$C_{46}H_{36}N_4O_8Na^+$	0.69***
<b>14**</b>	8.02						

\* L'excès de masse a été défini comme étant le rapport de la partie décimale sur la masse précise mesurée. Les valeurs indiquées sont relatives à l'excès de masse du carvédilol afin de faciliter leur lisibilité.

\*\* Produits de dégradation dont seules les formules brutes proposées ont été obtenues, les spectres de fragmentation n'étant pas informatifs et les formules développées difficilement déterminables.

\*\*\* Correspondant à un adduit sodium, la masse précise a été corrigée pour simuler le m/z de l'adduit  $[M+H]^+$  afin de permettre la comparaison de l'excès de masse avec celui du carvédilol :  $[M+Na]^+ (795.2415) - [Na]^+ (22.9898) + [H]^+ (1.0075)$ .

Le produit élué à 1.46 min (m/z 242.14, DP1) correspond, d'après la mesure de masse précise à la perte du groupement carbazole. Le spectre MS/MS de ce produit de dégradation, commun et en quantité voisine dans tous les échantillons, est représenté Figure 73 (a). Il est notable que l'ensemble des fragments générés sont communs à ceux observés lors de la fragmentation du carvédilol, confirmant ainsi la proposition de formule développée correspondant à la perte du groupement carbazole. Le second produit de dégradation issu de la simple rupture d'une liaison du carvédilol est l'ion de m/z 301.16 (tr = 2.55 min, DP4) dont la formule brute indique la perte du groupement méthoxyphényle, confirmée par la fragmentation MS/MS (Figure 73 (b)). Il est notable que ce DP4 est significativement

moins présent dans les solutions en présence de CDs, indiquant potentiellement un effet protecteur de son inclusion dans la cavité des CDs étudiées (Figure 68).

La mesure de masse précise apporte également des informations à propos des proportions carbone / hydrogène / oxygène / azote, à travers l'observation de l'excès de masse mesuré. Pour davantage de lisibilité d'interprétation, les excès de masse des produits de dégradation ont été normalisés sur celui du carvédilol (Tableau 15). Il est notable qu'à l'exception des deux produits de dégradation correspondant aux simples pertes des groupements aromatiques, l'excès de masse des produits de dégradation est inférieur à celui du carvédilol. Cette observation est un indicateur (dans le cas de molécules ne possédant que des C, H, N et O) d'une augmentation du nombre d'oxygène et/ou d'insaturations en comparaison du carvédilol. Dans le cas des DP1 et DP4, le plus haut excès de masse est expliqué par la perte de groupements aromatiques et donc d'insaturations, augmentant en terme de proportion le nombre d'hydrogènes de la structure.

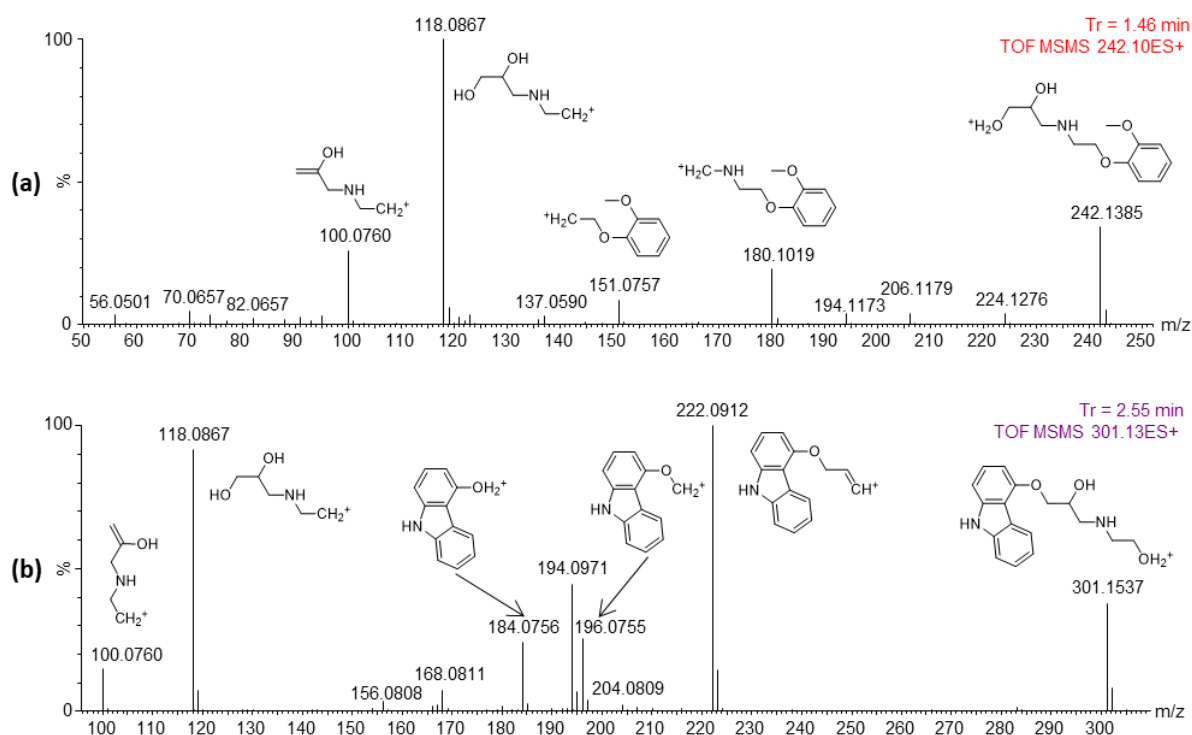
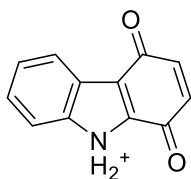


Figure 73 : (a) Spectre MS/MS annoté du DP1 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  242.14,  $EC = 20$  eV). (b) Spectre MS/MS annoté du DP4 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  301.16,  $EC = 20$  eV).

L'observation du DP1 implique la présence du groupement carbazole dans les solutions étudiées, mais ce dernier n'a pas été détecté lors de ces analyses. L'hypothèse de la dégradation de ce groupement libre peut alors être formulée, liée aux conditions de l'étude de stabilité (pH acide, exposition à la lumière). Parmi les produits de dégradation observés, le DP10 ( $m/z$  198.05 ;  $tr = 4.75$  min) serait en accord avec une formule brute correspondant au groupement carbazole oxydé (Schéma 14). Il est remarquable que le temps de rétention de cette molécule, voisin de celui du carvédilol, est

particulièrement long en comparaison de sa taille. Un tel temps de rétention est cohérent avec la littérature qui rapporte que le 4-hydroxyxcarbazole est davantage retenu par HPLC sur phase stationnaire inverse que le carvédilol [167].



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>  
Exact Mass: 198.0550

Schéma 14 : Proposition de formule développée du DP10 ([M+H]<sup>+</sup>, m/z 198.05)

Comme observé précédemment sur la Figure 69, ce produit de dégradation fait partie des constituants du mélange générant une absorption dans le visible, envisageable par la modification de la conjugaison liée à l'ajout des deux groupements cétone. Il est reporté que ce composé possède un pic d'absorbance à 401 nm dans l'éthanol, confirmant l'augmentation de la longueur d'onde d'absorption du groupement carbazole par l'ajout des deux fonctions cétone [168].

Les DP6, DP7 et DP8 sont des isomères (m/z 423.19, tr = 3.92 ; 4.03 ; 4.19 min) dont la formule brute s'accorde avec une hydroxylation du carvédilol. Pour ces trois isomères, les spectres de fragmentation MS/MS sont similaires et permettent de conclure que l'hydroxylation se situe sur le groupement carbazole (Figure 74 (a), (b) et (c)). En effet, des fragments caractéristiques du carvédilol de la partie aliphatique et de la perte du groupement méthoxyphényle sont présents sur l'ensemble des spectres MS/MS. A l'inverse, les fragments caractéristiques du groupement carbazole ont un m/z plus grand d'une valeur de 15.9948 et mettent en évidence l'ajout d'un oxygène sur ce groupement.



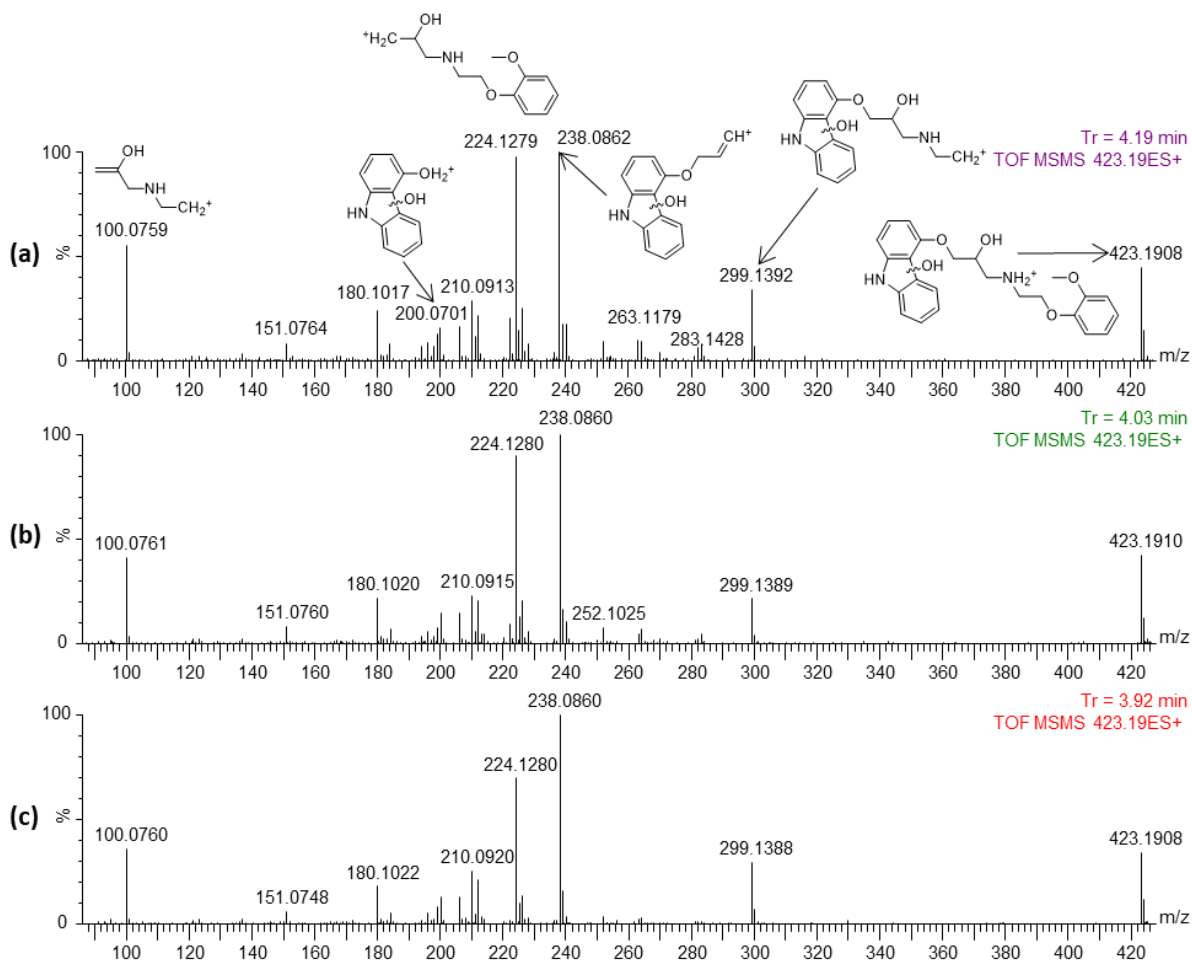


Figure 74 : Spectres MS/MS des isomères du carvédilol mono-hydroxylé. (a) Spectre MS/MS annoté du DP8 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  423.19,  $EC = 25$  eV). (b) Spectre MS/MS annoté du DP7 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  423.19,  $EC = 25$  eV). (c) Spectre MS/MS annoté du DP6 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  423.19,  $EC = 25$  eV).

Les DP11 et DP12 ( $m/z$  602.2291 ;  $tr = 6.01$  ;  $6.46$  min) discutés précédemment comme étant les produits de dégradation majoritaires dans les trois solutions étudiées sont des isomères. Ils présentent comme le DP10 une absorption dans le visible, ont été définis comme en partie responsables de la coloration des solutions et identifiés comme appartenant aux précipités présents dans les solutions en présence de CDs. La masse précise mesurée est en accord avec l'hypothèse de l'ajout du DP10 sur le carvédilol, concordant avec cette absorption dans le visible. Les spectres MS/MS de ces deux isomères sont similaires et présentent des fragments communs au carvédilol, seules les intensités des fragments diffèrent entre ces deux isomères (Figure 75 (a) et (b)). En effet, les fragments de la chaîne aliphatique et la perte du groupement méthoxyphényle sont identifiés, indiquant une nouvelle fois que la modification chimique se porte sur le groupement carbazole. De plus, l'ensemble des fragments correspondant à la partie carbazole du carvédilol voient leur  $m/z$  augmenté de  $C_{12}H_5NO_2$ , confirmant l'ajout d'un groupement de la même formule brute que le DP10 sur le carbazole.

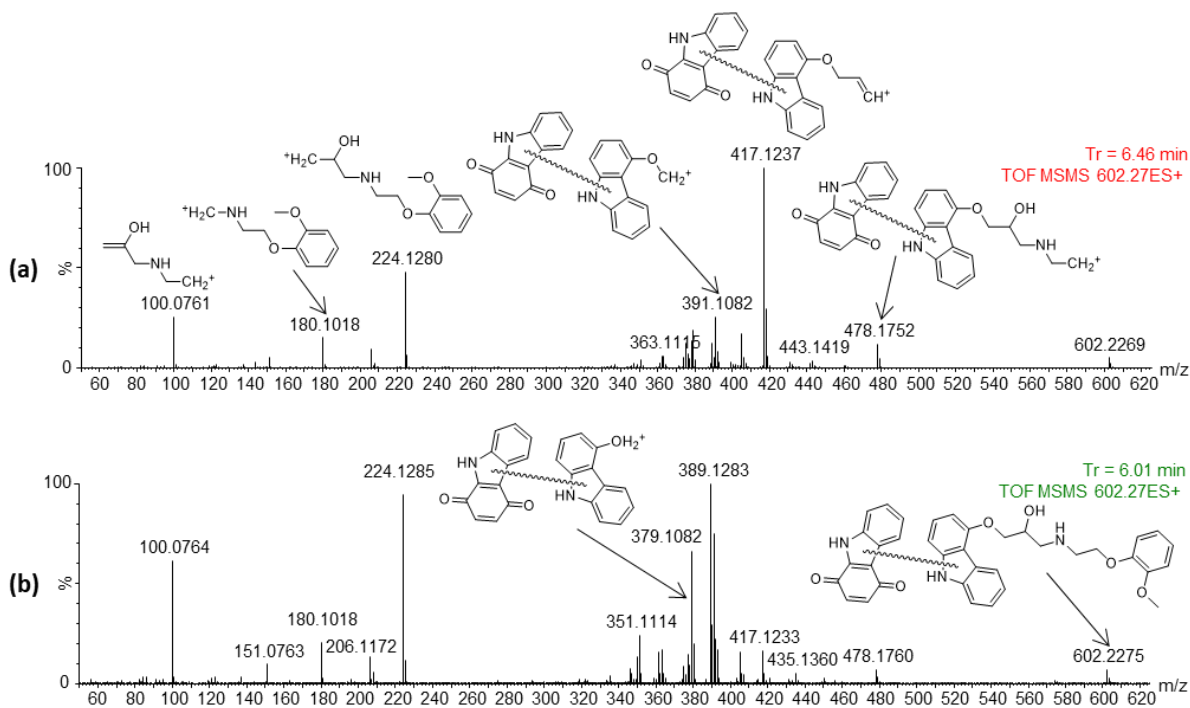


Figure 75 : (a) Spectre MS/MS annoté du DP12 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  602.23,  $EC = 35$  eV). (b) Spectre MS/MS annoté du DP11 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  602.23,  $EC = 35$  eV).

Parmi les autres produits de dégradation observés, les mesures de masses précises des DP2, DP3, DP5, DP13 et DP14 mènent à des propositions de formules brutes difficilement interprétables. En effet, les DP2 et DP5 ( $m/z$  188.04 et 172.08) sont des molécules de petite taille au nombre d'insaturations élevé, limitant les possibilités d'écriture de formules développées et ne générant que peu d'ions lors de la fragmentation MS/MS, probablement en raison d'une forte conjugaison.

Le DP3 ( $m/z$  387.15) génère, lors de sa fragmentation, des ions caractéristiques du carvédilol, correspondant à la chaîne aliphatique et au groupement méthoxyphényle (Figure 76). Cette analyse permet de mettre en évidence que la dégradation est située sur le groupement carbazole, qui d'après la mesure de masse précise, aurait  $C_8H_4NO_3$  comme formule brute. Une nouvelle fois, ce groupement est plus petit et oxydé que le groupement carbazole et les analyses réalisées n'ont pas permis d'approfondir sa caractérisation.

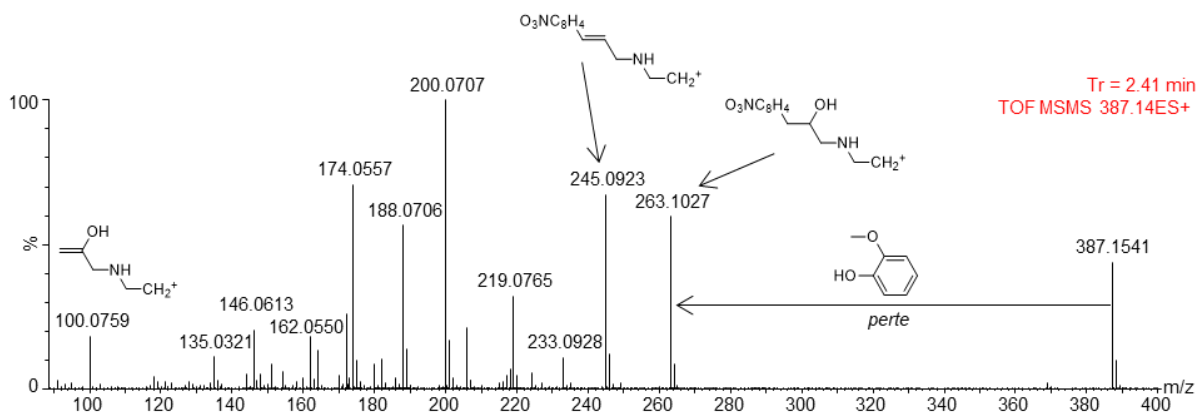


Figure 76 : Spectre MS/MS annoté du DP3 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  387.15,  $EC = 25$  eV). La différence de masse précise entre l'ion parent (387.154) et le fragment 263.1027 correspond à la perte de neutre du groupement méthoxyphényle du carvédilol.

Les DP13 et 14 ( $m/z$  795.24) sont détectés comme étant des ions isobares mais leur fragmentation MS/MS diffère (Figure 77 (a) et (b)). Le DP13 ( $tr = 7.73$  min) détecté sous forme d'adduit sodium ne génère qu'un ion au  $m/z$  de 409.1154 qui, le considérant comme un adduit sodium également, serait en adéquation avec la perte d'un neutre de masse 386.1261, correspondant alors à  $M/2$  de cet adduit  $[M+Na]^+$  du DP13. La fragmentation MS/MS du DP14 ( $tr = 8.02$  min) est plus informative dans la mesure où un fragment caractéristique du carvédilol est observé, au  $m/z$  de 224.1279. Néanmoins, ces informations ne permettent pas de déterminer la structure de ce/ces produits de dégradation, sur lesquels la dégradation du carvédilol semble être une nouvelle fois située sur le groupement carbazole.

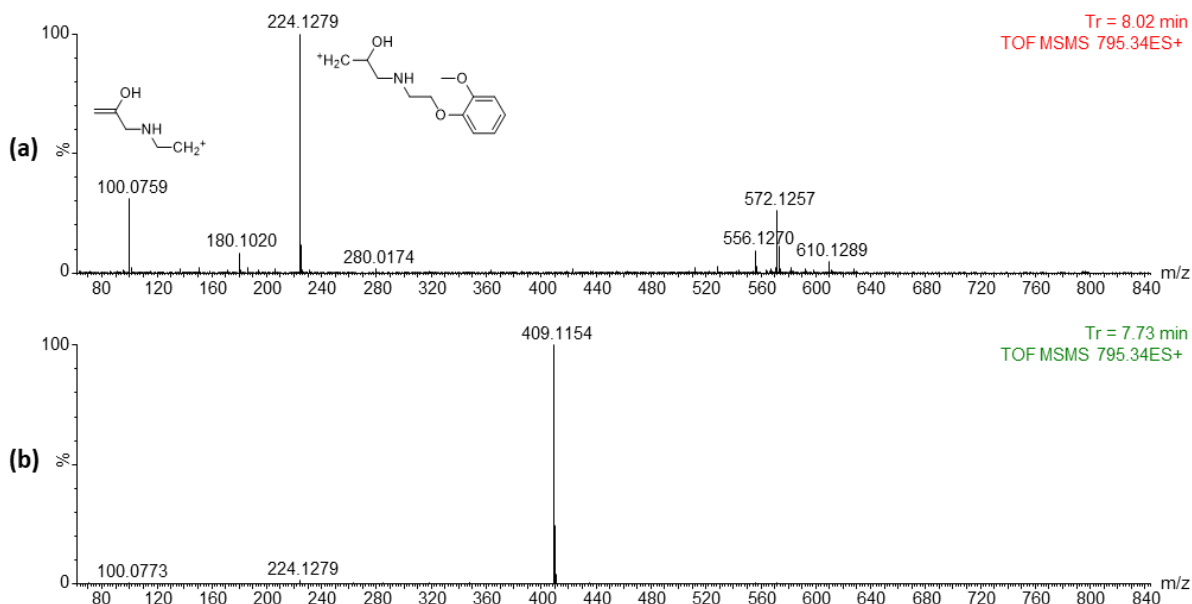


Figure 77 : (a) Spectre MS/MS annoté du DP14 ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  795.24,  $EC = 40$  eV). (a) Spectre MS/MS annoté du DP13 ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  795.24,  $EC = 40$  eV).

Enfin, le DP9 ( $m/z = 451.19$ ,  $tr = 4.53$  min) a également été défini comme étant un dérivé oxydé du carvédilol. La fragmentation MS/MS de ce produit de dégradation permet d'identifier le site de modification chimique, situé sur ou à proximité du groupement carbazole (Figure 78). Néanmoins, les

mesures de masses précises correspondant à l'ajout de CO<sub>2</sub> sur la structure, la détermination de la formule développée n'a pu être déterminée.

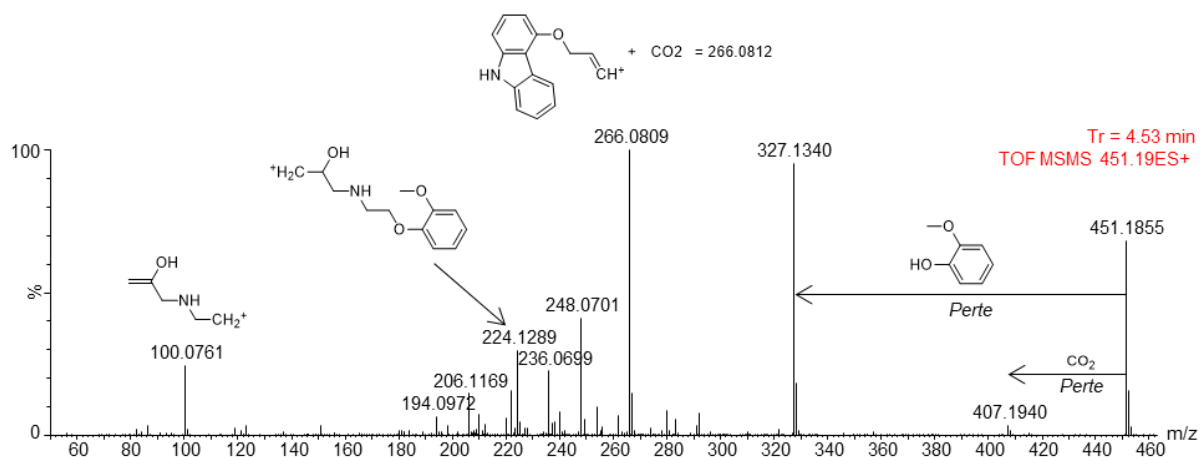


Figure 78 : (a) Spectre MS/MS annoté du DP9 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  451.19,  $EC = 25$  eV). La différence de masse précise entre l'ion parent (451.1855) et les fragments 407.1940 et 327.1340 correspondent respectivement à la perte des neutres CO<sub>2</sub> et méthoxyphényle.

L'analyse de ces produits de dégradation ayant été réalisée après 9 mois d'étude de photostabilité, la structure de certaines molécules pourrait correspondre à des sous-produits de dégradation. D'une part, la présence du DP1 en quantité importante et l'absence du groupement carbazole libre semble indiquer que ce dernier est rapidement modifié par les conditions d'exposition. D'autre part, l'observation de produits de dégradation ayant une masse significativement plus grande que celle du carvédilol (DP11, 12, 13 et 14) indique qu'une première étape de coupure a lieu suivie d'une seconde étape de formation entre le produit généré et le carvédilol. Les isomères de  $m/z$  602.23 illustrent cette formation de produits de dégradation, leur structure pouvant correspondre à l'ajout d'un groupement carbazole (préalablement modifié ou non) sur le carvédilol. Il est notable que l'ensemble des modifications chimiques sont localisées sur le groupement carbazole, en présence ou en absence de CDs.

### II.1.5. Conclusion

La comparaison systématique de l' $\alpha$ CD, la  $\beta$ CD, la  $\gamma$ CD, l'HP $\beta$ CD, l'HP $\gamma$ CD et de la RAMEB en concentration identique de 10 mM dans différents milieux a permis d'obtenir une vision globale de l'efficacité des CDs et des données homogènes sur la solubilisation du carvédilol en milieu aqueux. Ces données ont mis en évidence une dépendance de l'efficacité des CDs selon le milieu. En effet, la  $\gamma$ CD et l'HP $\gamma$ CD ont montré un effet solubilisant plus fort que la  $\beta$ CD et l'HP $\beta$ CD dans l'eau pure, le tampon acétate et HCl alors que l'inverse est observé en tampon citrate. Le pH des tampon acétate et citrate étant identique, cette comparaison met en évidence la présence d'interactions différentes uniquement liée à la nature du tampon utilisé, soulignant l'importance d'étudier différents milieux. Cette observation peut notamment expliquer en partie la disparité des informations de solubilité issues de la littérature. Il est évident que la concentration cible fixée en carvédilol (12.3 mM), nécessaire à une posologie admissible chez l'enfant, n'est atteignable par les CDs que par l'ionisation du carvédilol à pH acide. Parmi les milieux étudiés, HCl apparaît comme étant le plus efficace, notamment grâce à la cinétique de dissolution particulière du carvédilol dans ce milieu. L'ajout d'HCl à hauteur de la molarité du carvédilol en suspension dans une solution de CDs, concentrée à un rapport molaire de 5 pour 1, permet la solubilisation totale et rapide du carvédilol concentré à 12.3 mM. La stabilité de cette solution est dépendante de la nature des CDs utilisées, la RAMEB ayant montré une plus haute efficacité en terme de conservation d'une solution limpide, suivi de l'HP $\gamma$ CD et de la  $\gamma$ CD. Avec l'objectif de l'application d'une nouvelle formulation orale de carvédilol, la  $\gamma$ CD a été davantage étudiée en raison de son autorisation dans la Pharmacopée européenne. De façon plus fondamentale, les études en présence de RAMEB ont également été approfondies, ce dérivé de la  $\beta$ CD étant la CD la plus efficace quel que soit le milieu étudié.

Les associations entre le carvédilol et la  $\gamma$ CD ou la RAMEB (approximées par la DIMEB) observées par DOSY ont été déterminées comme étant des complexes d'inclusion, sur la base d'expériences RMN montrant des variations de déplacements chimiques spécifiques des protons situés à l'intérieur de la cavité des CDs. Les expériences RMN ROESY ont permis de démontrer la proximité des groupements cycliques du carvédilol avec l'intérieur de la cavité des CDs, démontrant que la variation des déplacements chimiques observée est due à la proximité des H des CDs avec le carvédilol. Cette expérience a également mis en évidence que les deux groupements aromatiques du carvédilol, soit les groupements carbazole et méthoxyphényle, sont inclus dans la  $\gamma$ CD et la DIMEB. Etant séparés par une chaîne aliphatique, ces deux groupements ne peuvent être inclus qu'à l'intérieur de deux molécules de CDs, menant à une interrogation concernant la stœchiométrie du ou des complexes formés, d'une valeur de 1:1 ou de 2:1 (CD:carvédilol). La stœchiométrie a été déterminée de 1:1 grâce à l'expérience de Job mais également par différentes expériences de titration réalisées par ITC, l'obtention de cette

même information par deux approches confortant cette stœchiométrie. Deux complexes d'inclusion coexistent donc, par l'inclusion du groupement carbazole ou du groupement méthoxyphényle. Il a été remarqué que la variation de déplacements chimiques de certains protons du carvédilol observée lors de l'expérience de Job présente des allures particulières, indiquant la présence d'un ou plusieurs équilibres tiers. L'observation d'une variation du paramètre observé par RMN  $^1\text{H}$  ou par ITC lors de l'analyse de solutions de carvédilol à différentes concentrations a mené à l'hypothèse que cet équilibre correspond à une auto-association du carvédilol. L'expérience DOSY a néanmoins montré une faible augmentation de la taille de cet objet en comparaison du carvédilol à l'état libre et isolé, menant à l'hypothèse de la formation d'un dimère de carvédilol avec l'augmentation de sa concentration, pouvant être en partie responsable de sa faible solubilité en milieu aqueux.

Les constantes d'association du carvédilol avec la  $\gamma\text{CD}$  et la RAMEB ont été déterminées avec précision par ITC, respectivement à  $225 \pm 30 \text{ M}^{-1}$  et  $317 \pm 47 \text{ M}^{-1}$ , grâce à un protocole d'analyse approprié à l'analyse des complexes d'inclusion qui sont régis par des constantes modérées. Enfin, la photostabilité du carvédilol en présence ou en absence de  $\gamma\text{CD}$  ou de RAMEB a été évaluée en milieu HCl. Il est apparu un effet protecteur entre le 1<sup>er</sup> et le 6<sup>ème</sup> mois d'exposition, davantage prononcé en présence de RAMEB, en accord avec les constantes d'association déterminées. Néanmoins, cet effet protecteur n'est plus visible au 9<sup>ème</sup> mois d'exposition, menant à l'hypothèse selon laquelle les produits de dégradation générés et partiellement solubilisés par les CDs induisent des équilibres d'inclusion supplémentaires en compétition avec le carvédilol. Les produits de dégradation générés sont très majoritairement des modifications chimiques de la partie carbazole, le produit de dégradation majoritaire étant une addition d'un groupement carbazole di-oxygéné sur le carvédilol. Enfin, il est notable que les CDs étudiées ont un effet protecteur sur l'hydrolyse de la partie méthoxyphényle, observée dans la solution témoin et en quantité moindre en présence de CDs.

Enfin, l'utilisation de la quantité en CDs nécessaire à solubiliser le carvédilol (5 équivalents) est en faveur d'une augmentation de la biodisponibilité de cette substance active lors de son administration par voie orale. La dissociation aisée du complexe par dilution après ingestion, liée aux constantes d'association modérées est également un paramètre en faveur de cette augmentation de la biodisponibilité. L'obtention d'une solution aqueuse, dans un milieu acceptable pour cette voie d'administration avec ces proportions de CDs représente donc un moyen intéressant pour la mise au point d'une nouvelle formulation liquide de carvédilol à destination pédiatrique.



## II.2. Mise en place d'une approche de caractérisation des mélanges de dérivés de CDs

### II.2.1. Introduction

La caractérisation des mélanges de CDs est peu décrite dans la littérature ou se limite à la détermination du degré de substitution (DS) moyen. Afin de pouvoir appréhender ou rationaliser les différents effets qui découlent de l'utilisation de ces mélanges, une caractérisation plus précise est nécessaire. En effet, Holm *et coll.* ont mis en évidence des différences de constantes d'association de l'ordre de  $2000 \text{ M}^{-1}$  entre l'acide glycodeoxycholate et deux lots de Me $\beta$ CD au DS moyen similaire [120]. Cette différence ne peut s'expliquer que par une composition différente, qui n'est pas détectée par la seule utilisation du DS comme descripteur. Le développement de méthodes de chromatographie liquide en phase inverse, réalisé par Elfakir *et coll.* pour l'analyse de différents Me $\beta$ CD, permet grâce au couplage à la spectrométrie de masse d'apprécier la complexité de ces mélanges [130]. En effet, la reconstitution des courants ioniques de chaque DS met en évidence la présence de nombreux isomères, dont les temps de rétention sont étendus. L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse représente aujourd'hui l'approche analytique offrant la meilleure description des mélanges complexes de dérivés de CDs.

La mobilité ionique est une technique séparative qui a montré une bonne capacité à discriminer les isomères grâce à une différenciation en fonction de la taille et la forme des ions générés dans la source ESI [169,170]. Cette technique a déjà été utilisée afin de discriminer des oligosaccharides ou des disaccharides [171–173]. De plus, le temps de dérive des ions, analogue au temps de rétention en chromatographie liquide, est proportionnel à leur section efficace de collision (CCS) [105]. Cette grandeur intrinsèque offre la possibilité de comparer les CCS expérimentales avec celles calculées théoriquement à partir de modèles moléculaires [174].

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'apport de cette technique séparative sur la caractérisation de CDs en mélange. Pour ce faire, un couplage UHPLC-IMS-HRMS sera utilisé pour la mise en place d'une approche permettant d'augmenter la quantité d'informations atteignable expérimentalement lors de l'analyse de mélanges, sans étape de purification. Dans ce cadre, un mélange de dérivés obtenus par l'ouverture du *cis*-époxyde d'oléate de méthyle par le  $\beta$ CD servira de modèle. Ce mélange constitue un cas idéal afin d'étudier les différences expérimentales observables dans la mesure où il est composé de 12 isomères de DS1, couvrant ainsi toute les régioisoméries et stéréochimies envisageables par cette réaction. De plus, l'oléate de méthyle greffé représente un groupement volumineux, susceptible de mettre en exergue les différences conformationnelles entre chaque isomère. Afin d'étudier les différences conformationnelles entre ces isomères et d'obtenir leurs CCS théoriques, leur modélisation



moléculaire sera réalisée. Enfin, la validation des résultats obtenus sera effectuée avec l'objectif de pouvoir appliquer cette approche pour d'autres mélanges de dérivés de CDs

## II.2.2. Etude expérimentale par le couplage UHPLC-IMS-MS/HRMS

### II.2.2.1. Le modèle des Lip $\beta$ CD

Une synthèse de dérivés amphiphiles de CDs (les lipidyl cyclodextrines, LipCD) a été précédemment développée au laboratoire dans le cadre des travaux de recherche d'Estefania Oliva [175]. Réalisée par une voie de synthèse non sélective, cette synthèse mène à l'obtention de mélanges de différents DS contenant de nombreux isomères. Cette synthèse, one-pot, est réalisée dans un broyeur à billes vibrationnel, sans solvant et en condition acide ( $H_2SO_4$ ), par l'ajout d'une CD ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\alpha$ CD, HP $\beta$ CD ou HP $\gamma$ CD) et de l'époxyde d'oléate de méthyle. Les rendements obtenus, compris entre 28% ( $\gamma$ CD) et 55% ( $\beta$ CD), sont considérés comme bons [176]. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur la caractérisation de ce mélange reproductible de dérivés amphiphiles de la  $\beta$ CD, nommés les Lip $\beta$ CD (Schéma 15).

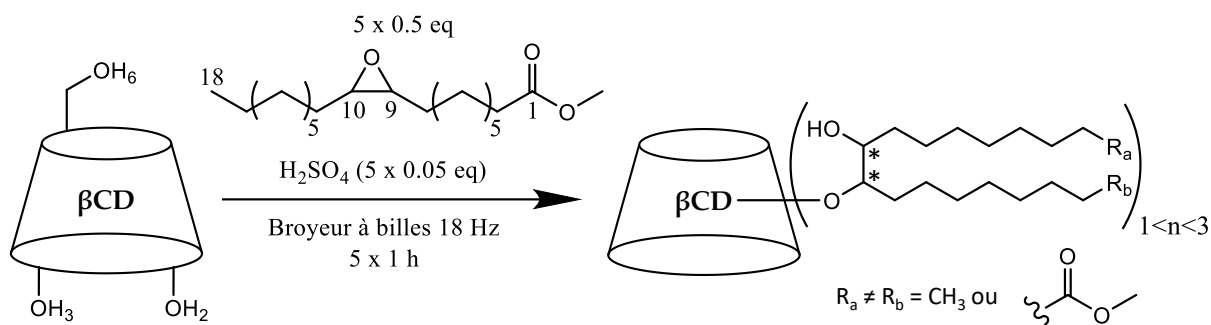


Schéma 15 : Schéma réactionnel de la formation des Lip $\beta$ CD par la réaction entre la  $\beta$ CD et l'époxyde d'oléate de méthyle réalisée dans un broyeur à billes en condition acide.

Après une purification sur chromatographie flash destinée à éliminer la  $\beta$ CD n'ayant pas réagi, l'analyse de ce produit par spectrométrie de masse (MS) par infusion a été réalisée. Le spectre de masse obtenu montre la présence d'un taux de greffage allant jusqu'à 3 oléates de méthyle portés par la  $\beta$ CD (Figure 79). Cette analyse permet, via la mesure des intensités absolues des ions correspondant aux différents DS de calculer le DS moyen du mélange, déterminé à 1.4. Il est à noter que des petites variations de DS calculés sont observées en fonction du mode d'ionisation de la MS [176].

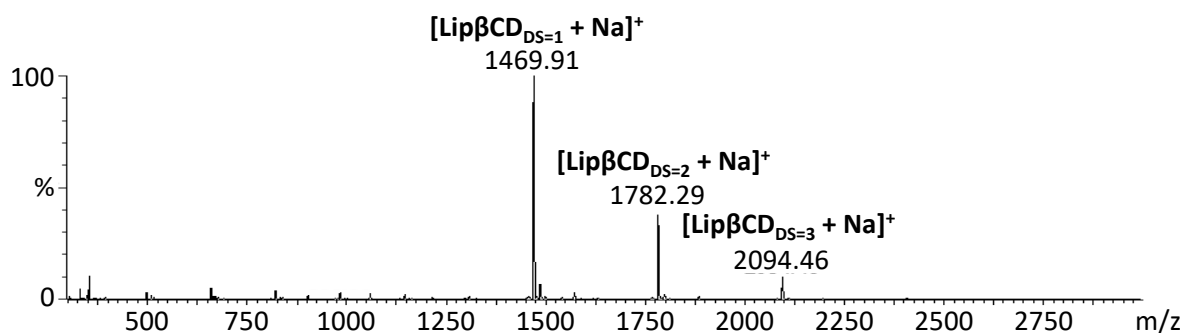


Figure 79 : Spectre MS obtenus par infusion du produit de synthèse après purification sur chromatographie flash. Les DS1, DS2 et DS3 sont observés sous forme d'adduit  $[M+Na]^+$ .

### II.2.2.2. Chromatographie liquide (UHPLC)

L'analyse par chromatographie liquide en phase inverse, sur une colonne C8, permet d'observer la complexité du mélange obtenu, le courant ionique reconstitué (RIC) de chaque DS comprenant une grande quantité d'isomères. Cette méthode chromatographique offre une séparation appréciable des isomères de DS=1, mais un nombre d'isomères de DS supérieur associé à un caractère apolaire davantage marqué rend leur séparation plus délicate (Figure 80). Les DS1 seront donc exploités dans ce chapitre, afin de déterminer si leur caractérisation est réalisable sans étape préalable de purification.

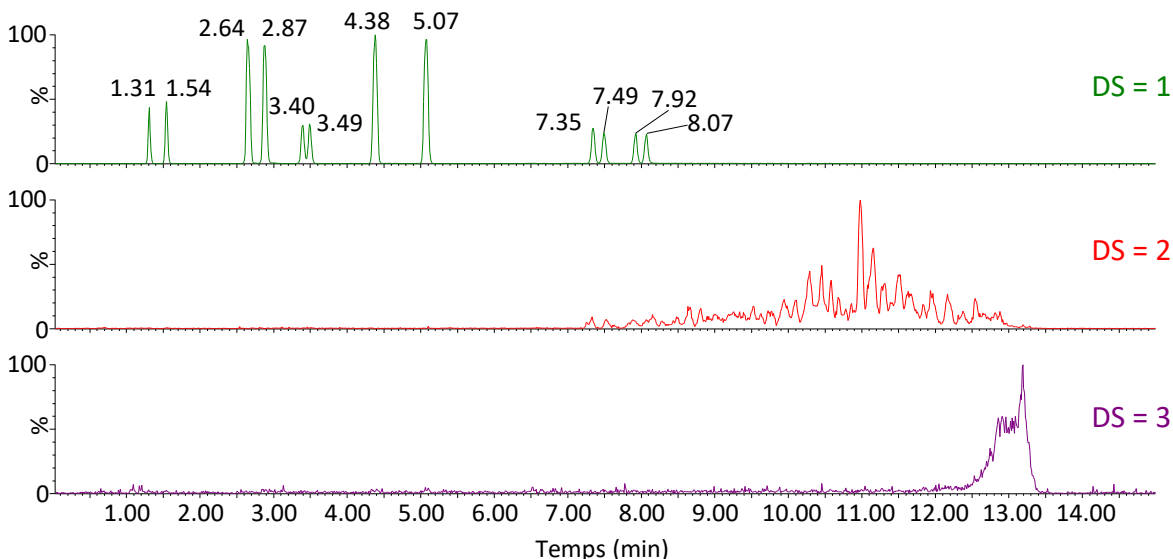


Figure 80 : Courants ioniques reconstitués (RIC)  $[M+Na]^+$  du DS1 ( $m/z$  1469.63), DS2 ( $m/z$  1781.89) et DS3 ( $m/z$  2094.16) extrait de l'analyse du produit réactionnel par chromatographie liquide en phase inverse (C8). Conditions : Débit 0.4 mL/min; Température 40°C ; gradient H<sub>2</sub>O:MeOH 60:40 (0 min), 20:80 (10 min), 0:100 (12 min), 0:100 (15 min), 60:40 (16 min), 60:40 (20 min).

Le RIC des DS1 permet l'observation de 12 pics chromatographiques, menant à la conclusion que cette réaction n'est ni régiosélective ni stéréosélective. En effet, au regard des possibilités réactionnelles des réactifs utilisés, le nombre de 12 isomères correspond au greffage sur les 3 hydroxyles de la  $\beta$ CD (OH2,

OH3 et OH6), aux 2 positions portant l'époxyde sur l'oléate de méthyle (C9 et C10) et aux 2 orientations de l'ouverture de l'époxyde (100 % sous forme cis) par les hydroxyles de la  $\beta$ CD (Figure 81). En accord avec ces 12 possibilités, la nomenclature attribuée de ces produits est reprise dans le Tableau 16.

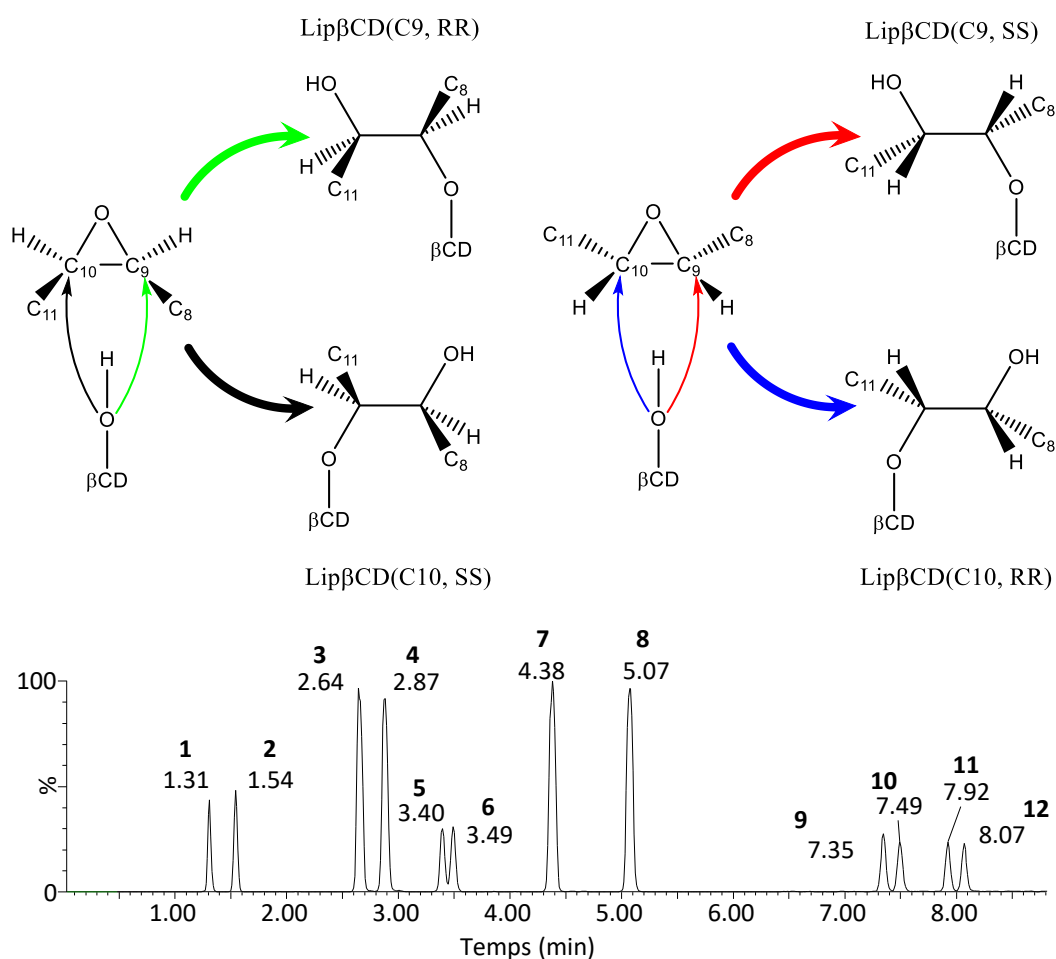


Figure 81 : (Haut) Schématisation générale de l'ouverture de l'époxyde d'oléate de méthyle par le  $\beta$ CD, menant à 12 isomères par l'implication des trois hydroxyles libres de la  $\beta$ CD. (Bas) RIC des DS1 annoté des numéros d'isomères, correspondant à l'ordre de leur élution dans ces conditions chromatographiques.

Tableau 16 : Nomenclature des 12 isomères de DS1 de Lip $\beta$ CD.

		Position de greffage sur la $\beta$ CD		
		OH2	OH3	OH6
Position de greffage sur l'oléate de méthyle	C9	Lip $\beta$ CD(OH2, C9, RR)	Lip $\beta$ CD(OH3, C9, RR)	Lip $\beta$ CD(OH6, C9, RR)
	C9	Lip $\beta$ CD(OH2, C9, SS)	Lip $\beta$ CD(OH3, C9, SS)	Lip $\beta$ CD(OH6, C9, SS)
Position de greffage sur l'oléate de méthyle	C10	Lip $\beta$ CD(OH2, C10, RR)	Lip $\beta$ CD(OH3, C10, RR)	Lip $\beta$ CD(OH6, C10, RR)
	C10	Lip $\beta$ CD(OH2, C10, SS)	Lip $\beta$ CD(OH3, C10, SS)	Lip $\beta$ CD(OH6, C10, SS)

Il est remarquable que l'obtention de ces 12 isomères indique que les trois positions de la  $\beta$ CD ont réagi, dont l'hydroxyle OH3 malgré sa faible réactivité. Les positions OH2, les plus acides, ont également réagi alors que des conditions défavorables ont été employées (conditions acides). Ces

informations mettent en évidence la difficulté d'assignation des pics chromatographiques à une structure d'isomère, la réactivité dans le broyeur à billes sans solvant étant donc peu conventionnelle. Cependant, les pics chromatographiques montrent une différence d'intensité selon l'isomère observé, indiquant une différence de réactivité. Considérant le facteur réponse de ces composés comme étant identique, 4 isomères (**3**, **4**, **7** et **8**) semblent être en quantité supérieure alors que les 8 autres sont en quantité similaire (**1**, **2**, **5**, **6**, **9**, **10**, **11** et **12**).

### II.2.2.3. La fragmentation MS/HRMS

Afin d'essayer de différencier ces isomères, leur fragmentation par MS/MS a été réalisée à travers la sélection de l'adduit majoritaire, correspondant au  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  1469.696). Cette technique permet de fragmenter l'ion sélectionné par collision avec un gaz neutre, ici de l'hélium. L'énergie de collision optimale a été expérimentalement déterminée à 95 eV, permettant d'observer un maximum d'ions fragments tout en conservant l'ion parent sélectionné visible. La fragmentation MS/MS peut s'avérer utile pour différencier les isomères de position, notamment si les fragments générés sont caractéristiques et différenciants d'une position de greffage. Il est à noter qu'une séparation chromatographique des isomères de DS1 est intéressante pour la mise en place de cette analyse dans la mesure où aucune co-élution n'est observée. En effet la sélection d'un  $m/z$ , identique dans le cas d'isomères, est une limite lors de l'analyse MS/MS d'isomères s'ils ne sont pas correctement séparés en amont de la MS. Les spectres MS/MS obtenus n'ont montré aucun fragment caractéristique, les ions fragments générés étant tous communs aux 12 isomères de DS1. Toutefois, on peut constater des différences d'intensités entre certains spectres (Figure 82 (a)) alors que d'autres sont identiques. A titre illustratif, la Figure 82 (b) regroupe les spectres MS/MS obtenus par la fragmentation des ions correspondant aux isomères **1**, **2**, **5** et **6**, mettant en évidence l'obtention de spectres identiques pour ces 4 isomères.

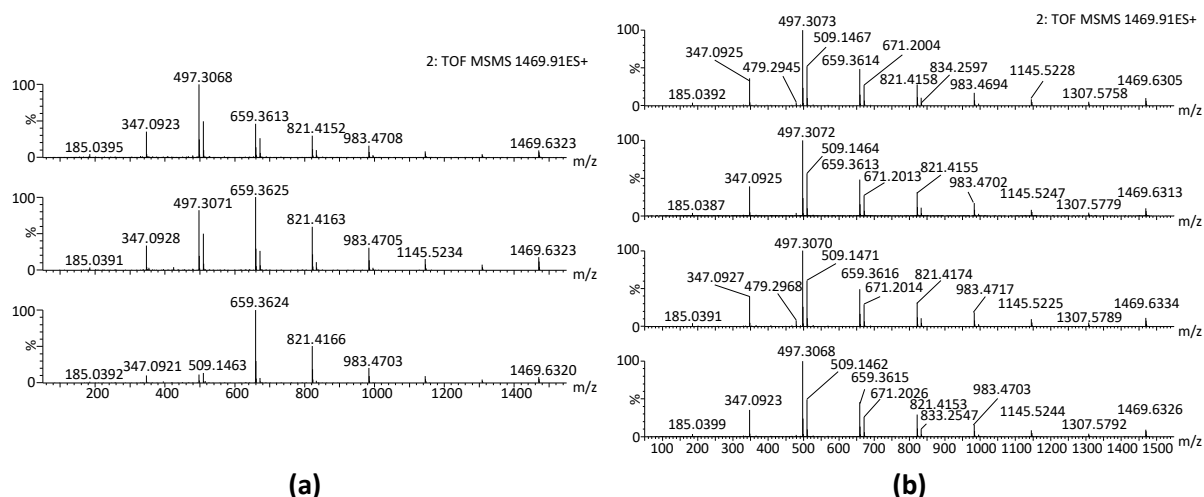


Figure 82 : (a) Spectres MS/MS des isomères **9**, **4** et **1** (de bas en haut). (b) Spectres MS/MS des isomères **1**, **2**, **5** et **6** (de bas en haut).

Cette observation a également été réalisée pour les isomères **3**, **4**, **7** et **8** ainsi que pour les isomères **9**, **10**, **11** et **12**. Malgré l'absence d'ions caractéristiques et différenciants, l'intensité des ions générés est donc variable selon les isomères analysés, autorisant un regroupement des isomères. L'observation de 3 groupes suppose, au regard des possibilités réactionnelles à l'origine des 12 isomères, qu'ils correspondent aux 3 positions de greffage de l'oléate de méthyle sur la  $\beta$ CD.

Suite à cette observation, la comparaison de ces 12 spectres MS/MS a été réalisée par une analyse en composantes principales (ACP), un outil d'analyse statistique, descriptif et non supervisé, utilisé pour la comparaison simultanée de plusieurs spectres expérimentaux (RMN  $^1\text{H}$ , IR, etc..) [177]. Pour la réalisation de cette ACP, les échantillons correspondent aux 12 isomères et les variables aux intensités des fragments communs observés sur les spectres MS/MS. Un prétraitement de l'intensité des ions utilisé a été réalisé, selon l'Équation 9.

Équation 9 : Prétraitement de la valeur des intensités des ions fragments.

$$I_{\text{fragment}} \rightarrow \log\left(\frac{I_{\text{fragment}}}{I_{\text{parent}}}\right)$$

Sachant que la concentration des isomères est différente au regard des différences d'aires, et que l'intensité des ions observés en MS (parents et fils) est dépendante de la concentration, une première étape de normalisation est nécessaire à la comparaison des spectres MS/MS par ACP. Il est à noter que les spectres de masse sont toujours représentés normalisés sur le pic de base, correspondant au m/z le plus intense (e.g. Figure 82). Pour ce prétraitement, le choix de normaliser, pour chaque isomère, les intensités absolues sur l'intensité de l'ion parent a été pris, afin de minimiser les écarts d'intensités dus aux différences de concentrations. De plus, la transformation de ce rapport d'intensité par une fonction log a été choisie afin de minimiser les écarts de contributions entre les fragments les plus

intenses et ceux moins intenses. La Figure 83 représente l'effet de ces deux étapes de transformation sur les données d'entrée utilisées pour l'ACP, démontrant d'une part le regroupement des spectres MS/MS en fonction de leur ressemblance par l'étape de normalisation, et d'autre part la diminution de l'écart entre les valeurs absolues en fonction des fragments grâce à la transformation par la fonction log. Pour l'analyse par ACP de ces données, qui se base sur la comparaison de la variance des variables, la fonction log homogénéise l'apport de chaque variable à la construction de l'ACP (e.g. diminution de l'influence du m/z 659.3638 vis-à-vis du m/z 833.2560). Enfin, parmi les scaling utilisés avant la construction des ACP, le Pareto a été utilisé, consistant à centrer les données et à les réduire par la variance. Cette dernière étape permet une nouvelle fois d'augmenter la contribution des variables ayant une faible variance, tout en conservant des variances différentes entre chaque variable (en opposition au traitement Unit-Variance qui centre les données puis les réduit par l'écart-type).

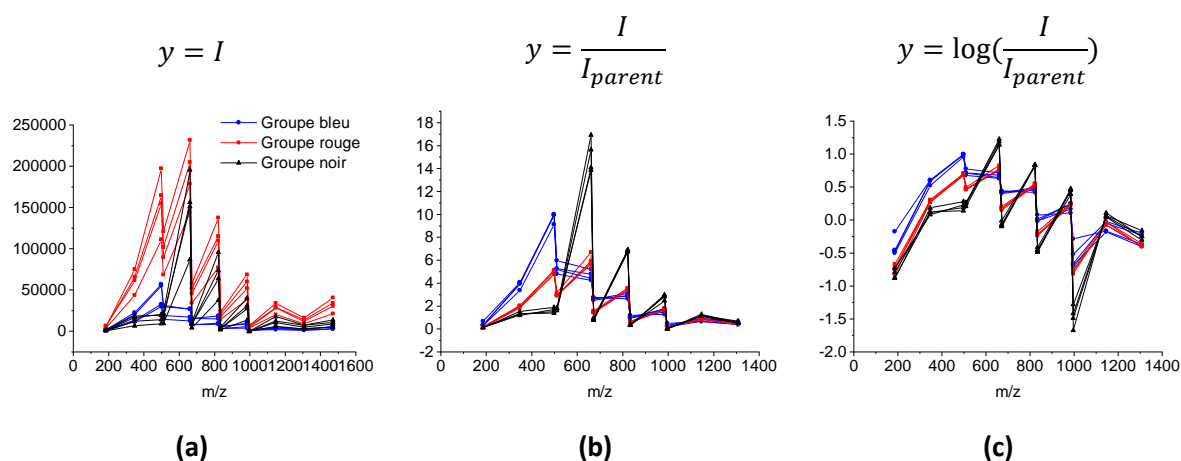


Figure 83 : Illustration de l'effet des transformations des données issues des spectres de fragmentation MS/MS. (a) Données brutes. (b) Normalisation sur l'intensité de l'ion parent. (c) Transformation par la fonction log des données normalisées sur l'ion parent.

L'ACP obtenue est représentée sur la Figure 84 (a) et montre une nette différenciation des trois groupes, correspondant à priori à la position de greffage de l'oléate de méthyle sur le  $\beta$ CD (bleu, rouge et noir) selon la première composante principale. Cette composante illustre 88.3% de la variance totale des données d'entrées, indiquant que la discrimination majoritaire est représentée par la formation de ces trois groupes.

L'observation des loadings est également informative. Représentés par les flèches bleues et correspondant à l'influence des variables d'entrée (i.e. de l'intensité des fragments prétraités) sur le placement des échantillons, ils permettent d'interpréter l'ACP obtenue. Il est notable que les loadings orientés vers le groupe noir correspondent aux fragments ayant un fort excès de masse (e.g. m/z 821.4163), alors que l'excès de masse de ceux orientés vers le groupe bleu est plus faible (e.g. m/z 833.2560). L'observation de la partie décimale est un indicateur de la présence de l'oléate de méthyle car ce groupement apporte de nombreux atomes d'hydrogène (responsables de l'excès de masse) et

peu d'atomes d'oxygène ou d'insaturation (responsables d'une diminution de l'excès de masse). De plus, la masse précise de ces fragments est en accord avec une formule brute correspondant à des oligosaccharides portant (loadings orientés vers le groupe noir) ou non (loadings orientés vers le groupe bleu) l'oléate de méthyle. Cette ACP représente donc que la fragmentation MS/MS des isomères du groupe bleu mène à une dissociation plus prononcée de l'oléate de méthyle que la fragmentation du groupe noir. Le groupe rouge se situe au centre de l'ACP, indiquant que la conservation de l'oléate de méthyle se situe entre celle du groupe noir et celle du groupe bleu.

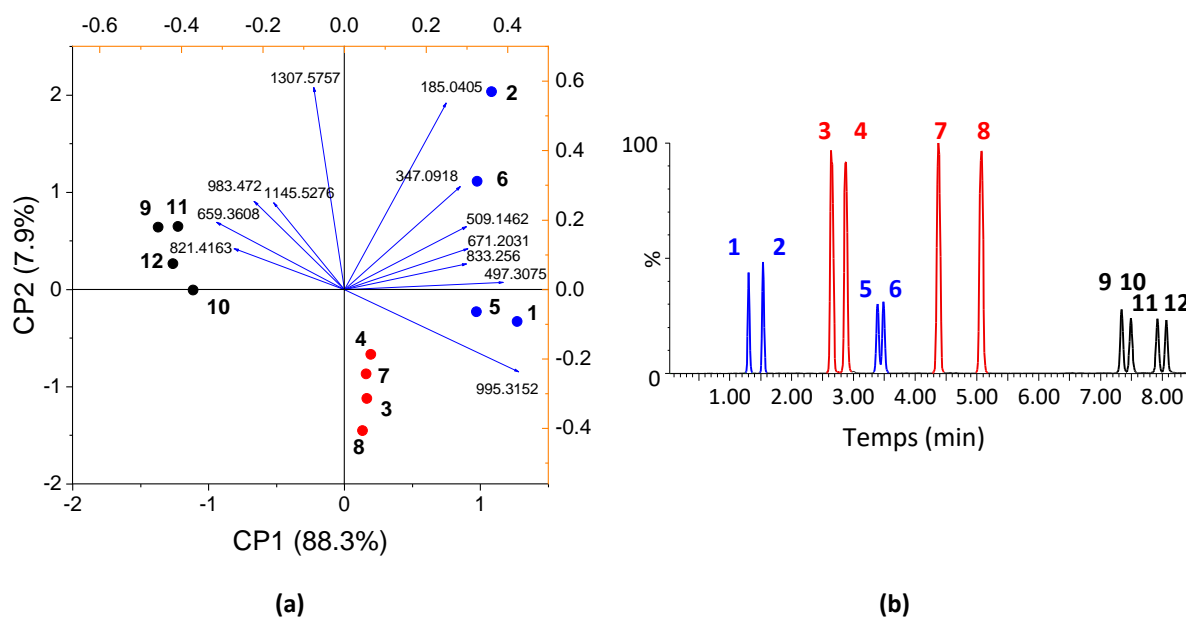


Figure 84 : (a) ACP représentée en biplot (superposition du score plot et du loadings plot) obtenue à partir de l'intensité des fragments communs des 12 isomères. (b) RIC des DS1 annoté des groupes déterminés par l'expérience MS/MS.

La deuxième composante principale n'est représentative que de 7.9% de la variance totale des données d'entrée. Il est observable que selon cette composante, le groupe rouge est différencié des groupes noir et bleu qui sont équivalents. L'orientation de deux loadings, correspondant aux fragments de  $m/z$  1307.5757 (perte d'un glucose déshydraté,  $[M+Na]^+$ ) et 185.0405 (glucose déshydraté,  $[M+Na]^+$ ), semblent être à l'origine de cette différence. En effet, les données d'entrée mettent en évidence que, au sein du groupe rouge, seules ces deux variables ont une valeur inférieure où égale aux groupes noir et bleu (Figure 83 (c)). Pour toutes les autres variables, la valeur du groupe rouge se situe à l'intermédiaire des deux autres groupes. Sur l'ACP cela se traduit par une orientation des loadings à l'opposé du placement du groupe rouge. Il est à noter que l'implication de principalement deux variables dans la différenciation observée selon la CP2 peut expliquer le faible pourcentage de variance expliquée par cette composante. Enfin, l'ion de  $m/z$  995.3152 (perte de l'oléate et d'un glucose déshydraté,  $[M+Na]^+$ ) semble être à l'origine du léger décalage du groupe rouge vers le groupe bleu.

Malgré aucun ion caractéristique et différenciant, cette expérience MS/MS a donc permis de former trois groupes attribués à la position de greffage sur la  $\beta$ CD au regard des possibilités réactionnelles de cette synthèse. L'utilisation de l'ACP, pertinente en raison du caractère commun des fragments, a montré que ce regroupement est valable d'un point de vue statistique, et a notamment permis une analyse rapide des raisons de ce regroupement. Cette approche offre donc la possibilité de rechercher, parmi les spectres MS/MS d'isomères ne présentant que des variations d'intensités de fragments, de mettre en évidence les ressemblances et différences (observation des échantillons) ainsi que leurs origines (observation des loadings), le tout associé à un pourcentage de variance expliquée. Ici, ce regroupement a permis d'annoter le chromatogramme des DS1 de Lip $\beta$ CD, comme représenté sur la Figure 84 (b). L'acquisition d'informations supplémentaires est néanmoins nécessaire à déterminer quelles sont les positions de greffage sur la  $\beta$ CD correspondant aux annotations (OH2, OH3 ou OH6).

#### II.2.2.4. La mobilité ionique (IMS)

L'apport d'une seconde technique séparative incluse dans le spectromètre de masse, la mobilité ionique, a ensuite été étudié. Rapportée comme permettant la différenciation d'isomères grâce à sa capacité à discriminer des ions en fonction de leur taille et de leur forme, cette technique est prometteuse dans le cas des isomères de Lip $\beta$ CD. Dans la mesure où cette séparation a lieu en aval de la source d'ionisation, cette analyse ajoute une seconde dimension de séparation lors de l'analyse d'un mélange par chromatographie. La Figure 85 reprend les résultats de cette analyse, représentés afin d'observer cette séparation selon deux dimensions.

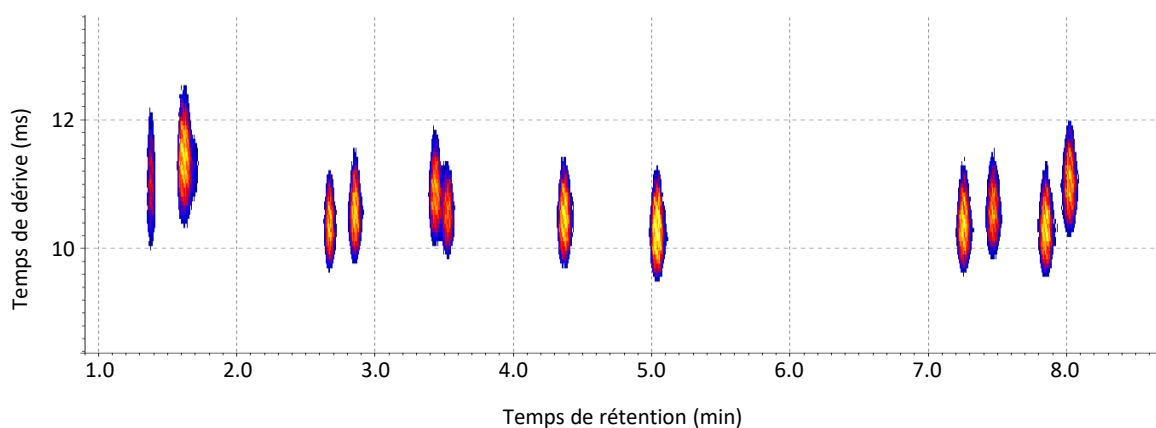


Figure 85 : Représentation des deux dimensions de séparation obtenues par le couplage UHPLC-IMS-MS lors de l'analyse du mélange de Lip $\beta$ CD. Cette carte 2D a été obtenue par l'extraction des  $m/z$  correspondant aux DS1 ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  1469) et représente le temps de dérive (ordonnée) en fonction du temps de rétention (abscisse).

Malgré des temps de dérive (dt) proches, une différence est observable en fonction des isomères, indiquant que cette technique peut être informative pour l'analyse de ces molécules. Pour une meilleure visibilité, la distribution du temps d'arrivée de chaque isomère (i.e. les taches observées Figure 85) a été extraite et représentée utilisant la section efficace de collision expérimentale ( $CCS_{exp}$ )



en axe des abscisses (Figure 86), obtenues après la calibration de la cellule de mobilité avec un mélange de composés commerciaux. L'annotation en groupe de couleur issue des expériences MS/MS a été appliquée aux traces de mobilité extraites correspondantes.

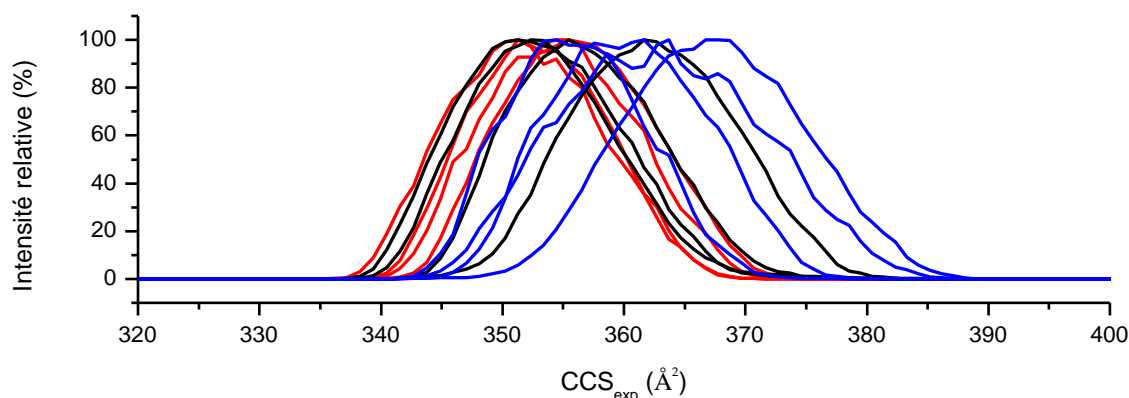


Figure 86 : Superposition des traces de mobilité des 12 isomères de DS1, représentées avec les  $CCS_{exp}$  en abscisse. Les couleurs représentent le regroupement réalisé par l'expérience MS/MS.

D'après ces données, il est notable que le groupe bleu possède des isomères dont la CCS est la plus grande, avec des courbes les plus larges. La seconde observation qualitative porte sur le groupe rouge, dont les isomères ne semblent que très peu différenciés et posséder les plus faibles CCS. A l'intermédiaire de ces observations se trouve le groupe noir qui possède 3 isomères aux distributions semblables et un isomère dont la CCS est plus grande. L'accès à la CCS qui est une grandeur intrinsèque, offre la possibilité de comparer ces données expérimentales avec des données théoriques, issues de modélisation moléculaire suivie du calcul des CCS des structures modélisées [178].

### II.2.3. Etude théorique par modélisation moléculaire

#### II.2.3.1. Génération des structures et des CCS théoriques

*Préambule : L'ensemble des calculs de modélisation moléculaire discutés dans ce chapitre a été réalisé par le Dr. Christine Cézard, MCU au LG2A. Il a été choisi d'effectuer l'exploration des structures théoriques par une approche de métadynamique, en opposition à la dynamique moléculaire classique. Cette approche consiste à introduire un biais énergétique permettant une large exploration des conformations envisageables. En effet, cet introduction d'énergie offre la possibilité aux structures stables de sortir de leur état de stabilité, menant à explorer d'autres conformations présentant potentiellement une plus haute stabilité. Cette approche théorique permet l'obtention d'une base de données conformationnelles conséquente, apportant une grande quantité d'informations théoriques. Les profils énergétiques obtenus sont des profils reconstruits et représentent l'énergie du système, débiaisée de l'énergie introduite. La quantité d'informations obtenues par rapport au coût de calcul de cette approche classe cette méthode comme peu coûteuse en terme de calculs. La conformation des 12*

isomères a donc été modélisée par métadynamique, dans une boîte d'eau, exploitant un champ de force adapté à la  $\beta$ CD et un second adapté à la chaîne lipidique d'oléate de méthyle [179,180]. Le rayon de giration des molécules ayant été reporté comme une grandeur représentative de la compacité des structures, de façon analogue aux CCS, ce paramètre a été utilisé pour diriger la modélisation et pour la reconstruction des profils énergétiques [181]. Chaque simulation a duré 300 ns, menant à l'obtention de 300 000 structures par isomère modélisé.

La modélisation moléculaire par métadynamique des 12 isomères DS1 de Lip $\beta$ CD a mené à une grande quantité de données théoriques. Pour chaque structure modélisée, sa CCS théorique ( $CCS_{th}$ ) a été calculée selon deux méthodes : la méthode des trajectoires (TM) et l'approximation par projection (PA). La Figure 87 montre que l'utilisation du rayon de giration ( $rg$ ) est effectivement un paramètre représentatif de la CCS, une linéarité entre le  $rg$  et les CCS étant observée pour les structures les plus compactes. Néanmoins, il est notable que pour une même valeur de  $rg$ , la dispersion des valeurs de CCS correspondantes varie de  $10 \text{ \AA}^2$  ( $rg \approx 5.2 \text{ \AA}$ ) à  $40 \text{ \AA}^2$  ( $rg \geq 7.5 \text{ \AA}$ ). Cette figure met également en évidence que la méthode de calcul n'influence que la valeur absolue des  $CCS_{th}$  calculées, la méthode TM (rouge) menant à l'obtention de CCS plus élevées qu'avec la méthode PA (noir).

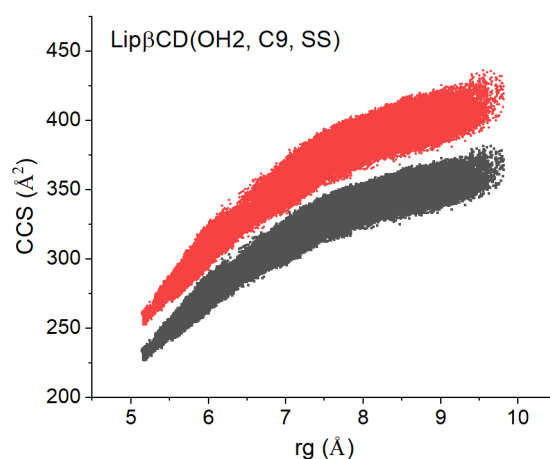


Figure 87 : Représentation pour l'isomère Lip $\beta$ CD(OH2, C9, RR) de la  $CCS_{th}$  calculée, selon la méthode TM (rouge) ou PA (noir), en fonction du rayon de giration.

Afin de réduire la quantité de conformations théoriques aux plus probables, l'extraction des structures aux énergies les plus faibles a été réalisée (fond de puits énergétique), sur une fenêtre de  $rg \pm 0.1 \text{ \AA}$  (Figure 88 (a)). Il est remarquable que la dispersion des structures correspondantes, en terme de  $CCS_{th}$ , est nettement supérieure au  $rg$  sélectionné, ce qui est cohérent avec les observations précédentes. Cette réduction a permis de réduire le nombre de conformations à environ 25 000 par isomère. L'obtention de largeur comparable en terme de dispersion ( $10 \text{ à } 20 \text{ \AA}^2$ ), entre les données expérimentales et théoriques, met en évidence que les traces de mobilité contiennent potentiellement un grand nombre de conformations. Cette observation est à nuancer en raison de la résolution

expérimentale de la cellule de mobilité utilisée : l'analyse d'un isomère par une cellule de mobilité plus résolutive pourrait affirmer ou infirmer cette remarque.

### Lip $\beta$ CD(OH6, C9, RR)

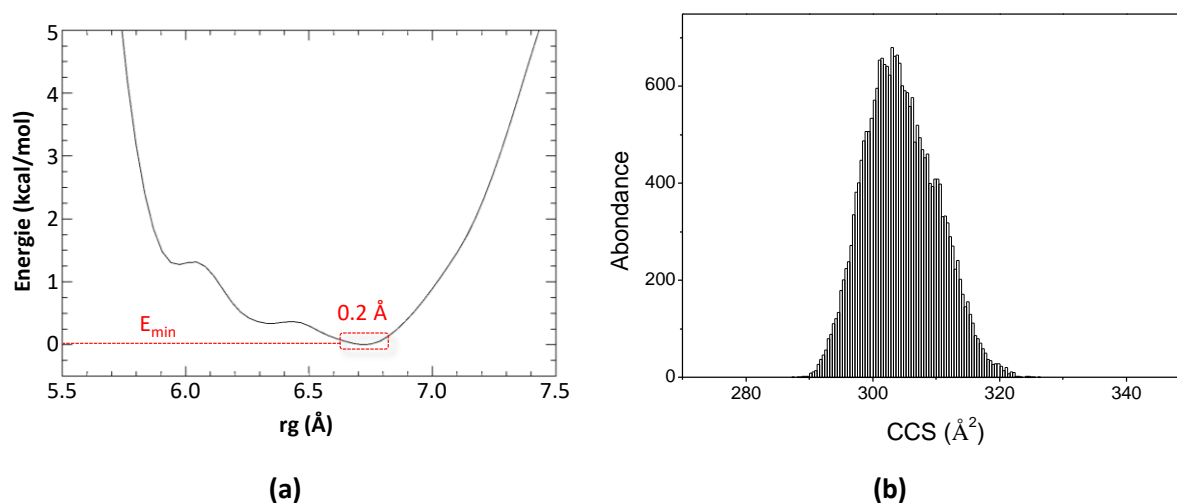


Figure 88 : Représentation de l'extraction des structures modélisées les plus stables. (a) Profil énergétique reconstruit en fonction du rayon de giration, l'encadré représente le fond de puits énergétique correspondant à la zone d'extraction des structures les plus stables ( $rg_{E_{min}} \pm 0.1 \text{ \AA}$ ). (b) histogramme des CCS correspondantes aux structures extraites les plus stables, sur une fenêtre de  $rg \pm 0.1 \text{ \AA}$ .

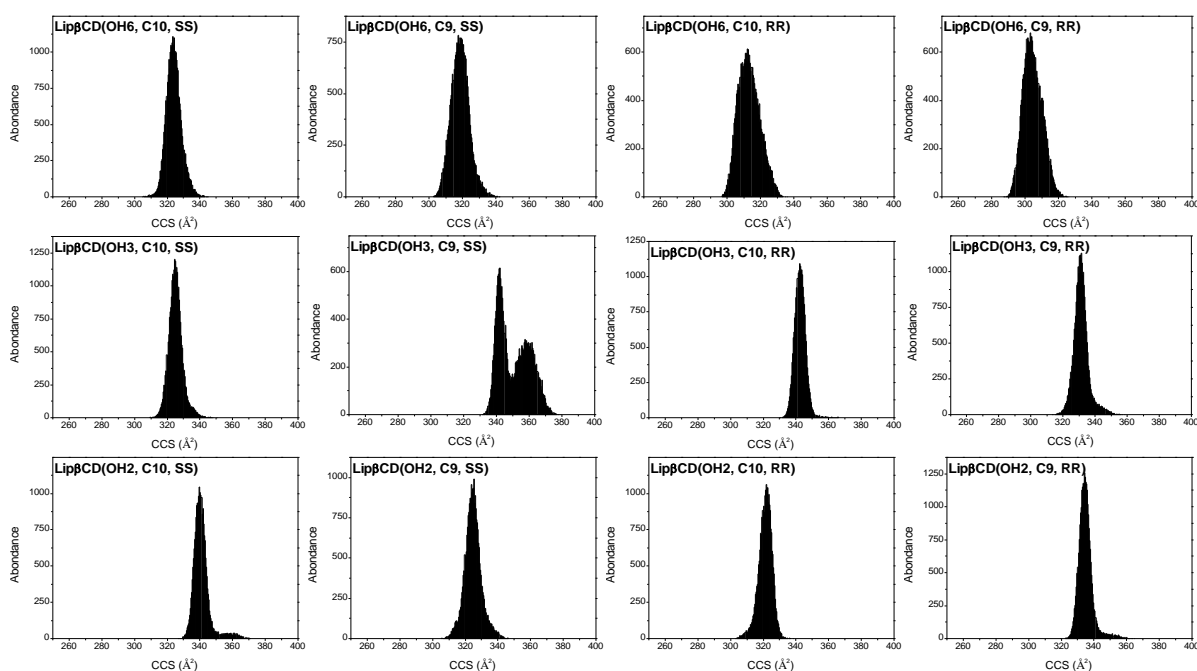


Figure 89 : Représentation des 12 distributions de  $CCS_{th}$  obtenues après sélection des structures les plus stables ( $rg_{E_{min}} \pm 0.1 \text{ \AA}$ ).

Cette approche de modélisation a donc permis d'obtenir des données théoriques du même format que les données expérimentales, soit une distribution de CCS par isomère (Figure 89). Néanmoins, il est à noter que l'écart entre la CCS la plus faible et la plus haute au sein des données théoriques est de  $46.46 \text{ \AA}^2$  alors que l'écart expérimental n'est que de  $15.74 \text{ \AA}^2$ , induisant une différence non négligeable.

L'étape suivante est la comparaison de ces deux jeux de données, expérimentaux et théoriques, afin d'assigner les isomères de DS1 séparés par chromatographie aux isomères modélisés.

### II.2.3.2. Attribution des isomères de position sur la $\beta$ CD

La comparaison des  $CCS_{th}$  avec des données expérimentales ( $CCS_{exp}$ ) est une approche reportée dans la littérature, dans le cadre de la différenciation d'un nombre limité d'isomères. Dans les études comparant un nombre important d'isomères, la démarche employée est d'effectuer un classement, croissant ou décroissant, des  $CCS_{exp}$  et  $CCS_{th}$ , menant à l'assignation des structures modélisées aux produits analysés par comparaison des classements [174,182]. Dans notre cas, le nombre de 12 isomères, les faibles différences de  $CCS_{exp}$  et la différence d'étendues entre les  $CCS_{exp}$  et les  $CCS_{th}$  imposent la mise en place d'une approche différente. La discussion sera donc par la suite uniquement focalisée sur la détermination des positions de greffage de l'oléate de méthyle sur la  $\beta$ CD, représentées par les couleurs bleue, rouge et noire sur la Figure 84 (b).

Cette annotation réalisée par l'expérience MS/MS limite le nombre de possibilités d'assignation de position de greffage sur la  $\beta$ CD. En effet, seulement 6 hypothèses d'attributions peuvent être formulées, indiquées dans le Tableau 17. L'approche envisagée est donc de comparer, pour chaque hypothèse, le pourcentage de correspondances entre les données expérimentales et théoriques.

Tableau 17 : Hypothèses d'attribution des régioisomères correspondant à la position de greffage sur la  $\beta$ CD, limitées au nombre de 6 grâce au regroupement effectué par l'expérience de fragmentation MS/MS.

Groupe (pic)	Hypothèses					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Bleu (1, 2, 5, 6)	OH3	OH3	OH2	OH2	OH6	OH6
Rouge (3, 4, 7, 8)	OH6	OH2	OH3	OH6	OH3	OH2
Noir (9, 10, 11, 12)	OH2	OH6	OH6	OH3	OH2	OH3

Pour ce faire, un classement par ordre décroissant des  $CCS_{exp}$  et de la moyenne des  $CCS_{th}$  ( $\overline{CCS_{th}}$ ) a été réalisé. L'utilisation de  $\overline{CCS_{th}}$  est, dans la mesure où les histogramme de  $CCS_{th}$  suivent une distribution normale, représentative du maximum des histogrammes de chaque isomère corrigé par les éventuelles différences de largeurs de distribution. Le Tableau 18 explicite, pour l'hypothèse 1 (H1), la démarche employée. La mise en place d'un système de score est nécessaire à la comparaison des  $CCS_{exp}$  avec les  $CCS_{th}$ , mais également pour classer les résultats obtenus pour chaque hypothèse. Défini par l'Équation 10, ses composantes seront détaillées indépendamment pour davantage de clarté.

Équation 10 : Système de score proposé pour permettre la comparaison des données théoriques et expérimentales.

$$Score = \frac{\sum_{i=1}^{12} x_i \times |Médiane_{CCS_{exp}} - CCS_{exp i}|}{\sum_{i=1}^{12} |Médiane_{CCS_{exp}} - CCS_{exp i}|}$$

- $| \text{Médiane}_{\text{CCS}_{\text{exp}}} - \text{CCS}_{\text{exp } i} |$  : Le critère différenciant observé sur les données expérimentales est la différence de dispersion des  $\text{CCS}_{\text{exp}}$  en sein de chaque groupe, notamment la faible dispersions des isomères rouges et la plus forte dispersion des isomères bleus. Cette différence se traduit par certains isomères bleus ayant une grande  $\text{CCS}_{\text{exp}}$  et d'autres non, alors que tous les isomères rouges ont une faible  $\text{CCS}_{\text{exp}}$ . Correspondant à la plus grande différence du jeu de données, l'utilisation d'un facteur de pondération correspondant à l'écart à la médiane a été utilisé, représentatif de cette dispersion (Tableau 18).
- Principe de la comparaison : Pour une position  $n_i$  dans le classement décroissant des  $\text{CCS}_{\text{exp}}$  et  $\text{CCS}_{\text{th}}$ , si l'annotation (OH2, OH3 ou OH6) est identique alors le score attribué à cette position  $n_i$  est maximal (égal au facteur de pondération).
  - $x_i$  : Cette variable a été ajoutée afin d'ajouter une liberté dans la comparaison des annotations pour une place  $n_i$ . Dans le cas d'une correspondance parfaite ( $n_{i \text{ exp}} = n_{i \text{ th}}$ ),  $x_i = 1$ , menant à un score égal au facteur de pondération (e.g. isomère 1). Ce score est divisé par 2 ( $x_i = 0.5$ ) si l'annotation est différente à  $n_{i \text{ exp}} = n_{i \text{ th}}$  mais identique à  $n_{i \text{ exp}} = n_{i \text{ th}} \pm 1$  (e.g. isomère 5). Suivant le même principe, le score est divisé par 4 ( $x_i = 0.25$ ) si une annotation identique est trouvée à  $n_{i \text{ exp}} = n_{i \text{ th}} \pm 2$  (e.g. isomère 11). Les valeurs de  $x_i$  ont été déterminées arbitrairement, ayant l'objectif d'autoriser des correspondances positives à  $n_{i \text{ exp}} = n_{i \text{ th}} \pm 1$  ou  $n_{i \text{ th}} \pm 2$  tout en diminuant significativement leur influence sur le score final.

Tableau 18 : Démarche utilisée pour calculer le score de chaque hypothèse, explicitée pour l'hypothèse H1.

Isomère	Expérimental			Classement (décroissant)		Théorique		$x_i$	Score	
	$\text{CCS}_{\text{exp}}$	H1	Pondération	$n_{i \text{ exp}}$	$n_{i \text{ th}}$	Lip $\beta$ CD	$\overline{\text{CCS}}_{\text{th}}$			
<b>2</b>	366.36 ± 0.20	OH3	11.35	1-OH3	1-OH3	(OH3, C9, SS)	350.87	1	11.35	
<b>1</b>	361.77 ± 0.14	OH3	6.76	2-OH3	2-OH3	(OH3, C10, RR)	342.42	1	6.76	
<b>12</b>	361.24 ± 0.22	OH2	6.24	3-OH2	3-OH2	(OH2, C10, SS)	339.90	1	6.24	
<b>5</b>	359.31 ± 0.21	OH3	4.31	4-OH3	4-OH2	(OH2, C9, RR)	334.24	0.5	2.15	
<b>6</b>	355.05 ± 0.28	OH3	0.05	5-OH3	5-OH3	(OH3, C9, RR)	330.80	1	0.05	
<b>10</b>	355.02 ± 0.25	OH2	0.02	6-OH2	6-OH3	(OH3, C10, SS)	324.81	0.5	0.01	
<b>4</b>	354.99 ± 0.19	OH6	0.02	7-OH6	7-OH2	(OH2, C9, SS)	324.49	0.5	0.01	
<b>7</b>	353.59 ± 0.27	OH6	1.42	8-OH6	8-OH6	(OH6, C10, SS)	323.70	1	1.42	
<b>3</b>	352.23 ± 0.22	OH6	2.77	9-OH6	9-OH2	(OH2, C10, RR)	321.73	0.5	1.39	
<b>9</b>	352.04 ± 0.16	OH2	2.96	10-OH2	10-OH6	(OH6, C9, SS)	318.33	0.5	1.48	
<b>11</b>	351.28 ± 0.32	OH2	3.73	11-OH2	11-OH6	(OH6, C10, RR)	313.04	0.25	0.93	
<b>8</b>	350.62 ± 0.19	OH6	4.39	12-OH6	12-OH6	(OH6, C9, RR)	304.41	1	4.39	
Somme			44.00							36.17

L'application du système de score a été réalisée sur les 6 hypothèses d'attribution envisageables, menant à un score maximal pour l'hypothèse H1 (Figure 90 (gauche)), permettant d'assigner la position de greffage de l'oléate de méthyle des groupes bleu, rouge et noir respectivement aux positions OH3, OH6 et OH2 de la  $\beta$ CD (Figure 90 (droite)).

Certaines limitations, liées au système de score sont néanmoins à relever. Il est notable que l'hypothèse H2 pour laquelle le groupe bleu est également assigné à un greffage en position OH3 a un score élevé. Ceci peut s'expliquer par le facteur de pondération utilisé. En effet, le groupe bleu étant le plus différencié des trois groupes, il est compréhensible que la seconde hypothèse selon laquelle ce groupe correspond à la position OH3 possède le deuxième score le plus élevé. De plus, le facteur de liberté introduit génère l'utilisation d'un même isomère théorique pour deux isomères expérimentaux. Par exemple, le Lip $\beta$ CD(OH3, C9, RR) est utilisé par les isomères 5 et 6, l'isomère Lip $\beta$ CD(OH3, C10, SS) n'est donc pas utilisé dans le calcul du score de l'hypothèse H1 (Tableau 18).

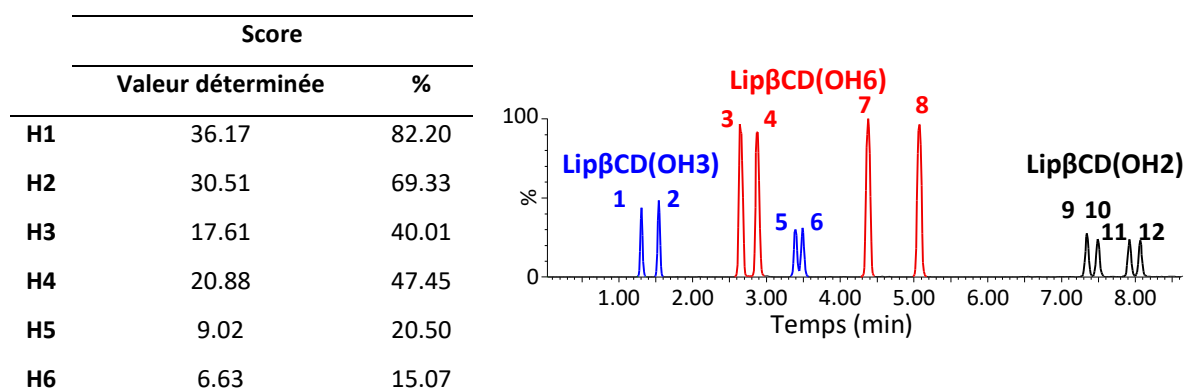


Figure 90 : (Gauche) Scores obtenus par la comparaison des  $CCS_{exp}$  avec les  $CCS_{th}$  pour les 6 hypothèses d'attribution. (Droite) RIC des isomères de DS1 de Lip $\beta$ CD annoté des positions de greffage sur la  $\beta$ CD déterminées par mobilité ionique couplée à de la modélisation moléculaire.

Néanmoins, l'attribution réalisée est cohérente avec la tendance générale suivante :  $CCS_{exp\ Bleu} > CCS_{exp\ noir} > CCS_{exp\ rouge}$  (respectivement 360.62, 354.90 et 352.86  $\text{\AA}^2$ ) et  $CCS_{th\ OH3} > CCS_{th\ OH2} > CCS_{th\ OH6}$  (respectivement 337.22, 330.09 et 314.87  $\text{\AA}^2$ ). La Figure 91 reprend les données expérimentales et théoriques pour simplifier la comparaison des courbes obtenues. Cette attribution est également cohérente avec l'intensité des pics chromatographiques. La position OH6 est connue comme étant la plus réactive de par sa plus forte nucléophilie, il est donc logique que les isomères correspondant soient majoritaires. Les observations réalisées sur l'ACP décrite précédemment et basée sur les spectres MS/MS semblent également être en accord avec cette attribution. En effet, il a été montré que les isomères du groupe noir conservent davantage l'oléate de méthyle lors de leurs fragmentations MS/MS en comparaison du groupe bleu, ce qui peut être interprété par l'orientation des OH2 vers l'intérieur de la cavité offrant un effet protecteur lors de la fragmentation CID. A l'inverse, l'orientation des OH3 vers l'extérieur de la cavité expose davantage la

liaison entre la  $\beta$ CD et l'oléate de méthyle aux collisions appliquées lors de la fragmentation CID, menant à une rupture facilitée.

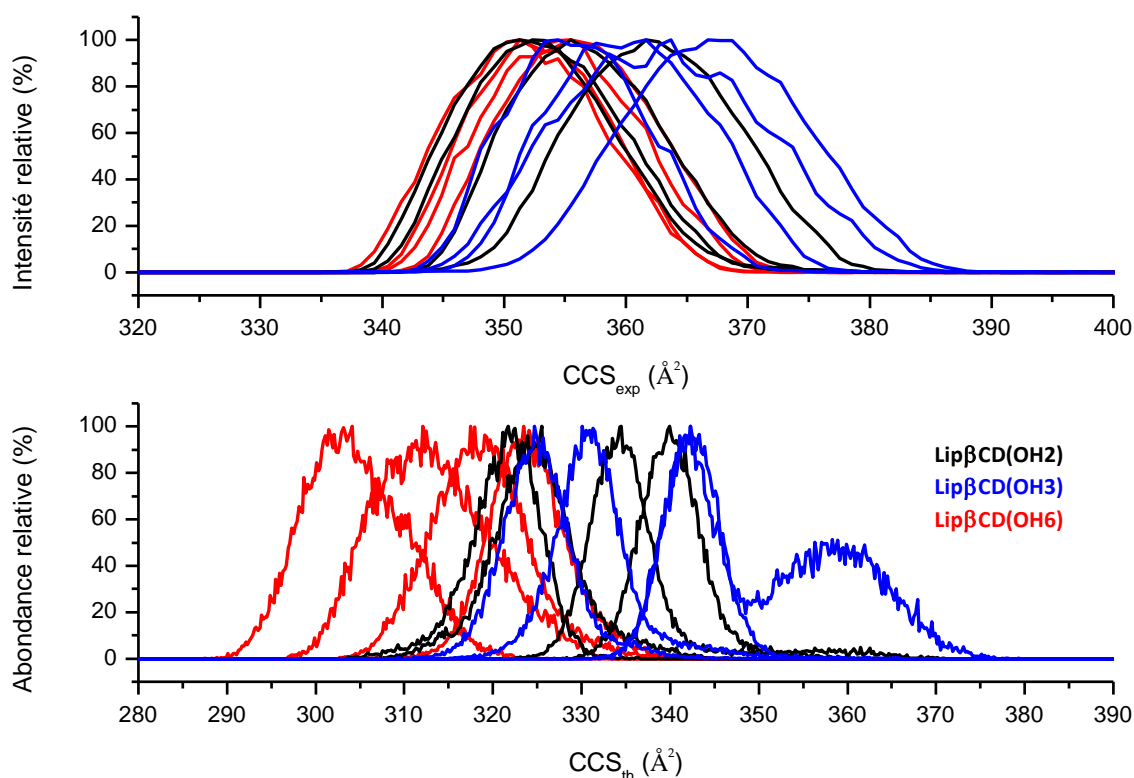


Figure 91 : (Haut) Courbes de mobilité extraites pour chaque isomère et annotées des couleurs correspondant aux positions de greffage sur la  $\beta$ CD. (Bas) Superposition des courbes issues des histogrammes de  $CCS_{th}$  obtenus par modélisation des 12 isomères de DS1 de Lip $\beta$ CD.

Du point de vue théorique, une limite de cette approche est la réalisation de la modélisation dans l'eau, rendant impossible le placement d'une charge sur les structures modélisées, ce qui représente une différence significative entre les données expérimentales et théoriques. En effet, l'affinité d'un ion  $Na^+$  est très largement supérieure avec les molécules d'eau qu'avec les Lip $\beta$ CD. Néanmoins, il est rapporté dans la littérature une conservation, en phase gazeuse après l'ionisation par ESI, de la conformation solvatée de la molécule analysée, justifiant ainsi l'utilisation de cette approche [183]. Cette différence est potentiellement à l'origine des disparités, en terme de valeur de CCS absolues, entre les données expérimentales (sous forme d'adduit  $[M+Na]^+$ ) et les données théoriques (sous forme de molécule neutre). Il est à noter que le simple décalage des valeurs de CCS calculées selon la méthode (PA ou TM) peut également être due à cette absence de charge, la méthode TM exploitant les charges et les charges partielles, en opposition à la méthode PA.

Ayant pour objectif d'appliquer cette méthode pour d'autres mélanges complexes de dérivés de CDs, une étape de validation est nécessaire. Cette validation couvrira donc les conditions expérimentales et l'assignation des régioisomères réalisée. Une étape de purification des isomères est un préalable nécessaire à étudier et valider les paramètres expérimentaux.

## II.2.4. Validation de la méthode : des conditions expérimentales à l'attribution

### II.2.4.1. Purification des isomères

Afin de vérifier si les conditions expérimentales ont un effet sur la mesure de CCS des isomères et si l'attribution de la régioisomérisation réalisée est correcte, la purification des isomères a été entreprise. Pour ce faire, un système de chromatographie liquide à l'échelle préparative, couplé à un détecteur MS simple quadripôle a été utilisé. L'utilisation de cet appareillage a été motivée par sa bonne capacité résolutive, nécessaire à séparer les isomères ayant des temps de rétention proches lors de leur analyse par UHPLC-HRMS. De plus, le travail de développement de méthode chromatographique est fortement minimisé dans la mesure où une méthode efficace a été développée à l'échelle analytique, utilisant des solvants sans additifs. La Figure 92 illustre les chromatogrammes obtenus lors de la purification du mélange de Lip $\beta$ CD.

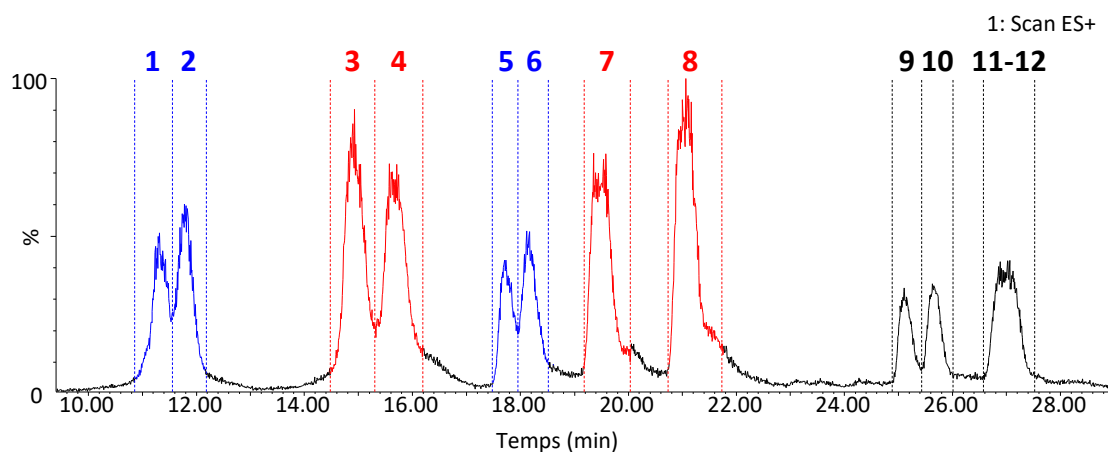


Figure 92 : RIC des DS1 de Lip $\beta$ CD obtenu lors de l'analyse LC-MS à l'échelle préparative, annoté des fractions récoltées. Conditions : Colonne C8, débit de 23 mL/min, gradient H<sub>2</sub>O:MeOH, 70:30 (0 min), 30:70 (20 min), 30:70 (30 min), 0:100 (30.1 min), 0:100 (40 min), 70:30 (40.1 min), 70:30 (50 min).

En comparaison des analyses réalisées par UHPLC, la résolution entre chaque isomère est diminuée, en raison de l'augmentation des dimensions de la colonne C8 vers l'échelle préparative, c'est pourquoi les isomères **11** et **12** n'ont pu être collectés séparément. Il est à noter que la méthode utilisée dure 50 min afin de permettre l'élution des DS2 et DS3 de Lip $\beta$ CD (non représentées ici, visible sur la Figure 80). L'analyse par UHPLC-HRMS des fractions collectées montre la pureté des isomères isolés (Figure 93). Cette purification a donc permis d'obtenir 11 fractions, dont les isomères **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10** purs et isolés, et les isomères **11** et **12** sous forme de mélange.



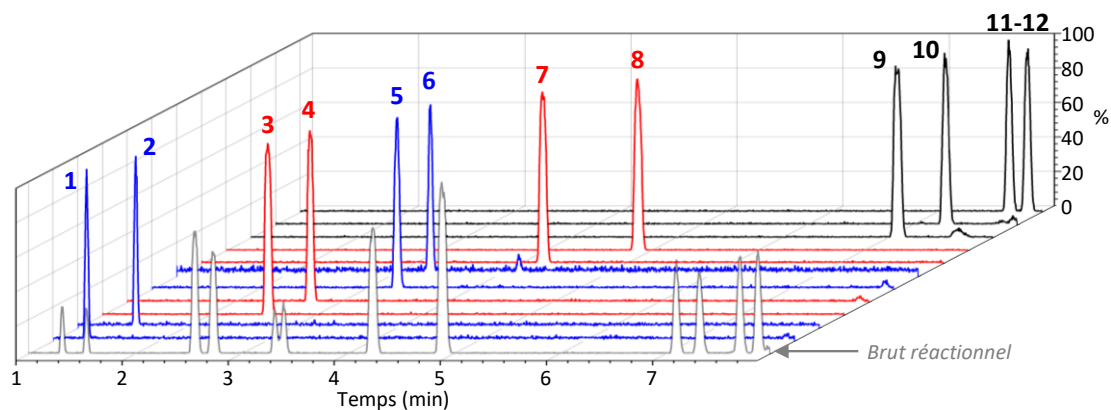


Figure 93 : Analyse par UHPLC-HRMS des fractions récoltées par chromatographie préparative. L'analyse du brut de réaction est représentée en gris, correspondant au RIC des DS1. Les chromatogrammes des fractions (bleu, rouge et noir) correspondent aux BPI (Based Peak Intensity) afin d'apprécier l'absence de composés tiers.

Après évaporation et lyophilisation, la pesée des masses récoltées offre la possibilité d'estimer la quantité relative de chaque isomère, en fonction de la position de greffage déterminée (Tableau 19). D'une part, il est notable que les proportions obtenues sont en bon accord avec les intensités des pics observées lors des analyses UHPLC (Figure 93, courbe grise), indiquant que les réponses par ESI-MS de ces isomères sont similaires. Cette information indique donc que la détermination des quantités relatives de ces dérivés amphiphiles est réalisable par la simple analyse par UHPLC-MS et l'intégration des pics chromatographiques. D'autre part, ces masses sont, d'après l'attribution réalisée, en accord avec la réactivité connue de la  $\beta$ CD. En effet, les isomères majoritaires (57.3 %) correspondent à l'ouverture de l'époxyde par les OH6, qui sont les hydroxyles les plus nucléophiles. Le second groupe majoritaire (26.4 %), implique les OH2 de la  $\beta$ CD qui sont les plus acides. Enfin, les isomères impliquant la position connue comme étant la moins réactive (OH3) représente 16.2 % des DS1. Cette observation est une première information en accord avec l'assignation réalisée précédemment.

Tableau 19 : Masses pesées de chaque fraction, correspondant à chaque isomère, après évaporation et lyophilisation, associé à leur pourcentage massique.

Isomère	masse purifiée (mg)	% massique	% par groupe	
<b>1</b>	5.5	3.1%	<b>OH3</b>	<b>16.2 %</b>
<b>2</b>	5	2.8%		
<b>3</b>	19.5	11.1%		
<b>4</b>	27.5	15.7%	<b>OH6</b>	<b>57.3 %</b>
<b>5</b>	7.1	4.0%		
<b>6</b>	11.1	6.3%		
<b>7</b>	27.7	15.8%		
<b>8</b>	25.8	14.7%		
<b>9</b>	13	7.4%	<b>OH2</b>	<b>26.4 %</b>
<b>10</b>	13.9	7.9%		
<b>11-12</b>	19.5	11.1%		

Il est intéressant de noter que la position OH3 a donc réagi de manière significative, soulignant la réactivité particulière observable lors de synthèses réalisées par un broyeur à billes. L'obtention de ces isomères correctement purifiés offre donc la possibilité d'effectuer différentes étapes de validation qui seront développées par la suite.

#### II.2.4.2. Validation des conditions expérimentales : Influence de la nature du solvant sur la mobilité ionique

Les valeurs de  $CCS_{exp}$  et les différences observées étant les paramètres ayant motivé l'approfondissement de la caractérisation des ces Lip $\beta$ CD de de DS1 en mélange, la détermination des paramètres influençant ces valeurs semble importante. Il est reporté dans la littérature un effet de la nature du solvant sur les CCS mesurées, dans le cas de macromolécules telles que les protéines [184]. Cette influence est cohérente avec la conservation de la conformation solvatée d'une structure après son ionisation par ESI [183]. Les cyclodextrines sont des structures relativement rigides, dont la conformation peut n'être que légèrement impactée par la nature du solvant utilisé [7]. Néanmoins, l'ajout d'une chaîne lipidique flexible telle que l'oléate de méthyle ajoute un degré de liberté conformationnel non négligeable, susceptible d'être à l'origine de conformations différentes selon la solvatisation. L'analyse par mobilité ionique des Lip $\beta$ CD étant réalisée en ligne après une séparation chromatographique et un gradient de solvant, la composition de la phase mobile est différente aux temps de rétention des 12 isomères de DS1. Le solvant d'élution étant composé d'H<sub>2</sub>O et de MeOH, aux proportions variables en fonction du gradient, l'étude des traces de mobilité à 100% d'H<sub>2</sub>O,

H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 v/v, et à 100% de MeOH a été réalisée. Afin d'obtenir des données représentatives des trois positions greffage, cette influence a été étudiée pour les isomères purifiés **1** (OH3), **4** (OH6) et **10** (OH2). Les trois CDs naturelles (αCD, βCD et γCD) ont également été analysées, en tant que référence mais également en raison de leur plus haute rigidité. *Afin d'alléger la lecture, le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 (v/v) sera par la suite dénommé H<sub>2</sub>O/MeOH.*

Cette étude a été réalisée par FIA (Flow Injection Analysis, introduction directe) et consiste à injecter une solution dans un flux de solvant, lequel entraîne l'échantillon jusqu'à la source ESI sans séparation chromatographique. Cette méthode offre la possibilité de maîtriser la composition du solvant de poussée utilisé, ici représentatif du solvant utilisé lors d'un gradient pour une séparation chromatographique. De plus, cette voie d'injection permet également d'étudier si le solvant de solubilisation de l'échantillon peut avoir un effet en terme de mesure de CCS, en plus du solvant de poussée. La Schéma 16 résume les expériences réalisées afin de déterminer si la nature du solvant de solubilisation ou de poussée ont un effet sur la mesure de CCS.

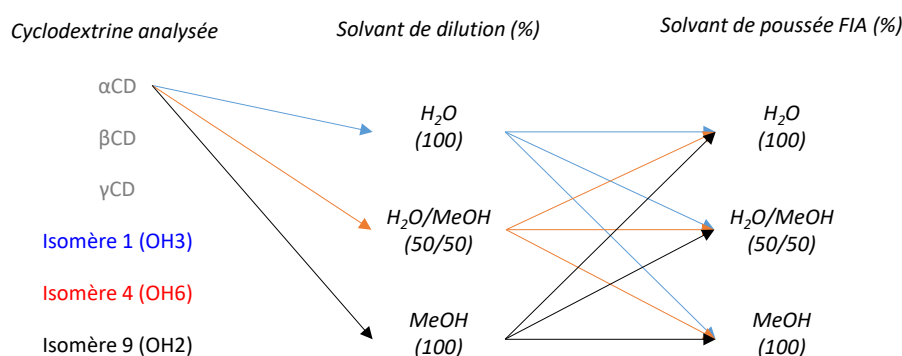


Schéma 16 : Expériences réalisées afin de déterminer si la nature des solvants de solubilisation et de poussée ont une influence sur la mesure des CCS. Pour une bonne lisibilité, seules les expériences impliquant l'αCD ont été explicitées par des flèches.

Chaque analyse a été répétée en triplicata sur trois jours différents, exploitant trois calibrations, chacune réalisée en fin de journée d'analyse. Cette procédure a pour objectif de vérifier si les analyses par mobilité ionique sont répétables, tant en terme de distribution de temps d'arrivée qu'en terme de CCS obtenues par calibration.

La Figure 94 reprend les résultats du triplicata des analyses des 3 dérivés de LipβCD dans des conditions identiques, mettant en évidence une superposition parfaite des traces de mobilité. En terme de distribution d'arrivée, les analyses par mobilité ionique réalisées par le Synapt-G2-Si sont donc répétables. Pour ces raisons, les données utilisées dans cette étude seront la moyenne des triplicatas dont l'écart-type des temps d'arrivée est négligeable.

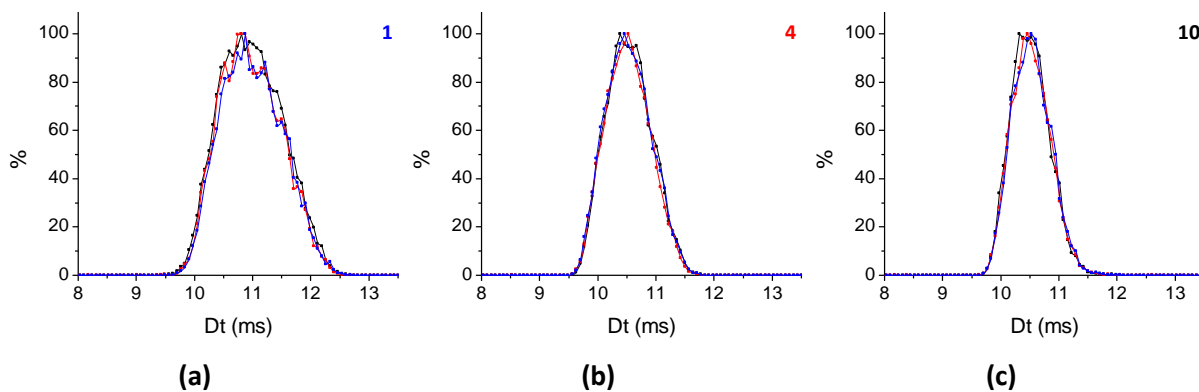


Figure 94 : Superposition des traces de mobilités issues de trois répétitions de l'analyse des isomères (a) **1** (OH3) ; (b) **4** (OH6) et (c) **10** (OH2) dilués et poussés en FIA par H<sub>2</sub>O/MeOH.

La mobilité ionique est une technique dont les conditions de séparation, en phase gazeuse, limitent les interactions qui peuvent être à l'origine de la déformation de la distribution des ions analysés [185]. C'est pourquoi la regression des courbes expérimentales par une fonction gaussienne symétrique est une approche couramment reportée. L'obtention de courbes asymétriques et / ou avec une largeur à mi-hauteur (FWHM) importante est un indicateur de la présence de plusieurs conformations non-résolues aux temps de dérives proches. Dans ce cas, l'utilisation d'un mélange de gaussiennes permet de déconvoluer les courbes et d'observer les différentes distributions à l'origine de la courbe expérimentale asymétrique [186–188]. La Figure 95 reprend la comparaison de la regression des trace de mobilité des isomères **1** et **4** par une ou deux gaussiennes. Il est à noter que la trace de mobilité de l'isomère **1** est la plus large de tous les DS1 de Lip $\beta$ CD, et donc susceptible de contenir différentes conformations non-résolues. L'observation de la base des pics représentés permet d'apprécier la différence de qualité de regression entre l'utilisation d'une ou de deux gaussiennes. La présence de deux distributions, représentatives de populations significatives, est donc un indicateur de l'existence de différentes conformations, tant pour l'isomère **1** que pour l'isomère **4** qui possède pourtant une trace de mobilité moins large.

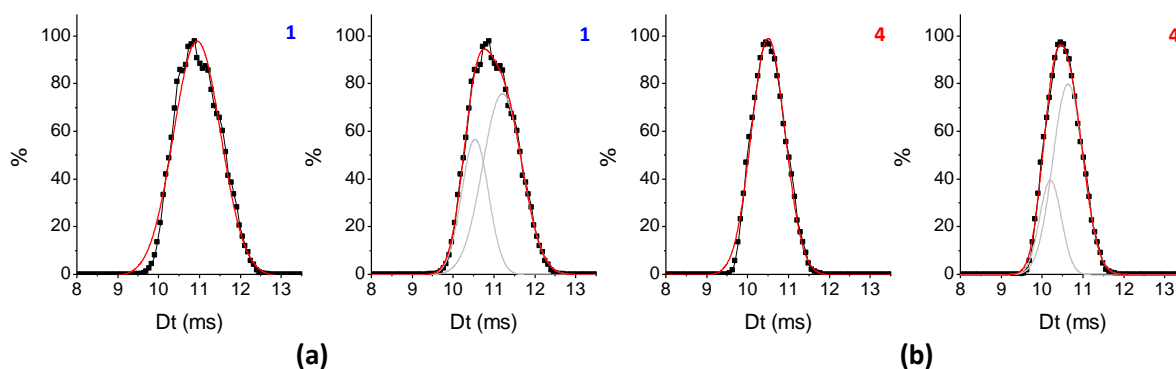


Figure 95 : Comparaison de l'extrapolation à une (gauche) ou deux gaussiennes (droite) des traces de mobilité ionique des isomères purifiés **1** (a) et **4** (b), dilués et poussés par un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH. Les données brutes sont représentées en noir (ligne + symbole), les gaussiennes en gris et la somme des gaussiennes en rouge (ligne).

Malgré la phase gazeuse et le nombre limité de paramètres pouvant induire la déformation des traces de mobilité, il est reporté que suivant les conditions expérimentales paramétrées, les traces de mobilité peuvent être déformées et présenter une asymétrie due à la diffusion hétérogène des ions dans la cellule de mobilité [185]. Ce phénomène peut notamment apparaître sur les traces de mobilité aux long temps de dérive. Afin de vérifier si les paramètres utilisés affectent la symétrie des traces de mobilité aux temps de dérive voisins de ceux des Lip $\beta$ CD analysées, la regression gaussienne des traces de mobilité du calibrant a été réalisée (Figure 96). Il est notable que malgré des temps de dérive voisins ou supérieurs, une unique gaussienne est suffisante à expliquer ces courbes expérimentales. Cette observation permet de confirmer que les deux gaussiennes nécessaires à la regression correcte des traces de mobilité des Lip $\beta$ CD sont réellement dues à la présence de différentes conformations non-résolues.

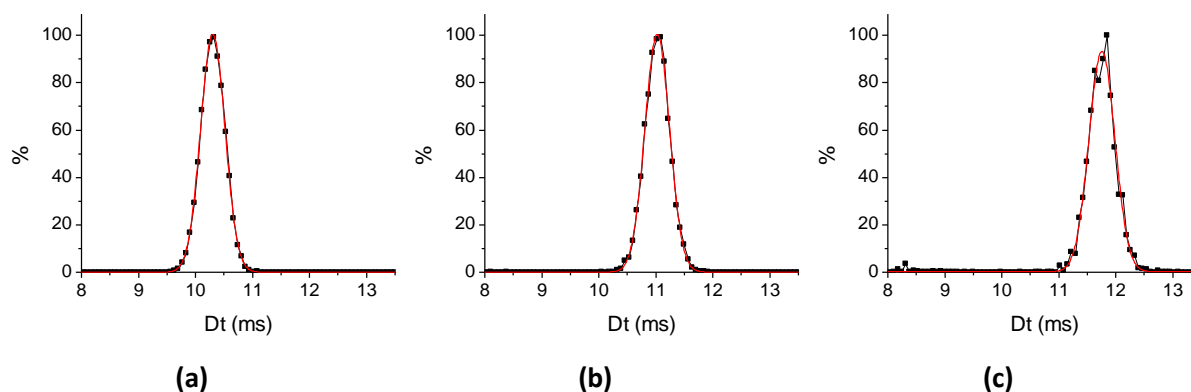


Figure 96 : Regression à une gaussienne des pics de mobilité ionique obtenus avec les ions présents dans le mélange utilisé pour la calibration des CCS, au temps de dérive voisin de ceux des LDCII. (a)  $m/z$  1721.96; (b)  $m/z$  1821.953; (c)  $m/z$  1921.95.

Néanmoins, pour cette étude de l'effet du solvant sur les traces de mobilité, une approximation des pics par une unique gaussienne sera réalisée pour obtenir une unique valeur de CCS, d'aire et de largeur à mi-hauteur (FWHM, Full Width at Half Maximum). Ces trois paramètres représentent en effet de bons descripteurs et permettent une comparaison chiffrée des traces de mobilité. Afin d'estimer l'erreur associée à cette approximation, la mesure du temps de dérive (i.e. centre des gaussiennes) obtenu avec une ou deux gaussiennes a été réalisée (Tableau 20). Le temps de dérive issu de deux gaussiennes est calculé par la moyenne des deux centres obtenus, pondérée par l'aire des gaussiennes respectives. Cette estimation de l'erreur a été effectuée sur l'ensemble des données obtenues, moyennée par CD et mise en relative avec la FWHM. Il est notable que cette erreur augmente en fonction de la FWHM, ce qui s'explique par une contribution nécessaire de deux fonctions lors de l'obtention d'un pic large. La différence mesurée est inférieure à 0.2%, ce qui sera par la suite pris en considération lors de l'interprétation des résultats.

Tableau 20 : Comparaison de la moyenne sur les 9 conditions des  $Dt$  obtenus par la regression par une ou deux gaussiennes, mise en relation avec la largeur du pic. L'écart est calculé comme étant la différence entre le  $Dt$  obtenu par une gaussienne et le  $Dt$  obtenu par la moyenne des deux gaussiennes, pondérée par leurs aires.

	$\overline{FWHM}_{1\text{ gauss}} \text{ (ms)}$	$\overline{\text{Ecart } Dt}_{1-2\text{ gauss}}$
<b><math>\alpha</math>CD</b>	0.41	0.05%
<b><math>\beta</math>CD</b>	0.48	0.04%
<b><math>\gamma</math>CD</b>	0.51	0.06%
<b>Isomère 1</b>	1.33	0.18%
<b>Isomère 4</b>	0.76	0.06%
<b>Isomère 10</b>	0.65	0.06%

Les paramètres descriptifs des traces de mobilité obtenus par regression étant la CCS (i.e. centre), la largeur à mi-hauteur (FWHM) et l'aire des pics, ces trois grandeurs ont été représentées sur un même graphique, à chaque condition d'analyse pour chaque CD analysée. L'aire est un indicateur de la réponse en MS de la molécule ionisée, dépendante de conditions de solvant et pouvant induire un élargissement des pics, son observation représente un moyen de contrôle pour l'interprétation des changements de FWHM. La Figure 97 reprend les résultats de l'analyse des trois CDs naturelles en fonction des conditions expérimentales. D'une part, il est notable que le solvant de dilution (1, 2, 3) n'a aucune influence significative sur les traces de mobilité pour ces trois CDs. D'autre part, le solvant de poussée semble influencer l'allure des traces de mobilité en fonction de la proportion de solvant organique (MeOH). Lors de l'utilisation de 50% de MeOH, les différences observées avec une poussée par H<sub>2</sub>O ne sont pas significatives. A l'inverse, l'utilisation de 100% de MeOH influence significativement les CCS mesurées, l'aire et la FWHM. Cette influence est d'autant plus prononcée avec la  $\gamma$ CD (CCS  $\pm 2 \text{ \AA}^2$ ), qui correspond à la structure la plus flexible des 3 CDs naturelles. L'augmentation conjointe de l'aire et de la FWHM implique une quantité ionisée supérieure, à priori liée au MeOH, mais le décalage du sommet des courbes (i.e. de CCS) indique une différence en terme de forme et de taille des ions analysés. Ces observations indiquent que la nature du solvant de poussée influence les traces de mobilité enregistrées, pouvant être interprétées par la détection de conformations différentes.

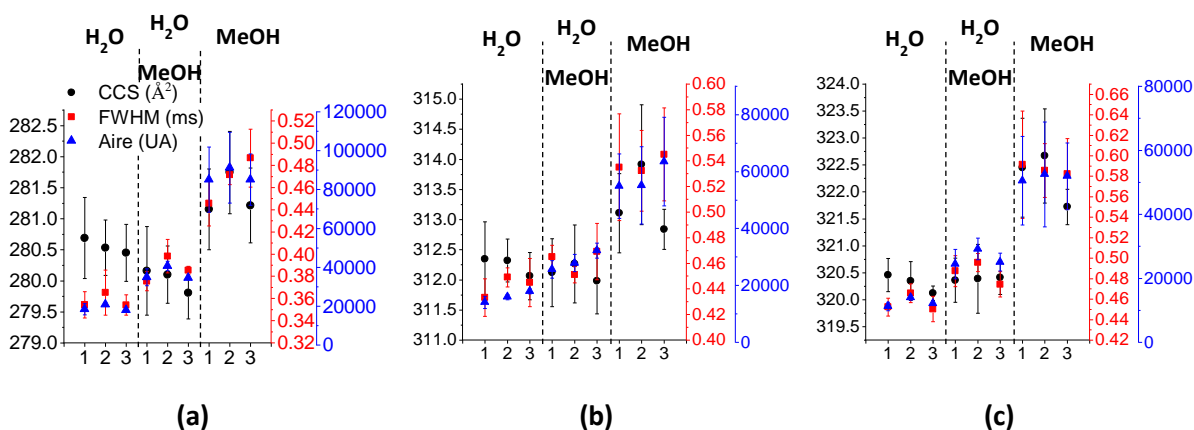


Figure 97 : Superposition des CCS (noir), de la largeur à mi-hauteur (rouge) et de l'aire (bleu), descriptifs des résultats issus de l'analyse IMS de l' $\alpha$ CD (a), la  $\beta$ CD (b) et la  $\gamma$ CD (c) par FIA dans différentes conditions de solvant. L'axe des abscisses correspond au solvant de dilution : 1= $H_2O$  ; 2=  $H_2O/MeOH$  ; 3= MeOH. La nature des solvants de poussée est indiquée en haut des graphiques.

De manière analogue, les résultats de ces analyses correspondant aux isomères **1** (OH3), **4** (OH6) et **10** (OH2) sont représentés sur la Figure 98. La tendance observée est similaire : le solvant de dilution n'a aucun effet sur les traces de mobilité et l'augmentation de la proportion de MeOH dans le solvant de poussée tend à augmenter les paramètres observés (CCS, FWHM et l'aire). Il est néanmoins notable que l'allure des courbes est modifiée dès 50 % de MeOH, de manière différente selon les isomères, une nouvelle fois sans changement de CCS. A 100% de MeOH, les différences de CCS observées sont plus grandes que lors de l'analyse des CDS naturelles ( $CCS \pm 3.5 \text{ \AA}^2$ ) en comparaison d'une poussée par 100% d' $H_2O$ .

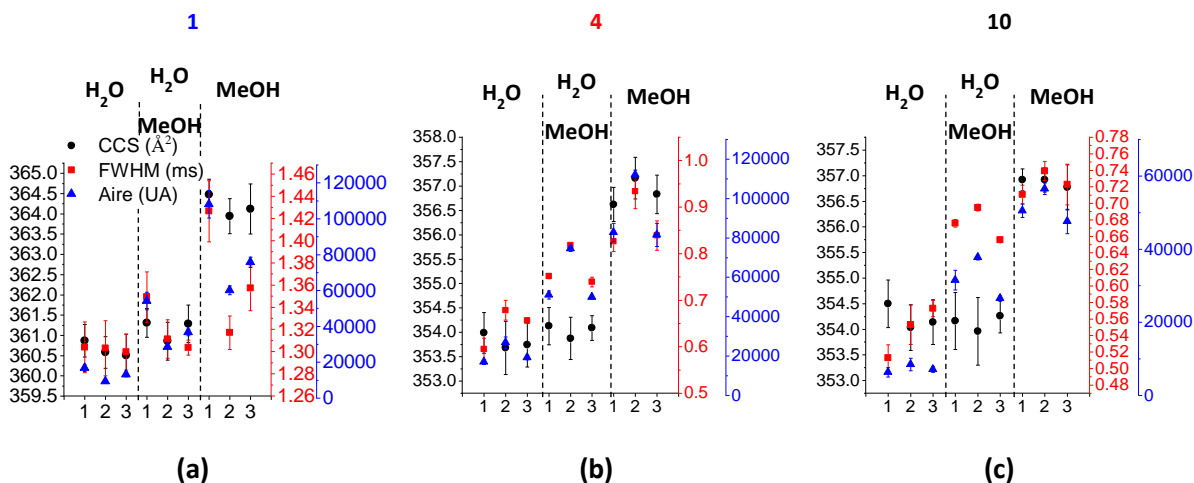


Figure 98 : Superposition des CCS (noir), de la largeur à mi-hauteur (rouge) et de l'aire (bleu), descriptifs des résultats issus de l'analyse IMS de l'isomère **1** (a), **4** (b) et **10** (c) par FIA dans différentes conditions de solvant. L'axe des abscisses correspond au solvant de dilution : 1= $H_2O$  ; 2=  $H_2O/MeOH$  ; 3= MeOH. La nature des solvants de poussée est indiquée en haut des graphiques.

Ces analyses apportent donc les deux informations suivantes :

- Le solvant de dilution, très minoritaire en comparaison du solvant de poussée, n'a aucune influence sur les traces de mobilité. D'une part cela indique que le changement de

conformation, s'il a lieu, est régie par une cinétique rapide lors du changement de milieu des CDs, l'arrivée de l'échantillon en FIA étant environ 0.2 min après l'injection de l'échantillon. D'autre part, cette observation permet de s'affranchir d'un choix de solvant de dilution lors de l'analyse de CDs et de leurs dérivés amphiphiles par mobilité ionique (par FIA ou HPLC).

- Le solvant de poussée, représentatif du solvant utilisé lors d'une analyse par chromatographie a une influence sur les traces de mobilité. Cette différence ne porte que sur l'allure des courbes et le facteur réponse des ions analysés lorsque la poussée est effectuée avec 100% d'H<sub>2</sub>O ou 50% de MeOH. Lors de l'utilisation de 100% de MeOH, la CCS est également impactée par ce changement de solvant. L'ordre de grandeur de cette différence est relativement faible, compris entre 2 et 4 Å<sup>2</sup>, respectivement pour les CDs naturelles et les LipβCD analysées. Toutefois, cet écart observé mis en relation avec les différences de CCS mesurés entre les 12 isomères de LipβCD est significatif.

Afin d'observer cet effet de solvant de poussée, en terme de traces de mobilité, la Figure 99 reprend les courbes obtenues par l'analyse de l'isomère **4** et de la βCD, dilués dans H<sub>2</sub>O/MeOH et poussés par les trois conditions étudiées. Les différences entre les CDs naturelles et les LipβCD, lors de la poussée par H<sub>2</sub>O/MeOH, sont mises en évidence par la nécessité d'utiliser deux gaussiennes significatives dans le cas de l'isomère de LipβCD. A l'inverse, la courbe correspondant à la βCD est presque symétrique, la deuxième gaussienne ayant été ajoutée à titre comparatif, semblant corriger le manque de résolution de ces analyses (faible nombre de points). De plus, lors de la poussée à 100% de MeOH, il est notable que la largeur et l'asymétrie des pics augmentent, tant pour la βCD que pour l'isomère **4** de LipβCD.



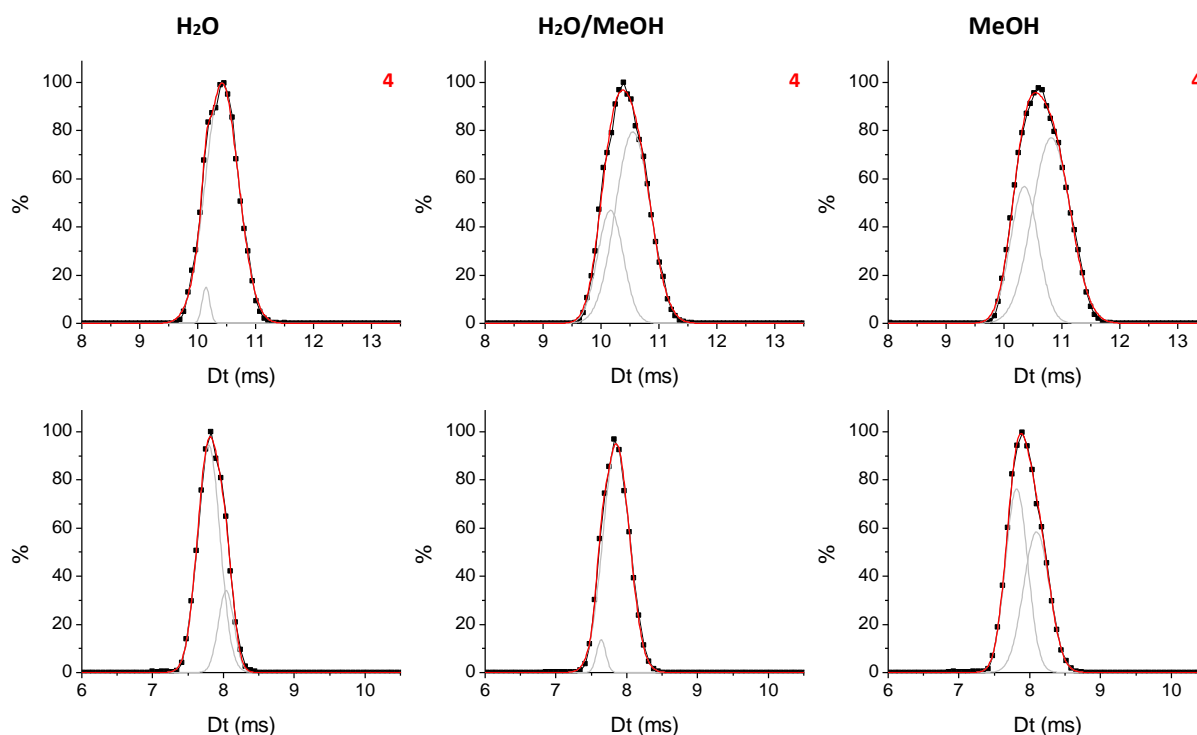


Figure 99 : Traces de mobilité ionique obtenues par l'analyse de solution contenant l'isomère **4** (haut) ou la  $\beta$ CD (bas) dilués dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (50 – 50) et poussés par H<sub>2</sub>O (100%, gauche), H<sub>2</sub>O/MeOH (50/50, centre) ou MeOH (100%, droite). Les données brutes sont représentées en noir (ligne + symbole), les gaussiennes en gris et la résultante en rouge (lignes).

Cette différence d'influence de la nature du solvant sur les traces de mobilité des CDs naturelles et des Lip $\beta$ CD peut s'interpréter par une différence de flexibilité des structures, l'oléate de méthyle ajoutant une fonction mobile à la  $\beta$ CD rigide.

Suite à ces résultats, l'analyse par FIA des 11 fractions contenant les isomères **1** à **10** purifiés et le mélange des isomères **11-12**, dilués et poussés par le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH a été réalisée. Mis en comparaison avec les CCS obtenus par l'analyse du mélange séparé par UHPLC, la Figure 100 montre que les conditions chromatographiques utilisées dans cette étude n'ont pas d'influence significative sur les CCS des Lip $\beta$ CD de DS1. Il est à noter que la regression de la trace de mobilité correspondant au mélange des isomères **11-12** a été réalisée par une unique gaussienne (i.e. une valeur de CCS), expliquant que la CCS correspondante se situe à l'intermédiaire des CCS des isomères **11** et **12** analysés par UHPLC. Ces résultats peuvent être expliqués par le gradient utilisé qui permet l'élution de l'isomère **1** à une composition de phase mobile de 40 % en MeOH et l'isomère **12** à 68 % de MeOH, ne générant qu'une faible variation de composition de phase mobile entre les isomères.

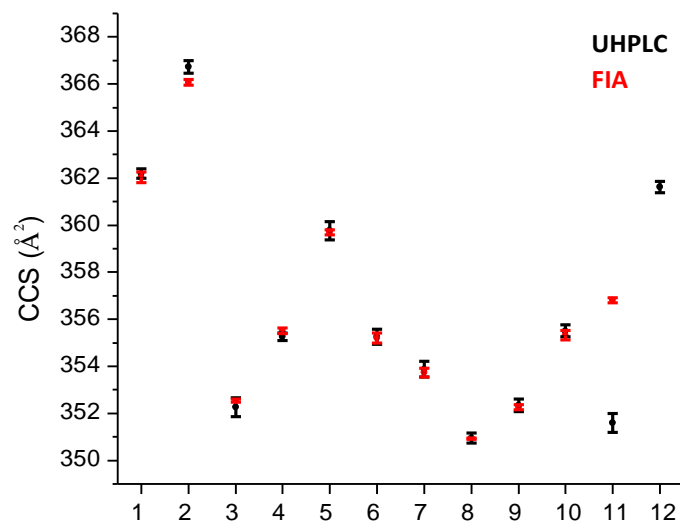


Figure 100 : Comparaison des CCS mesurées lors de l'analyse du mélange par LC en amont (noir) ou lors de l'analyse par FIA des isomères purifiés solubilisés et poussés avec le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH (rouge).

Cette étude a permis de mettre en évidence que la nature du solvant, et donc les modifications de composition des phases mobiles utilisées lors de gradients en chromatographie, peuvent avoir une influence sur les traces de mobilité, en terme de forme et de CCS. Les conditions chromatographiques nécessaires à séparer les 12 isomères de DS1 de LipβCD génère une modification du pourcentage de MeOH dans la phase mobile faible entre l'élution du premier et du dernier isomère, de 28%. Pour cette raison, ces conditions chromatographiques n'ont pas d'influence sur les CCS mesurées, indiquant que nos conditions expérimentales sont appropriées à l'utilisation d'un classement des CCS pour comparer les données expérimentales et théoriques. Cependant, il paraît important de préciser que lors de l'utilisation de gradient plus fort, la composition de la phase mobile pourrait impacter les CCS mesurées, et donc influencer le classement nécessaire à l'attribution des structures par comparaison avec des données théoriques.

### II.2.4.3. Validation de l'attribution par RMN

#### II.2.4.3.1. Similarités des spectres RMN $^1\text{H}$

La purification des isomères permet de réaliser des expériences RMN sur des produits isolés, facilitant leur caractérisation. Dans un premier temps, l'acquisition des spectres RMN  $^1\text{H}$  des 11 échantillons a été réalisée, correspondant aux 10 isomères purs (**1** à **10**) et au mélange des isomères **11-12**. Pour des raisons de solubilité, les échantillons ont été préparés dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, auquel 2% de D<sub>2</sub>O a été ajouté afin d'échanger les H labiles et de simplifier les spectres. Comme observé précédemment avec les spectres MS/MS, il est notable que certains spectres RMN  $^1\text{H}$  sont similaires (Figure 101, haut), menant une nouvelle fois à la formation de 3 groupes. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  représentatifs de ces trois groupes sont présentés Figure 101, bas.

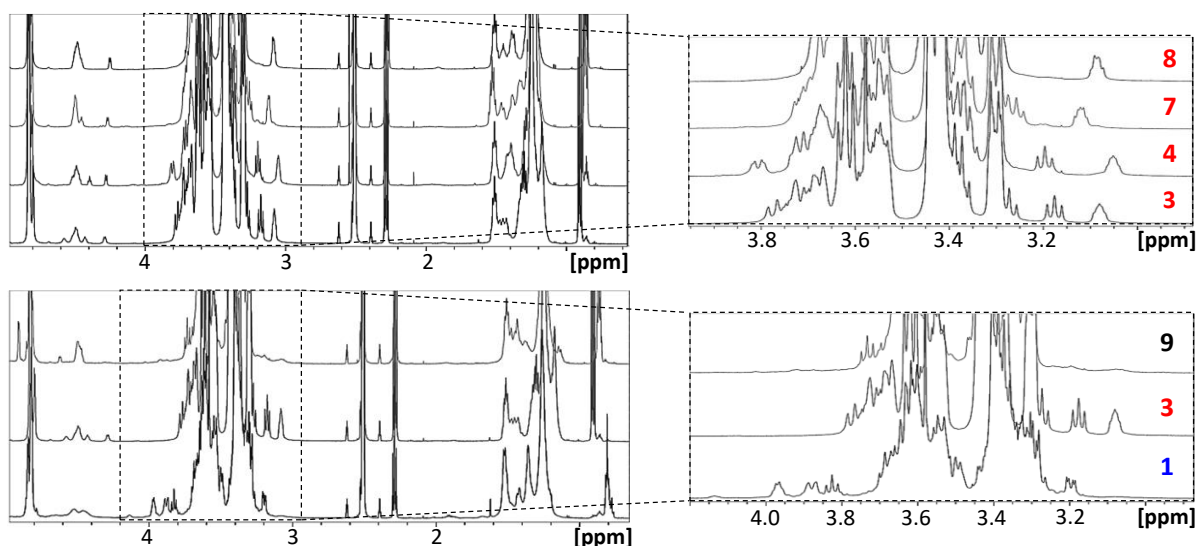


Figure 101 : (Haut) Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2 v/v, 298 K) des isomères **3**, **4**, **7** et **8** appartenant à un même groupe déterminé par fragmentation MS/MS. L'agrandissement de la région spectrale (2.9 – 3.9 ppm) met en évidence la similarité des spectres appartenant à un même groupe. Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2 v/v, 298 K) des isomères **1**, **3**, **9** appartenant chacun à un groupe différent déterminé par fragmentation MS/MS. L'agrandissement de la région spectrale (2.9 – 4.2 ppm) met en évidence la différence entre les spectres appartenant à un groupe différent.

De manière analogue à la démarche employée précédemment avec les spectres MS/MS, une analyse en composante principale a été mise en place. A l'aide de NMRProcFlow [189], les spectres RMN ont été phasés, les lignes de base corrigées, puis les fréquences de résonance contenant des signaux ont été automatiquement découpées en fenêtre de 0.04 ppm (à l'exception des signaux des solvants et des OH partiellement échangés). Chaque fenêtre a ensuite été automatiquement intégrée. Afin de corriger les écarts expérimentaux de concentration (i.e. d'intégration en valeur absolue), la valeur d'intégration des fenêtres a été normalisée par la somme des intégrations, pour chaque isomère. Enfin, le scaling Unit-Variance (UV, centré puis réduit par l'écart-type) a été utilisé, afin de lisser l'influence de chaque fenêtre sur la construction de l'ACP. Ce scaling est indispensable afin d'accorder autant

d'importance aux signaux correspondant à un proton (e.g. H<sub>CD</sub>) qu'à ceux correspondant à deux ou trois protons (e.g. CH<sub>2</sub> oléate et CH<sub>3</sub> oléate). Dans ces conditions, le résultat de l'ACP ne sera basé que sur la différence de déplacement chimique entre chaque spectre. La Figure 102 reprend le résultat de l'ACP et le regroupement des spectres <sup>1</sup>H selon les groupes formés précédemment par MS/MS et en accord avec l'ACP. Il est notable que les pourcentages de variances expliquées par les composantes principales (CP) 1 et la CP2 sont relativement faibles, respectivement de 25.6 % et de 18.8 %. A titre indicatif les CP3 et CP4 illustrent respectivement 16.1 % et 13.8 % de la variance, comblant en partie la description incomplète de la variance par cette ACP. Pour ces raisons, le regroupement représenté est moins prononcé que précédemment lors de l'utilisation des spectres MS/MS. Néanmoins, le groupe rouge est regroupé selon la CP1, le groupe noir par les CP1 et 2. Seul le groupe bleu est dispersé selon les deux CP représentées, une observation également réalisée précédemment au regard des traces de mobilité ionique et de l'ACP basée sur la MS/MS.

L'interprétation du placement des isomères sur l'ACP par l'observation des loadings est délicate en raison du nombre élevé de variables (égal au nombre de fenêtres de 0.04 ppm), représentant une limite de cette approche. Après une analyse approfondie des spectres, le niveau de pureté des isomères est probablement à l'origine du regroupement moins défini et de la description de 74.3% de la variance par 4 CP (en comparaison de l'ACP basée sur les spectres MS/MS). En effet, certains isomères aux temps de rétention voisins sont détectés en faible quantité et donc intégrés (e.g. l'isomère **3** contient une faible quantité de l'isomère **4**). Cette intégration crée un rapprochement, lié aux impuretés, entre les isomères élués à des temps de rétention voisin, instaurant un biais dans les résultats de cette ACP.

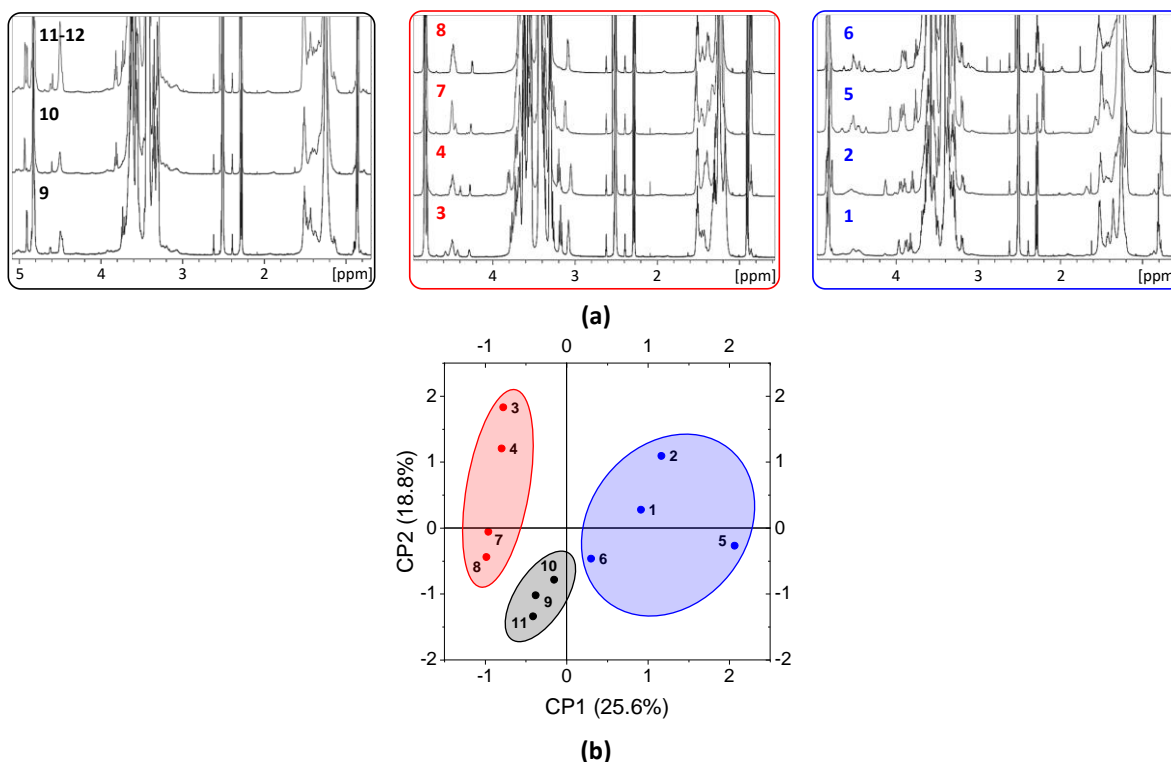


Figure 102 : (a) Regroupement des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 98/2, 298 K) des isomères selon les groupes déterminés précédemment par MS/MS, en accord avec les proximités observées sur l'ACP dont le score plot est représenté (b).

Cette approche d'analyse de spectres RMN  $^1\text{H}$  d'isomères par ACP peut donc permettre une comparaison rapide mais présente certaines limites. D'une part le nombre de variables rend difficile l'interprétation de loadings. D'autre part, la pureté des échantillons est un critère déterminant à l'observation des informations recherchées, dans notre cas l'ACP ayant mis en exergue la présence d'impuretés dans les échantillons analysés. Afin de pallier ce problème, un approfondissement du prétraitement des données peut être envisagé, par exemple la définition d'un niveau de bruit ou le changement de la largeur des fenêtres de découpage. Néanmoins, il est notable que ce regroupement effectué par comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  est identique à celui réalisé par comparaison des spectres MS/MS, confirmant la similitude structurale des isomères au sein de chaque groupe.

#### II.2.4.3.2. Identifications des signaux et attribution des régioisomères

Afin de pouvoir interpréter, du point de vue structural, tout signal et variations de déplacement chimique, l'identification des signaux  $^1\text{H}$  des isomères de DS1 de Lip $\beta$ CD est une première étape nécessaire. A titre illustratif, la démarche employée sera détaillée pour l'isomère **3**, attribué à une position de greffage en position OH6 de la  $\beta$ CD. La Figure 103 reprend le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'isomère **3**. En raison de la perte de symétrie liée au greffage de l'oléate de méthyle, les glucoses de la  $\beta$ CD et leurs protons sont devenus inéquivalents, générant une grande quantité de signaux ayant une faible dispersion spectrale. Pour cette raison, la mise en œuvre de différentes expériences RMN 2D est nécessaire à la détermination des déplacements chimiques des protons des Lip $\beta$ CD.

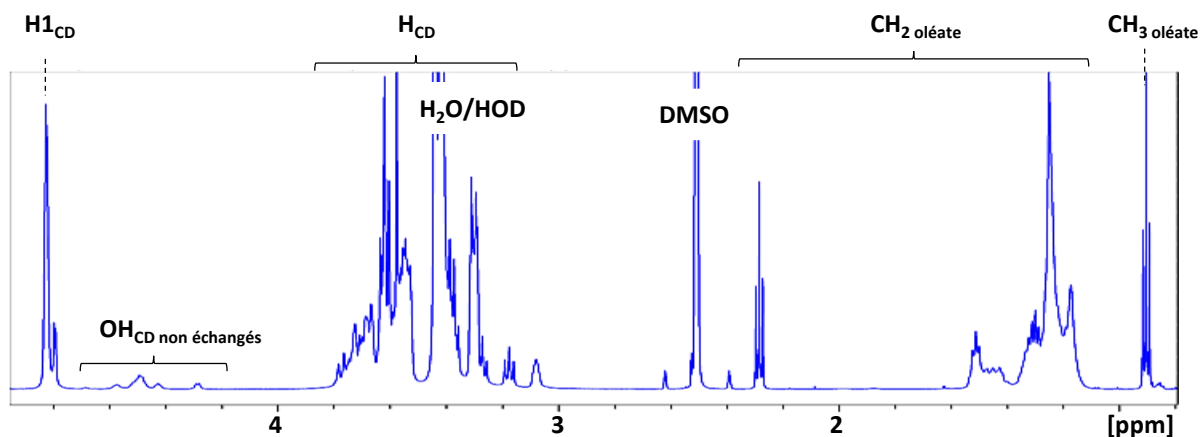


Figure 103 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 98/2, 298 K) de l'isomère 3 (OH6).

Afin d'identifier le déplacement chimique des deux protons de l'oléate de méthyle ( $\text{H}_{9\text{oléate}}$  et  $\text{H}_{10\text{oléate}}$ ) portés par les carbones tertiaires  $\text{C}_{9\text{oléate}}$  et  $\text{C}_{10\text{oléate}}$  (cf Schéma 15, p. 157), l'expérience COSY a été effectuée (Figure 104). Réalisée dans le DMSO- $d_6$  pur pour observer les OH, cette expérience a permis d'observer les couplages impliquant l'alcool de l'oléate de méthyle ainsi que les couplages entre les deux CH et les  $\text{CH}_2$  de la chaîne lipidique. Cette expérience a donc mené à l'identification des signaux des H portés par le carbone greffé (ici  $\delta = 3.091$  ppm) sur la  $\beta\text{CD}$  et du CH non greffé, dont le signal est masqué sur les spectres  $^1\text{H}$  par ceux de la  $\beta\text{CD}$  (ici  $\delta = 3.414$  ppm).

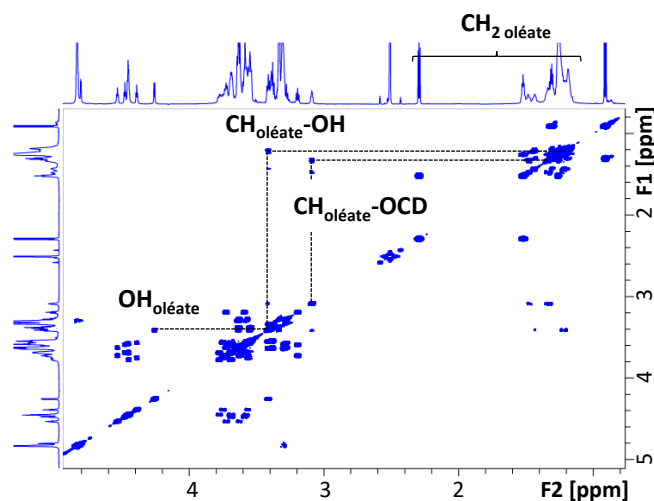


Figure 104 : Expérience RMN COSY (900 MHz, DMSO- $d_6$ , 298 K) de l'isomère 3.

La détermination des déplacements chimiques des protons de la  $\beta\text{CD}$  a été réalisée par l'observation des couplages impliquant les  $\text{H}_{1\text{CD}}$ , isolés ( $\delta = 4.8$  ppm). Les expériences COSY, COSY relayées une et deux fois ont permis respectivement l'observation des corrélations entre  $\text{H}_{1\text{CD}}$  et  $\text{H}_{2\text{CD}}$ ,  $\text{H}_{3\text{CD}}$  et  $\text{H}_{4\text{CD}}$ . Les protons aux différentes positions étant inéquivalents entre chaque unité glucose, des fenêtres spectrales correspondant à ces protons ont été obtenues. Ces fenêtres de déplacements chimiques ont ensuite offert la possibilité d'attribuer les cartes 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  obtenues via l'expérience HSQC éditée

DEPT-135 (Figure 105). Les deux dimensions de cette expérience permettent de déconvoluer les spectres  $^1\text{H}$ , notamment les signaux correspondant aux protons  $\text{H}_{3\text{CD}}$ ,  $\text{H}_{5\text{CD}}$  et  $\text{H}_{6\text{CD}}$  d'une part, et les  $\text{H}_{2\text{CD}}$  et  $\text{H}_{4\text{CD}}$  d'autre part.

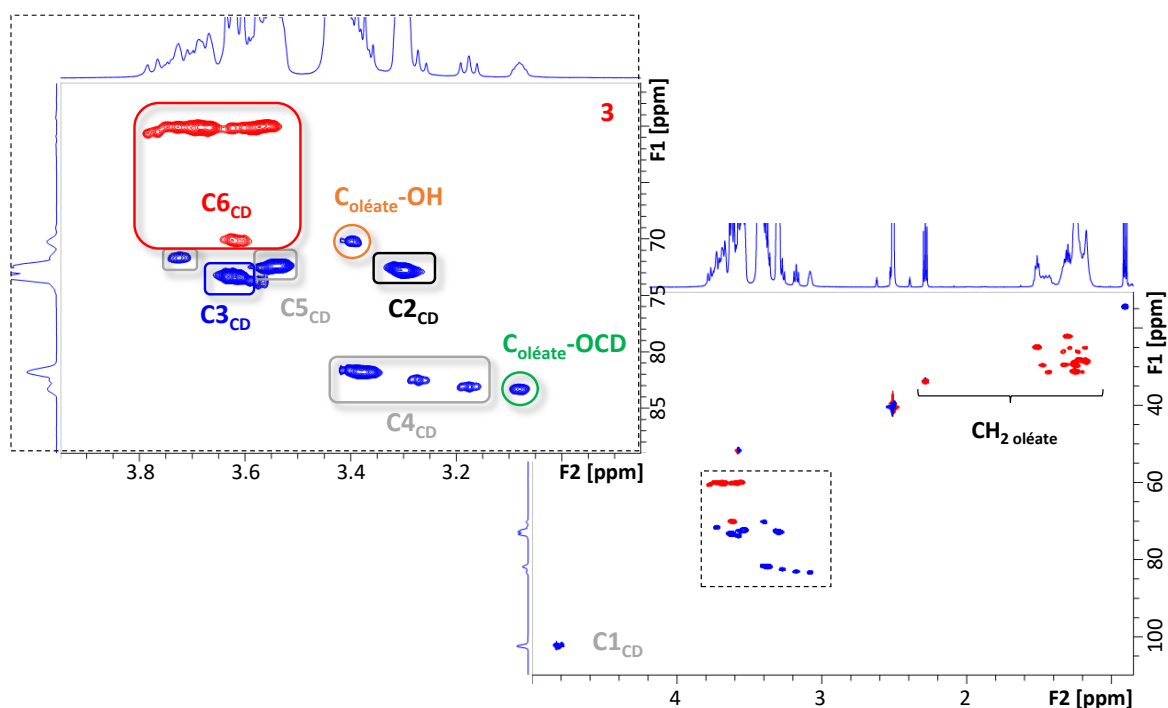


Figure 105 : Expérience HSQC éditée (600 MHz, DMSO-d6/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K) de l'isomère **3**, complète (droite) et agrandie sur la zone spectrale d'intérêt (gauche).

Cette attribution ayant été réalisée sur l'ensemble des isomères, les expériences HSQC ont révélé des similarités et des différences entre chaque isomère. D'une part, le carbone greffé de l'oléate de méthyle, identifié par l'expérience COSY, est déblindé ( $\Delta\delta(^{13}\text{C}) \approx 15$  ppm) en comparaison du carbone voisin non-greffé (i.e. portant l'hydroxyle généré par l'ouverture de l'époxyde), appuyant l'attribution de cette position greffée. D'autre part, le signal d'un carbone de la CD est particulièrement déblindé, et sa position varie selon l'isomère analysé. Le déblindage d'un unique carbone représente la preuve du greffage de l'oléate de méthyle en position OH2, OH3 ou OH6 d'un glucose de la  $\beta\text{CD}$  [190,191]. La Figure 106 reprend les expériences HSQC éditées des isomères **1** (groupe bleu OH3), **3** (groupe rouge OH6) et **9** (groupe noir OH2) mettant en évidence un déblindage caractéristique, respectivement d'un unique  $\text{C}_{3\text{CD}}$ ,  $\text{C}_{6\text{CD}}$  et  $\text{C}_{2\text{CD}}$ . Ces déblindages caractéristiques ont été observés pour chaque isomère au sein des trois groupes d'isomères de position déterminés par la MS/MS et sont cohérents avec l'attribution réalisée grâce à la mobilité ionique. Les Figure 107, Figure 108 et Figure 109 reprennent les HSQC éditées de tous les isomères, permettant la validation de l'attribution réalisée précédemment sans étape de purification.

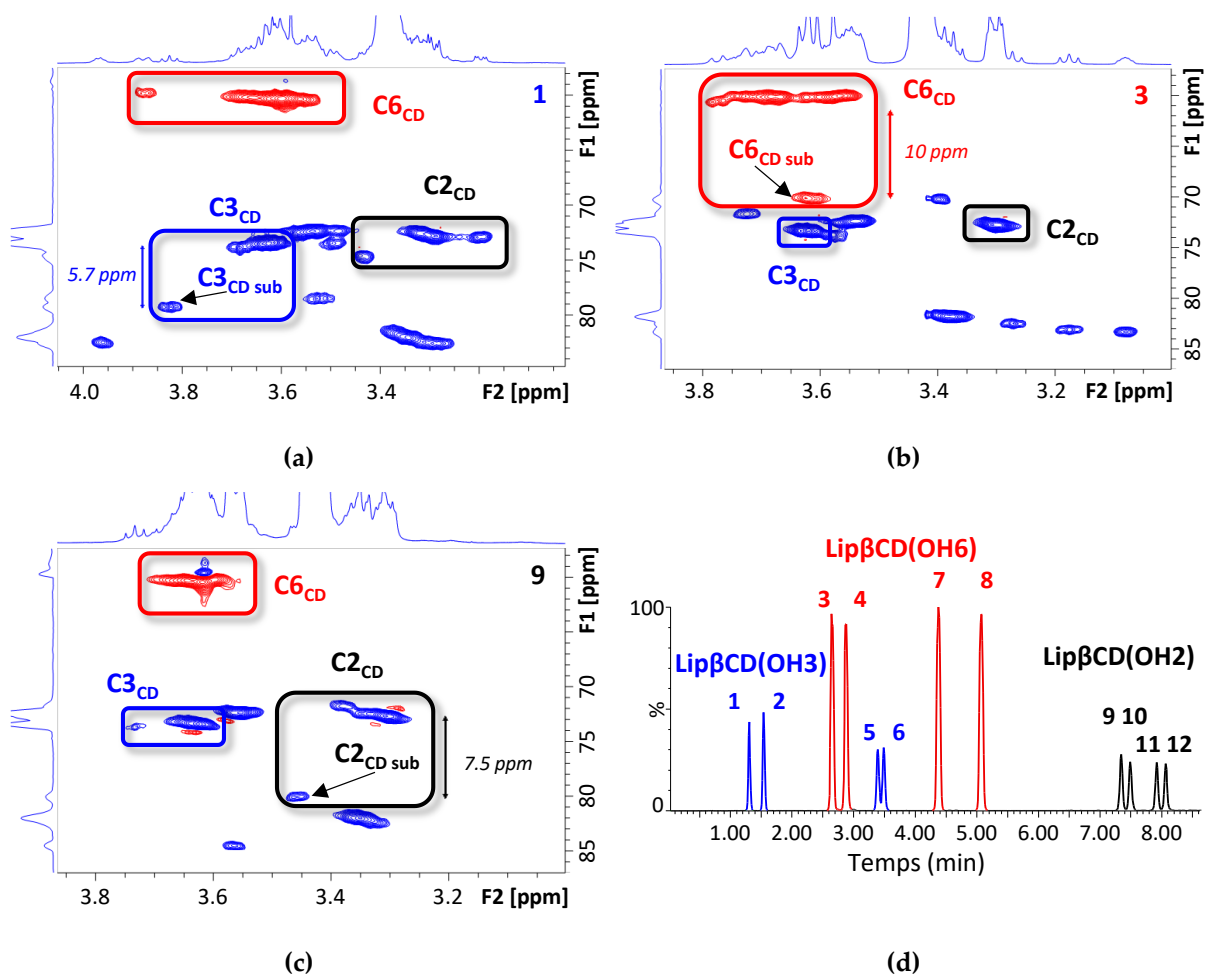
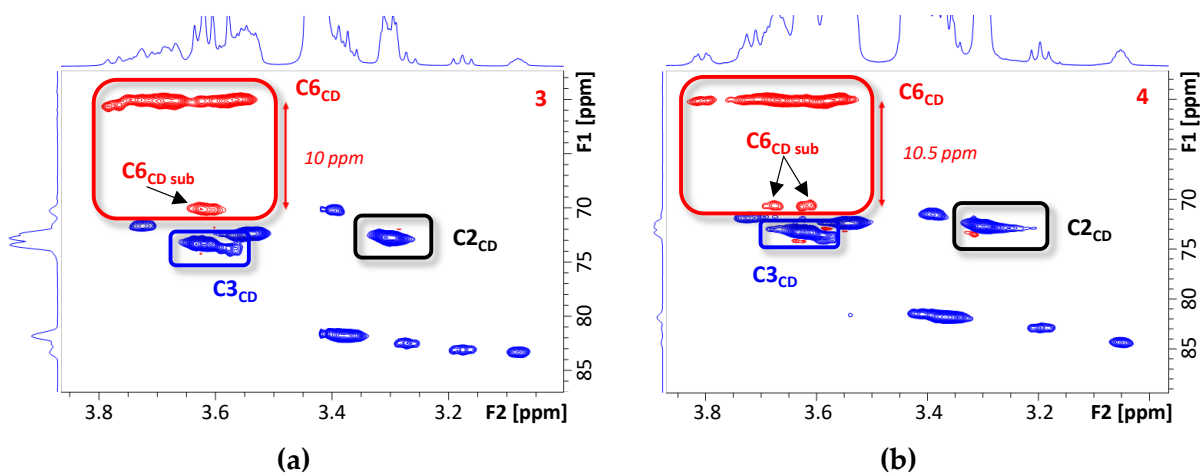


Figure 106 : Expériences RMN HSQC partielles (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K) des isomères 1 (a), 3 (b) et 9 (c) correspondant à trois positions de greffage différentes (OH3, OH6 et OH2). (d) Attribution des positions de greffage de l'oléate de méthyle sur la BCD réalisée grâce aux expériences HSQC, en accord avec celles déterminées précédemment par mobilité ionique.





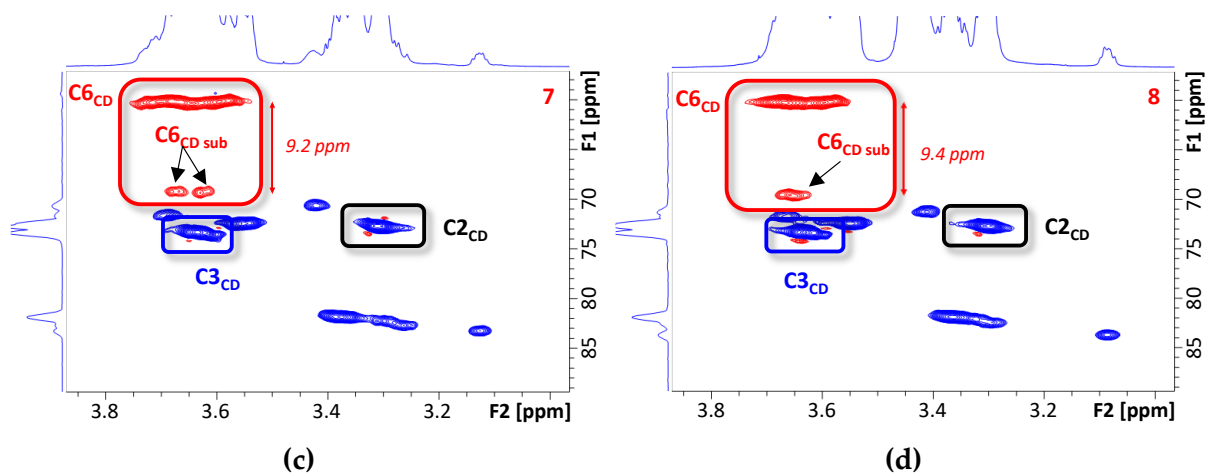


Figure 107 : Expériences RMN HSQC partielles (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K) des isomères 3 (a), 4 (b), 7 (c) et 8 (d) appartenant au groupe rouge et déterminés comme étant greffés en position OH6 grâce à la mobilité ionique et la comparaison des CCS<sub>exp</sub> avec les CCS<sub>th</sub>.

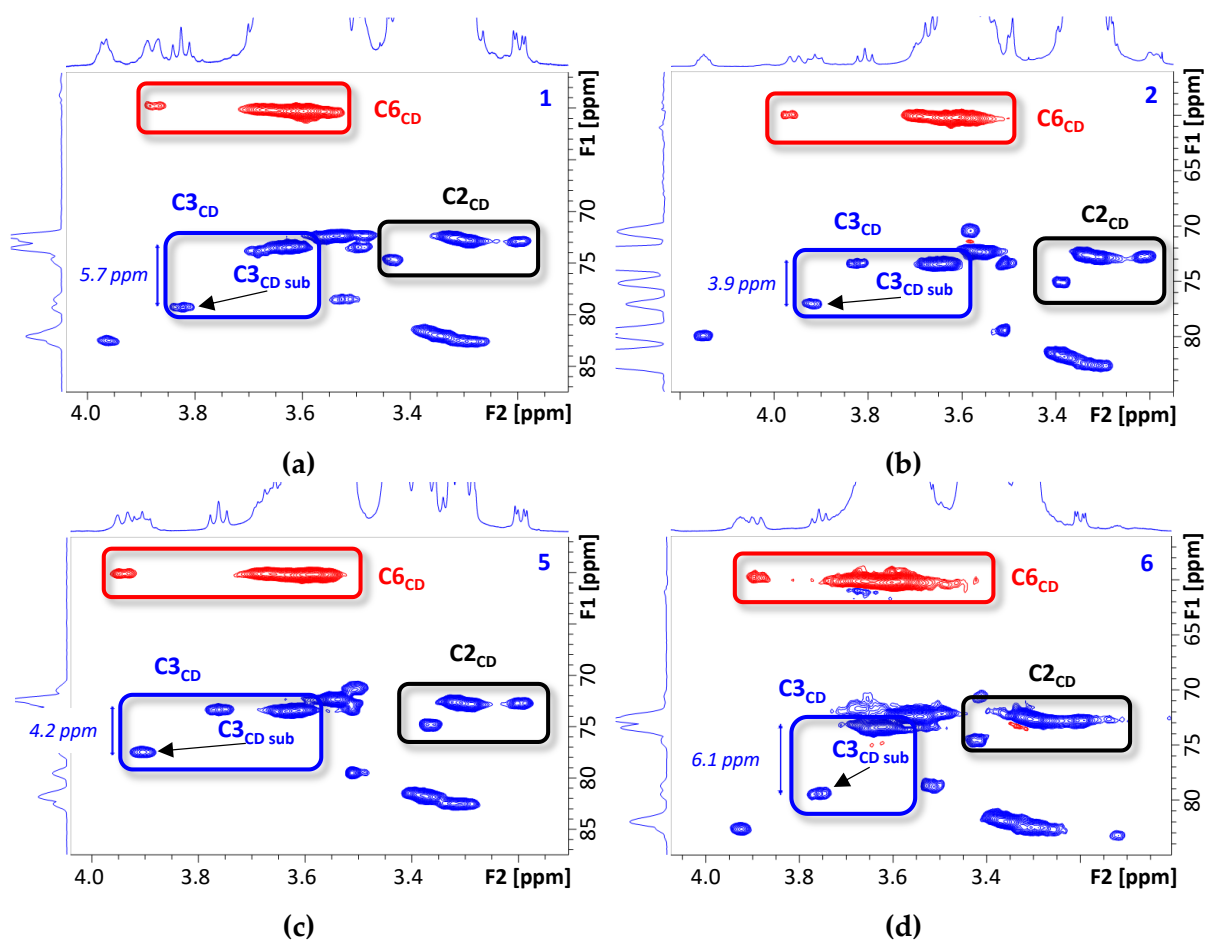


Figure 108 : Expériences RMN HSQC partielles (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K) des isomères 1 (a), 2 (b), 5 (c) et 6 (d) appartenant au groupe bleu et déterminés comme étant greffés en position OH3 grâce à la mobilité ionique et la comparaison des CCS<sub>exp</sub> avec les CCS<sub>th</sub>.

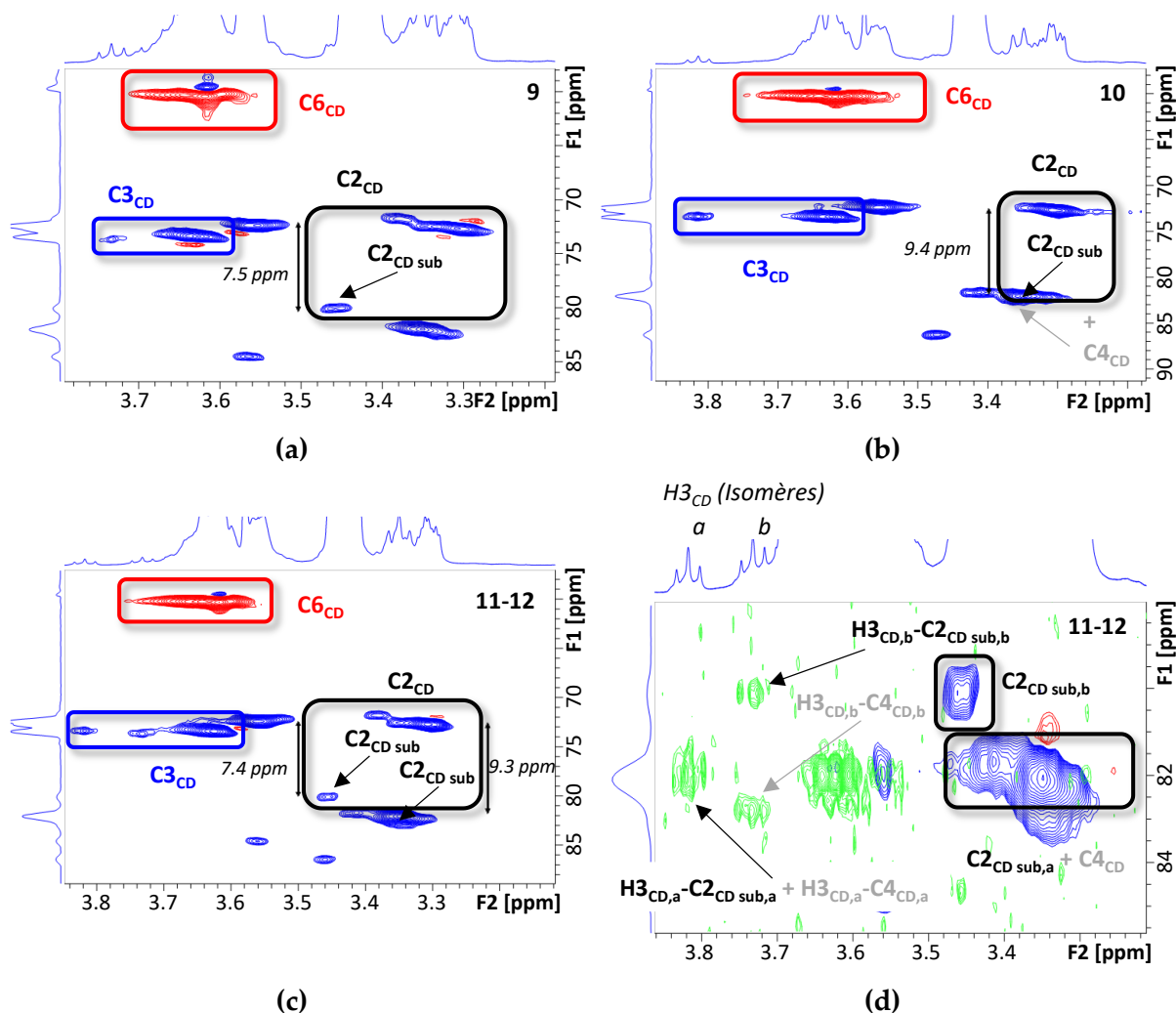


Figure 109 : Expériences RMN HSQC partielles (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K) des isomères **9** (a), **10** (b) et **11-12** (c) appartenant au groupe noir et déterminés comme étant greffés en position OH2 grâce à la mobilité ionique et la comparaison des  $CCS_{exp}$  avec les  $CCS_{th}$ . (d) Superposition des expériences HSQC (bleu) et HMBC (vert) réalisées sur le mélange d'isomères **11-12**.

Il est à noter que la résolution de ces expériences HSQC n'a pas permis l'observation de la corrélation  $^1H$ - $^{13}C$  du carbone en position substituée de l'isomère **10** (Figure 109 (b)). En effet, les déplacements chimiques des  $H4_{CD}$  et des  $H2_{CD}$  sont proches et celui du  $C2_{CD}$  substitué proche des  $C4_{CD}$ , l'expérience HSQC ne peut donc pas déconvoluer ces signaux.

L'expérience HMBC a été réalisée sur le mélange **11-12** pour observer les corrélations  $H3_{CD}$ - $C2_{CD sub}$  des isomères **11** et **12** (Figure 109 (d)). Elle a montré une unique tache de corrélation, large, entre le proton  $H3_{CD}$  de l'unité substituée et les  $C4_{CD}$  dans le cas d'un isomère (arbitrairement nommé *a*). L'autre isomère (nommé *b*) permet l'observation de deux corrélations distinctes, d'une part entre le  $H3_{CD}$  de l'unité substituée et le  $C2_{CD sub}$  et d'autre part avec un  $C4_{CD}$ . La taille de la tache de corrélation observée avec l'isomère *a* est significativement plus large, indiquant la présence de plusieurs corrélations non résolues, appuyant l'hypothèse de la présence du  $C2_{CD sub}$  aux mêmes déplacements chimiques (proton et carbone) que les  $C4_{CD}$ .

Afin d'appuyer cette attribution de position de greffage déduite de variations de déplacements chimiques, l'observation d'autres couplages longues distances par HMBC entre l'oléate et le  $\beta$ CD serait idéale. Néanmoins, la faible sensibilité de cette expérience et sa dépendance aux constantes de couplage n'ont pas permis l'observation de tous les couplages longues distances recherchés. Pour cela, une mise au point des conditions d'analyse pour chaque isomère serait nécessaire, dont la recherche de la  $^3J_{1H-13C}$ . La Figure 110 (a) présente une expérience HMBC réalisée avec l'isomère **8** (OH6) sur laquelle un couplage est observé entre le H porté par le carbone greffé de l'oléate de méthyle et le C6<sub>CD</sub> déblindé. Une autre approche est de rechercher une proximité spatiale entre les protons situés sur les positions substituées, de l'oléate de méthyle et de la  $\beta$ CD. A titre illustratif, la Figure 110 (b) reprend partiellement une expérience ROESY (isomère **1**, OH3) sur laquelle une corrélation dipolaire est observée entre le H3<sub>CD</sub> en position substitué et le H<sub>oléate</sub> porté par le carbone greffé de l'oléate de méthyle.

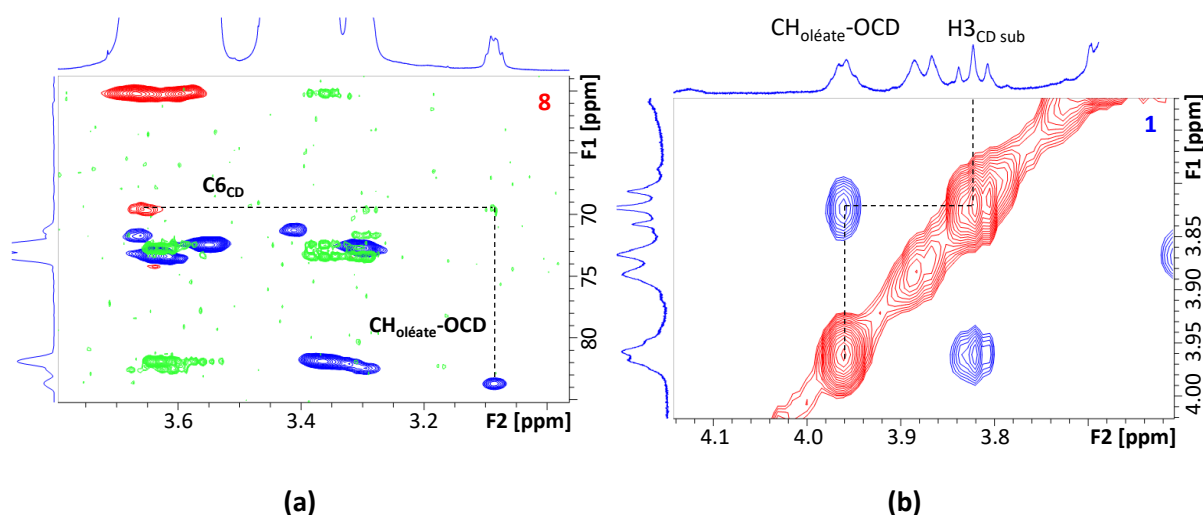


Figure 110 : (a) Superposition des expériences RMN 2D partielles HSQC éditée et HMBC (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K) de l'isomère **8** (greffage en position OH6) mettant en évidence la corrélation entre le C6<sub>CD</sub> substitué et le H<sub>oléate</sub> porté par le carbone greffé de l'oléate de méthyle. (b) Expérience ROESY 2D partielle (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K,  $t_m = 800$ ms) de l'isomère **1** (greffage en position OH3).

Néanmoins, l'ensemble des informations obtenues par les analyses RMN des isomères purifiés a permis de valider l'attribution des régioisomères réalisée par la mobilité ionique, constituant la deuxième étape de validation de la méthode.

## II.2.5. Caractérisation approfondie : Positions de greffage et conformations

### II.2.5.1. Position de greffage sur l'oléate de méthyl

Afin d'étudier si les positions de greffage sur l'oléate de méthyle créent une tendance en terme de temps de rétention (chromatographie) et /ou de CCS (mobilité ionique), leur détermination a été réalisée par RMN. Pour ce faire, l'expérience TOCSY (Total Correlation SpectroscopY) a été réalisée afin

d'observer des corrélations entre protons d'un même système de spins grâce aux transferts de magnétisation. Certains signaux  $^1\text{H}$  de l'oléate de méthyle sont isolés et résolus, notamment le  $\text{CH}_3$  de la chaîne lipidique ( $\delta = 0.7 - 0.95$  ppm) et le  $\text{CH}_2$  lié à l'ester méthylique ( $\delta = 2.17 - 2.32$  ppm). L'objectif est donc d'observer des corrélations entre ces  $^1\text{H}$  isolés et les  $^1\text{H}$  des carbones tertiaires, portant soit l'hydroxyle généré par l'ouverture de l'époxyde (carbone non-greffé), soit la  $\beta\text{CD}$  (carbone greffé). La nature substituée ou non de ces deux carbones étant identifiée, l'observation des taches de corrélation permettra de déterminer si le greffage de la  $\beta\text{CD}$  a eu lieu en  $\text{C9}_{\text{oléate}}$  ou en  $\text{C10}_{\text{oléate}}$ .

Le temps de mélange  $t_m$  utilisé par cette expérience a été optimisé pour observer les taches de corrélation entre ces protons très éloignés, séparés par 9 ( $\text{H2}_{\text{oléate}}\text{-H9}_{\text{oléate}}$ ) et 10 liaisons ( $\text{H18}_{\text{oléate}}\text{-H10}_{\text{oléate}}$ ). L'utilisation d'un long temps de mélange ( $t_m = 160$  ms) a permis l'observation de ces corrélations, absentes à un  $t_m$  de 100 ms (Figure 111). De plus, il est notable que ces conditions offrent la possibilité d'obtenir les corrélations recherchées sans observer celles correspondant à une liaison supplémentaire ( $\text{H2}_{\text{oléate}}\text{-H10}_{\text{oléate}}$  et  $\text{H18}_{\text{oléate}}\text{-H9}_{\text{oléate}}$ ).

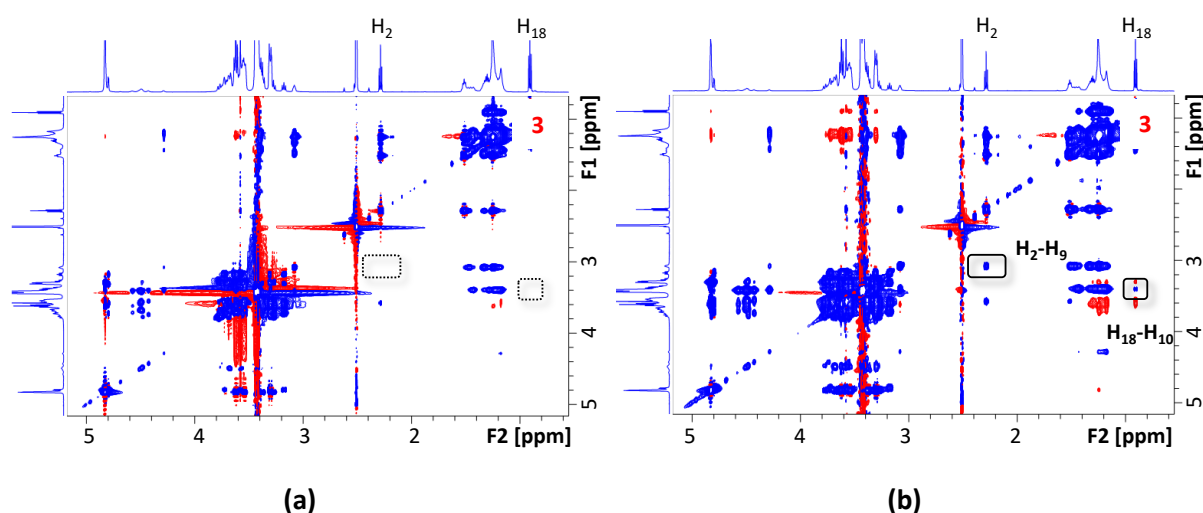


Figure 111 : Expérience RMN 2D TOCSY (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  98/2, 298 K) de l'isomère **3** (OH6) réalisée avec un temps de mélange  $t_m = 100$  ms (a) ou de  $t_m = 160$  ms (b), mettant en évidence l'observation de nouvelles corrélations avec un temps de mélange plus long (encadrés noir).

A titre illustratif, la Figure 112 reprend la différenciation de position de greffage de la  $\beta\text{CD}$  sur l'oléate de méthyle pour les isomères **3** et **4** (OH6), déterminés comme étant respectivement greffés en  $\text{C9}_{\text{oléate}}$  et  $\text{C10}_{\text{oléate}}$ .

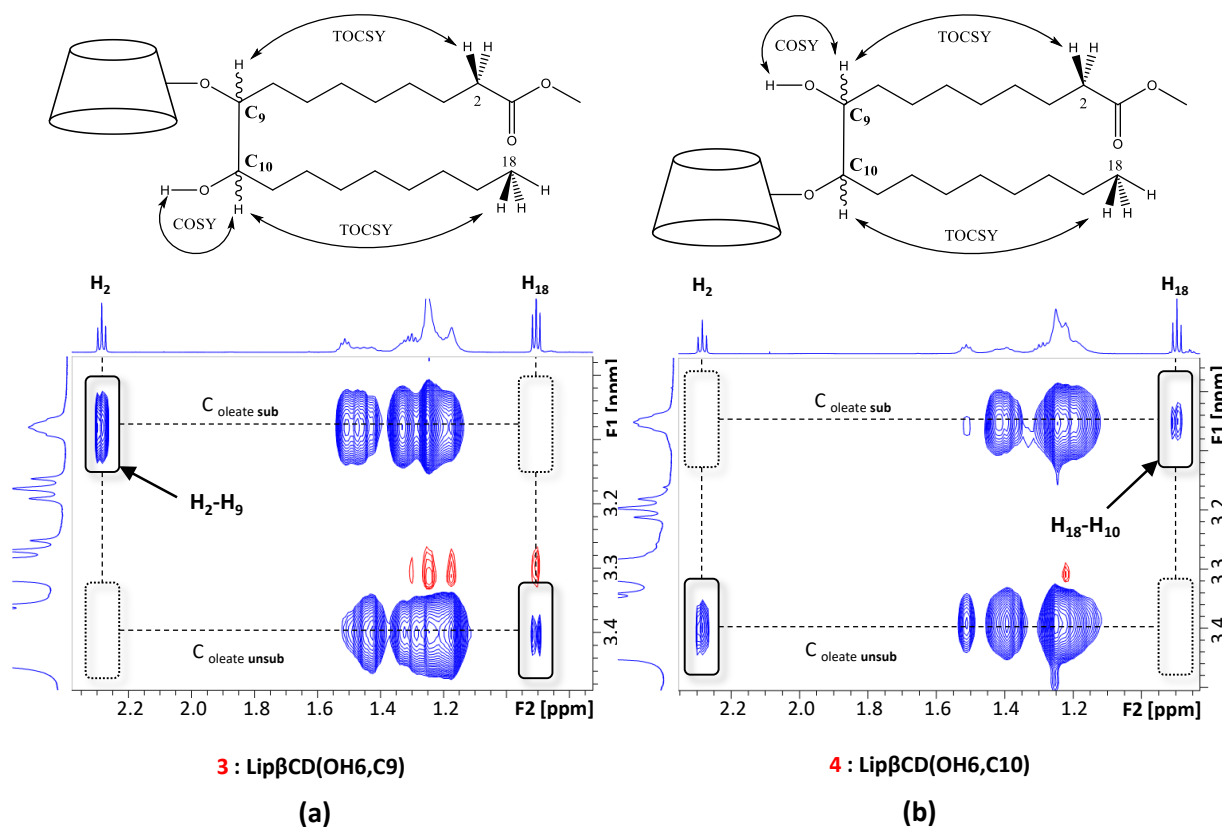


Figure 112 : Expériences RMN 2D TOCSY partielles (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O, 298 K,  $t_m = 160$  ms). Agrandissement de la zone spectrale d'intérêt correspondant aux isomères 3 (a) et 4 (b), mettant en évidence une position de greffage sur l'oléate de méthyle différente. Un schéma illustratif des couplages recherchés par l'expérience TOCSY pour déterminer la position de greffage de la βCD sur l'oléate de méthyle est représenté pour les deux isomères (haut).

Cette approche a donc permis, pour l'ensemble des isomères, de déterminer les positions d'ouverture de l'époxyde par la βCD, menant à l'attribution finale indiquée sur le chromatogramme représenté Figure 113.

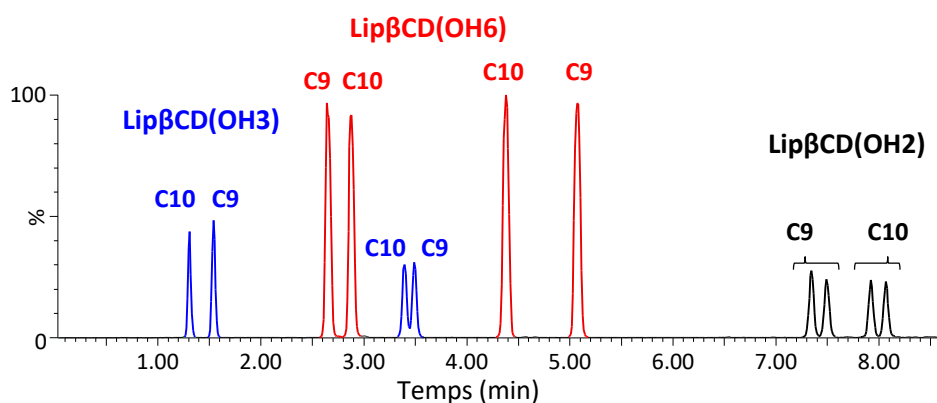


Figure 113 : Attribution finale des 12 isomères séparés par UHPLC-HRMS, décrits par leur position de greffage sur la βCD (OH2, OH3 et OH6) et par la position d'ouverture de l'oléate de méthyle (C9 et C10).

Il est remarquable qu'aucune tendance impliquant la position substituée de l'oléate de méthyle ne peut être émise, chaque groupe ayant un ordre d'éluion différent : 10-9-10-9 (OH3), 9-10-9-10 (OH6)

et 9-9-10-10 (OH2). Il en est de même en terme de CCS, aucune cohérence ne peut être déduite de ces positions de greffage en terme de taille des isomères analysés.

Ces observations indiquent que la configuration a une influence non négligeable sur la conformation de ces dérivés amphiphiles de  $\beta$ CD, influençant tant leur CCS en phase gazeuse que leur séparation par chromatographie liquide en phase inverse. C'est pourquoi cette étude sera complétée par une recherche de la conformation de ces isomères afin d'évaluer cette influence de la configuration et de déterminer si elle est déterminable.

#### II.2.5.2. Conformations 3D des isomères de Lip $\beta$ CD et si

Les différences de conformations peuvent être observées, en RMN, par l'intermédiaire des constantes de couplage et grâce aux expériences ROESY (ou NOESY). Ces deux approches seront étudiées, afin d'obtenir des informations concernant les conformations des isomères de DS1 de Lip $\beta$ CD. Cependant, une des limites des études par RMN est la nécessité d'observer des signaux aux déplacements chimiques isolés. La Figure 114 montre que le signal du proton en position substitué de l'oléate de méthyle est isolé dans le cas des greffages en position OH3 et OH6 sur la  $\beta$ CD, alors qu'il ne l'est pas dans le cas d'un greffage en position OH2.

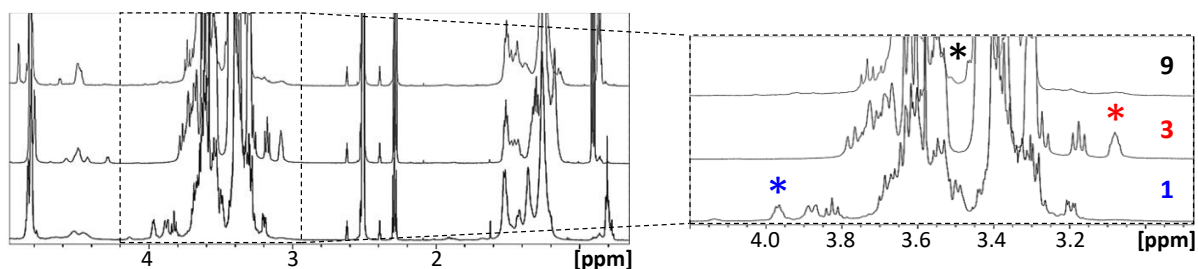


Figure 114 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ /D $_2$ O 98/2, 298 K) des isomères **1** (OH3), **3** (OH6) et **9** (OH2), annotés de l'identification du proton porté par le carbone substitué de l'oléate de méthyle.

Pour cette raison, l'étude des conformations portera principalement sur les isomères **1** à **8**, correspondant aux isomères greffés sur les positions OH3 et OH6.

##### II.2.5.2.1. Etudes des constantes de couplage

*Préambule : Les expériences consistant à rechercher et à mesurer les constantes de couplage ont été réalisées sur un spectromètre RMN 900 MHz, en collaboration avec le pôle RMN de Lille, par les ingénieurs Xavier Trivelli et François-Xavier Cantrelle. Les analyses, comprenant le choix des séquences et l'optimisation des paramètres d'acquisition ont donc été réalisées par leurs soins. Afin de mesurer les constantes de couplage, l'expérience RMN JRes (J-Resolved Spectroscopy) a été utilisée. Cette séquence permet, par l'observation d'une fenêtre spectrale et la sélection d'une seconde, l'observation*

des couplages uniquement présents entre les protons aux fréquences de résonances observées et sélectionnées.

Comme introduit ci-avant, l'observation isolée des signaux du protons ( $H_{9_{\text{oléate}}}$  ou  $H_{10_{\text{oléate}}}$ ) porté par le carbone substitué de l'oléate de méthyle ( $C_{9_{\text{oléate}}}$  ou  $C_{10_{\text{oléate}}}$ ) offre la possibilité de mesurer ses couplages  ${}^3J_{H-H}$ . Il est notable que la multiplicité de ce proton n'est pas résolue, quel que soit l'isomère, en raison des 3 couplages  ${}^3J_{H-H}$  dans lesquels il est impliqué (Schéma 17), avec des valeurs à priori voisines (Figure 114). Les constantes de couplages étant représentatives des angles dièdres entre les protons, leur observation peut apporter des informations en terme de conformation.

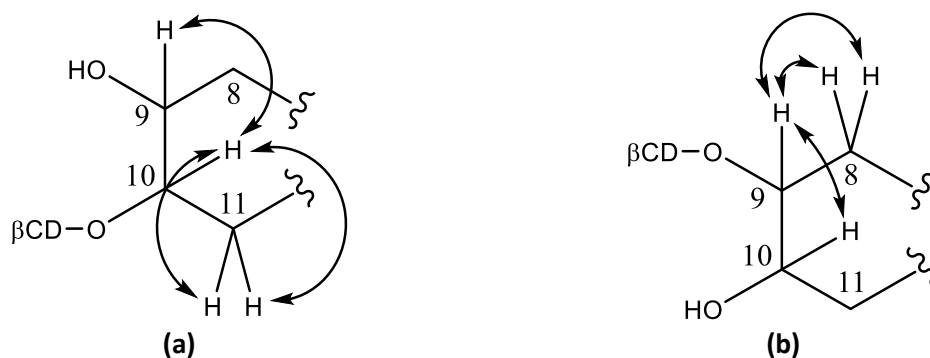


Schéma 17 : Représentation des constantes de couplage attendues pour les régioisomères greffés en position 10 (a) ou en position 9 (b).

Afin de déterminer les fenêtres spectrales à observer et à sélectionner pour la réalisation des JRes sélectives, une expérience COSY a systématiquement été réalisée. Dans le cas de l'isomère **3** (OH6, C9), trois couplages sont observés :  ${}^3J_{H9-H10}$ ,  ${}^3J_{H9-H8a}$  et  ${}^3J_{H9-H8b}$ . Les annotations a et b sont arbitraires, a correspondant systématiquement au proton inéquivalent le plus déblindé du  $\text{CH}_2$  voisin (Figure 115 (a)). La Figure 115 (b) montre la superposition des 3 JRes sélectives réalisées, permettant d'apprécier la déconvolution du multiplet et la résolution obtenue.

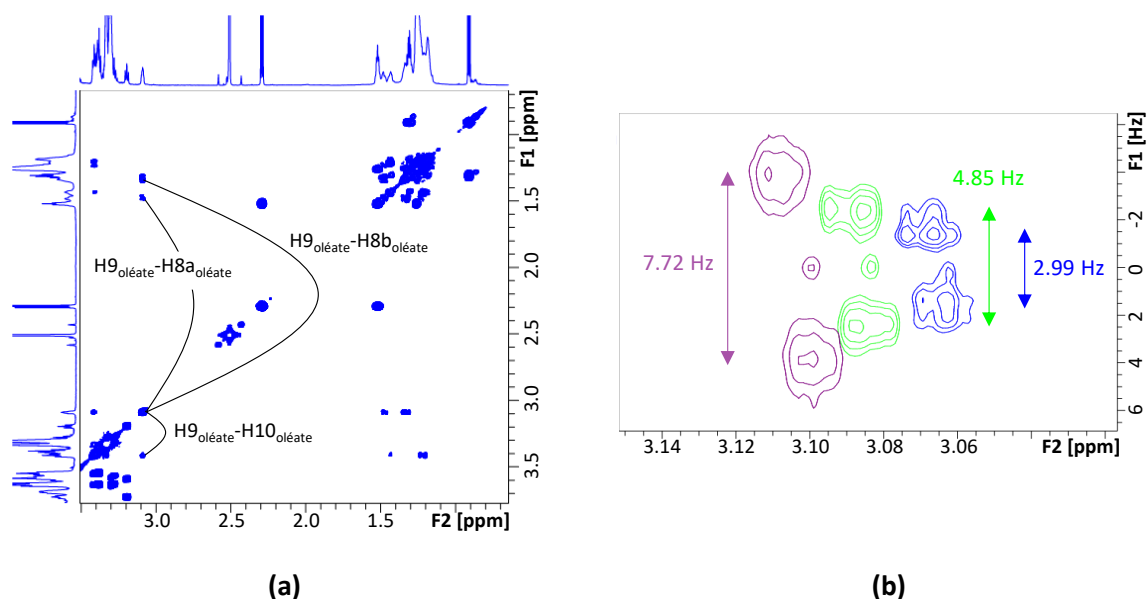


Figure 115 : Expériences RMN (900 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K) réalisées sur l'isomère **3** (OH6). (a) COSY annotée des constantes de couplage recherchées. (b) Superposition des trois JRes sélectives obtenues par l'observation de H9<sub>oléate</sub> ( $\delta = 3.00 - 3.15$  ppm) et la sélection de H8a<sub>oléate</sub> ( $\delta = 1.4 - 1.6$  ppm, vert), H8b<sub>oléate</sub> ( $\delta = 1.29 - 1.37$  ppm, violet) ou H10<sub>oléate</sub> ( $\delta = 3.35 - 3.45$  ppm, bleu).

Les JRes sélectives ont donc été réalisées pour les isomères **1 - 8**, permettant l'obtention des  $^3J_{H-H}$  indiquées dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Constantes de couplage déterminées par l'expérience RMN JRes sélective (900 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 298 K), impliquant le proton porté par le carbone substitué de l'oléate de méthyle pour les isomères **1** à **8** (OH3 et OH6).

Isomère	Position de greffage		Couplage	
	$\beta$ CD	Oléate	Protons	$^3J$ (Hz)
<b>1</b>	OH3	C10	H10-H9	5.49
			H10-H11	5.55
<b>2</b>	OH3	C9	H9-H10	3.08
			H9-H8a	5.12
			H9-H8b	7.98
<b>3</b>	OH6	C9	H9-H10	2.99
			H9-H8a	4.85
			H9-H8b	7.72
<b>4</b>	OH6	C10	H10-H9	4.75
			H10-H11a	3.78
			H10-H11b	7.72
<b>5</b>	OH3	C10	H10-H9	3.27
			H10-H11a	5.06
			H10-H11b	7.54
<b>6</b>	OH3	C9	H9-H10	5.52
			H9-H8a	N.D
			H9-H8b	9.58
<b>7</b>	OH6	C10	H10-H9	4.14
			H10-H11a	4.59
			H10-H11b	7.7
<b>8</b>	OH6	C9	H9-H10	4.5
			H9-H8a	4.9
			H9-H8b	7.12



Il est remarquable que les  $^3J_{H9-H10}$  sont différentes selon les isomères, allant de 2.99 Hz à 5.52 Hz. Ces différences sont un indicateur, selon la loi de Karplus, des différences d'angles dièdres entre les protons concernés. Cependant, les paramètres de cette loi étant dépendants de chaque système, il n'est pas possible de calculer directement les angles correspondants grâce aux constantes de couplage. Concernant les constantes  $^3J_{H-H}$  mesurées avec les protons inéquivalents du CH<sub>2</sub> voisin, les constantes  $^3J_{H-H}$  avec le proton le plus déblindé (annoté *a*) sont inférieures ou égales à 5 Hz, et celles avec le proton annoté *b* supérieures à 7 Hz. L'observation de différences entre ces deux protons, associées à leur inéquivalence indique la présence de contraintes sur la libre rotation de la liaison CH<sub>sub</sub>-CH<sub>2</sub>, similaires entre les isomères d'après les valeurs de constantes de couplage mesurées (à l'exception de l'isomère **1**).

L'isomère **1** (OH3, C10) est significativement différent des autres, les H du CH<sub>2</sub> voisin semblant être équivalents. En effet, une unique tache de corrélation est observée sur l'expérience COSY et la JRes sélective mène à l'obtention d'un triplet, indiquant la présence des deux H (CH<sub>2</sub>) dans la fenêtre sélectionnée dont les deux couplages scalaires ont une valeur identique (Figure 116). Cette observation indiquerait que la conformation est moins contrainte, pour cet isomère uniquement. De manière intéressante, la trace de mobilité de cet isomère est la plus large (FWHM = 1.35 ms), indiquant la présence de différentes conformations stables en phase gazeuse, ce qui corrèle avec ces données obtenues dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.

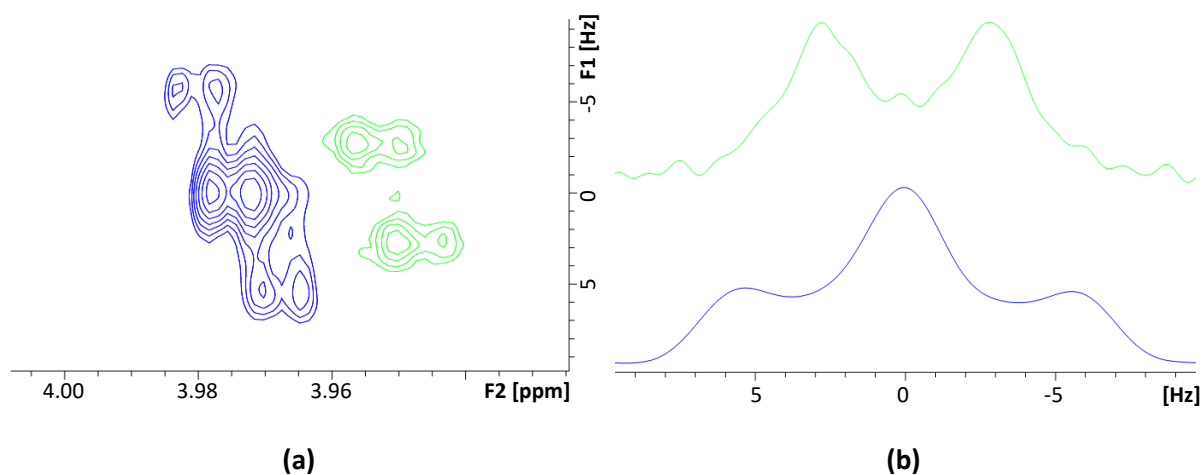


Figure 116 : (a) Superposition des JRes sélectives réalisées sur l'isomère **1** (OH3, C10) par l'observation du proton H10 et la sélection des H11 (CH<sub>2</sub>) (bleu) et du H9 (vert). (b) Projection des taches observées sur les JRes sélectives, mettant en évidence une différence de multiplicité (doublet  $^3J_{H10-H9}$ , vert ; triplet  $^3J_{H10-H11a,b}$ , bleu).

Néanmoins, aucune tendance ne peut être directement extraite de ces constantes, les angles dièdres H-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-H étant proches pour tous les isomères (estimés compris entre 50° et 110°). Afin d'exploiter ces valeurs de constantes de couplage, leur comparaison avec des données modélisées pourrait être informative. Cette étude n'a pas permis l'obtention de résultats interprétables, notamment car les structures théoriques discutées précédemment ont été modélisées dans une boîte d'eau alors que ces

analyses ont été réalisées dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, cette différence de solvation impliquant des conformations stables différentes. De plus, la détermination des constantes de couplage théoriques est très coûteuse en terme calcul et nécessiterait dans notre cas une nouvelle modélisation au préalable dans le DMSO. A titre illustratif, les spectres RMN <sup>1</sup>H partiels représentés sur la Figure 117 montrent, pour un même isomère (**4**, OH6, C10), une différence de constantes constitutives du multiplet du proton en position substituée de l'oléate de méthyle lors de sa solubilisation dans le D<sub>2</sub>O ou dans de DMSO-*d*<sub>6</sub>. Cette observation confirme que les structures modélisées dans l'eau ne peuvent pas être utilisées pour comparer les constantes de couplages théoriques et expérimentales.

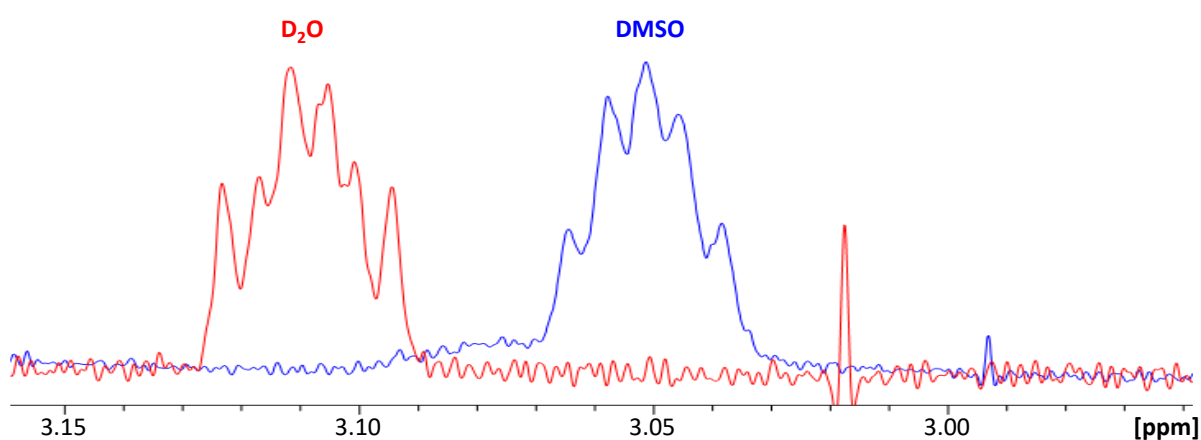


Figure 117 : Superposition des spectres RMN <sup>1</sup>H partiels (600 MHz, 298 K) de l'isomère **4** (OH6, C10) prétraités par une transformation gaussienne ( $lb = -2$ ,  $gb = 0.1$ ) et réalisées dans le D<sub>2</sub>O (rouge) ou le DMSO-*d*<sub>6</sub> (bleu). Le spectre enregistré dans le D<sub>2</sub>O a été décalé ( $\Delta\delta = - 0.048$  ppm) afin d'observer au mieux la différence de multiplicité.

## II.2.5.2.2. Analyses conformationnelles par ROESY

Afin de compléter l'analyse conformationnelle des Lip $\beta$ CD de DS1, des expériences ROESY ont été mises en place pour observer des corrélations dipolaires entre l'oléate de méthyle et le  $\beta$ CD. L'objectif de ces analyses est principalement d'observer si un phénomène d'inclusion de la chaîne lipidique est présent. La Figure 118 reprend ces expériences ROESY réalisées sur l'ensemble des isomères purifiés, montrant la similarité des corrélations observées.

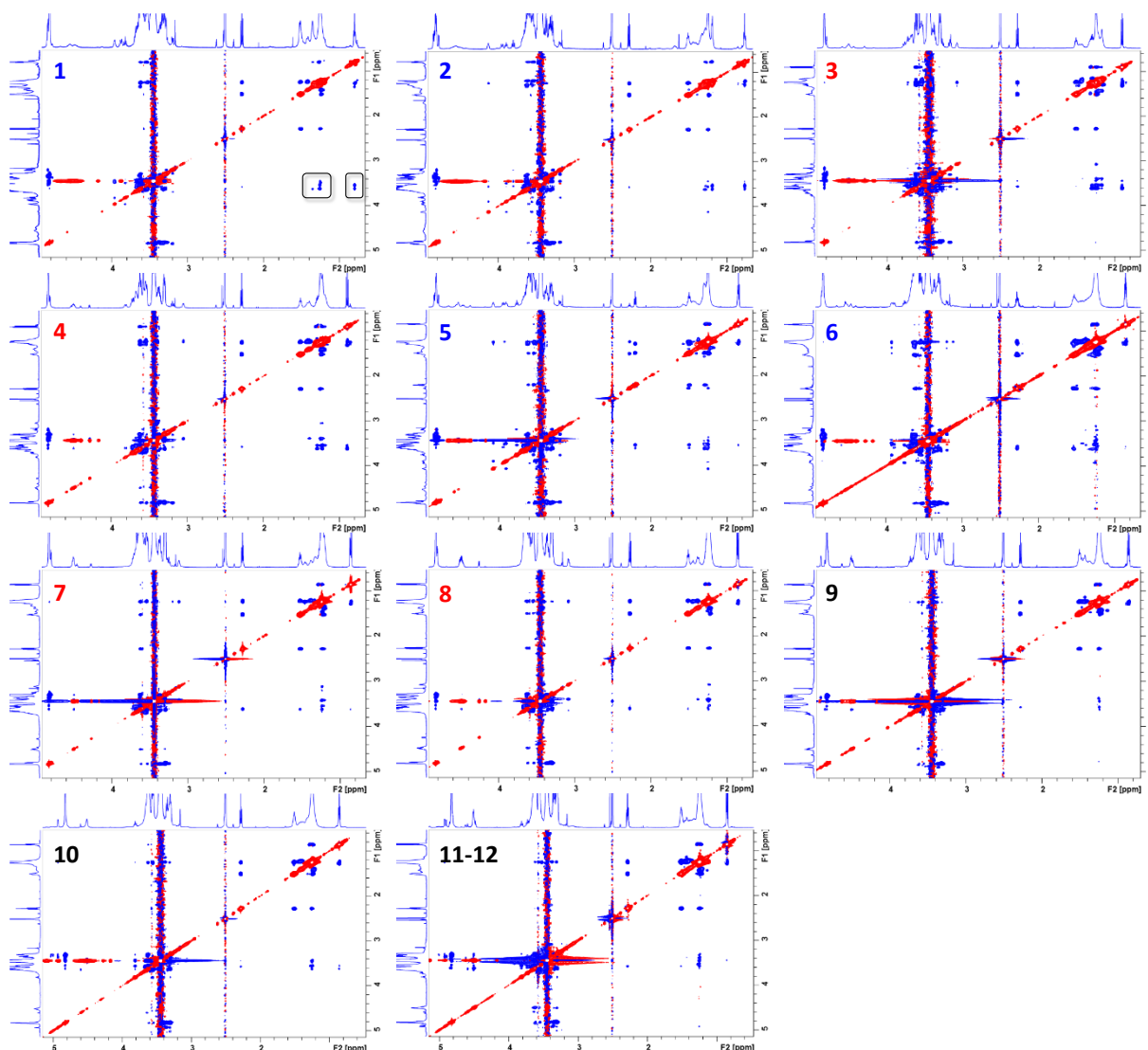


Figure 118 : Expériences 2D ROESY (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 98/2, 298 K,  $t_m$  = 800 ms) des isomères purifiés 1 à 10 et du mélange des isomères 11-12.

En effet, il est notable que des taches de corrélation entre les chaînes lipidiques et les protons de la  $\beta$ CD sont visibles pour l'ensemble des isomères, mises en avant sur l'isomère 1 par des encadrés. Il est difficile de différencier les CH<sub>2</sub> situés du côté estérifié (C2 à C8) ou non estérifié (C17 à C10) en raison de leur grand nombre et de leur faible dispersion spectrale. Qualitativement, leur présence indique cependant une proximité entre certains CH<sub>2</sub><sub>oléate</sub> et les H<sub>CD</sub>. Parmi ces taches de corrélation, certaines

sont aux déplacements chimiques des protons situés à l'intérieur de la cavité ( $H_{3CD}$  et  $H_{5CD}$ ), indiquant une inclusion d'au moins une des deux chaînes lipidiques.

Le groupement  $CH_3$  ( $H_{18\text{oléate}}$ ) est quant à lui isolé, permettant l'interprétation des taches de corrélations observées. La Figure 119 reprend la démarche employée afin de déterminer les protons impliqués dans les interactions avec les protons  $H_{18\text{oléate}}$ . L'extraction de la colonne (dimension F2) permet l'observation, en une dimension, des corrélations observées sur l'expérience 2D. Les déplacements chimiques correspondants ont été comparés aux expériences HSQC, permettant de conclure que ces corrélations dipolaires sont issues de la proximité entre le méthyle  $H_{18\text{oléate}}$  et les protons situés à l'intérieur de la cavité ( $H_{3CD}$  et  $H_{5CD}$ ).

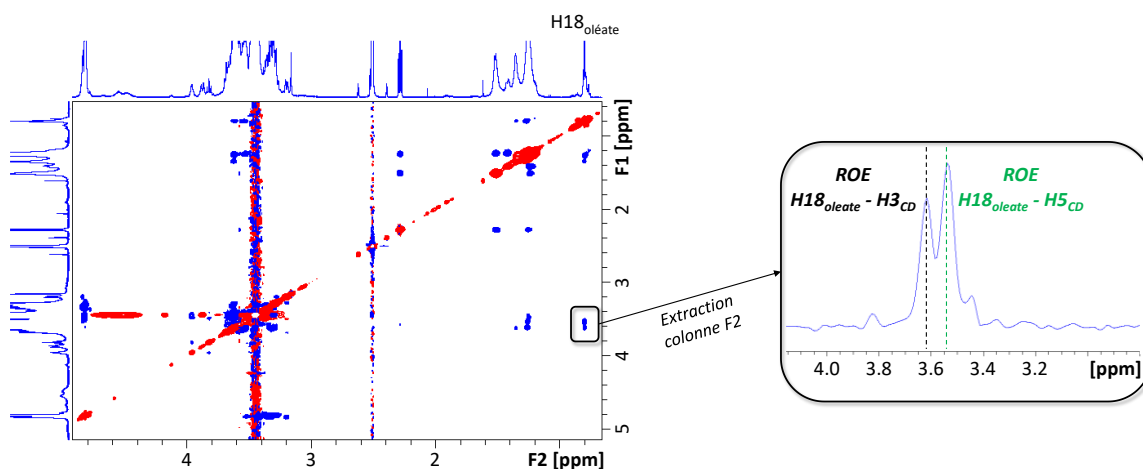


Figure 119 : Expérience 2D ROESY (600 MHz, DMSO- $d_6/D_2O$ , 298 K,  $t_m = 800$  ms) de l'isomère **1** ( $OH_3$ ,  $C_{10}$ ) (gauche) associée à la projection (F2) des corrélations dipolaires observées au déplacement chimique des protons  $H_{18\text{oléate}}$  (droite).

Afin de pouvoir comparer les intensités des corrélations dipolaires, cette extraction a été réalisée sur l'ensemble des ROESY. Représentées sur la Figure 120, ces extractions permettent d'observer, pour un niveau de bruit similaire, des différences significatives entre les isomères. Il est à noter que la concentration de chaque tube est similaire et que l'amplification du signal est identique pour toutes les ROESY, autorisant leur comparaison en terme d'intensité de taches de corrélation.

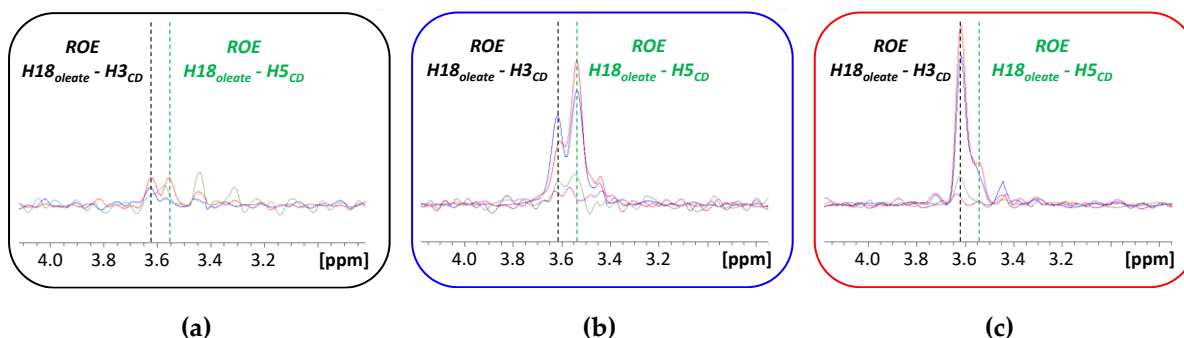


Figure 120 : Superposition des colonnes extraites depuis les expériences ROESY, contenant les corrélations dipolaires entre les  $H_{18\text{oléate}}$  et les protons situés à l'intérieur de la cavité des CDs ( $H_{3CD}$  et  $H_{5CD}$ ). Ces extractions sont regroupées en fonction

des positions de greffage sur la  $\beta$ CD : (a) OH2 (isomère **9** bleu; **10** rouge; **11-12** vert), (b) OH3 (**1** bleu, **2** rouge, **5** vert, **6** violet) et (c) OH6 (**3** bleu; **4** rouge; **7** vert; **8** violet).

D'une part, les extractions présentent des profils différents selon les positions de greffage OH2, OH3 ou OH6. Le greffage en position OH2 semble ne pas permettre une inclusion prononcée des  $H_{18_{ol\acute{e}ate}}$ , selon la faible intensité des corrélations dipolaires (Figure 120 (a)). Deux isomères greffés en position OH3, les isomères **1** (OH3, C10) et **2** (OH3, C9), montrent des corrélations dipolaires significatives et d'intensités voisines entre les  $H_{18_{ol\acute{e}ate}}$  et les  $H_{3_{CD}}$  et  $H_{5_{CD}}$  (Figure 120 (b)). De même, deux isomères greffés en position OH6, les isomères **3** (OH6, C9) et **4** (OH6, C10), permettent l'observation de corrélations dipolaires impliquant les  $H_{18_{ol\acute{e}ate}}$ , majoritairement avec les  $H_{3_{CD}}$  (Figure 120 (c)).

Il est donc possible de déduire de ces expériences que l'inclusion du côté non-estérifié semble être présente pour deux des quatre isomères parmi ceux greffés en position OH3 et OH6. Sachant que les groupements  $CH_2$  présentent des corrélations dipolaires avec l'intérieur de la  $\beta$ CD pour tous les isomères, il est possible d'en déduire que la partie estérifiée de l'oléate de méthyle est incluse lorsque la partie non-estérifiée ne l'est pas.

Afin de vérifier si cette inclusion est d'origine intramoléculaire ou intermoléculaire, une expérience DOSY a été mise en œuvre, dans le  $D_2O$  ainsi que dans le  $DMSO-d_6$ . Cette expérience a été réalisée sur l'isomère **7** (OH6, C10) et mise en œuvre par l'analyse de solutions à deux concentrations différentes. En raison d'une faible solubilité de cet isomère dans le  $D_2O$ , l'écart de concentration entre les deux échantillons n'est que d'un facteur 2, correspondant à des solutions concentrées à 1.1 mM et 0.6 mM (Figure 121 (a)). Dans le  $DMSO-d_6$ , un facteur 10 différencie les deux échantillons, d'une concentration de 7.1 mM et 0.7 mM (Figure 121 (b)).

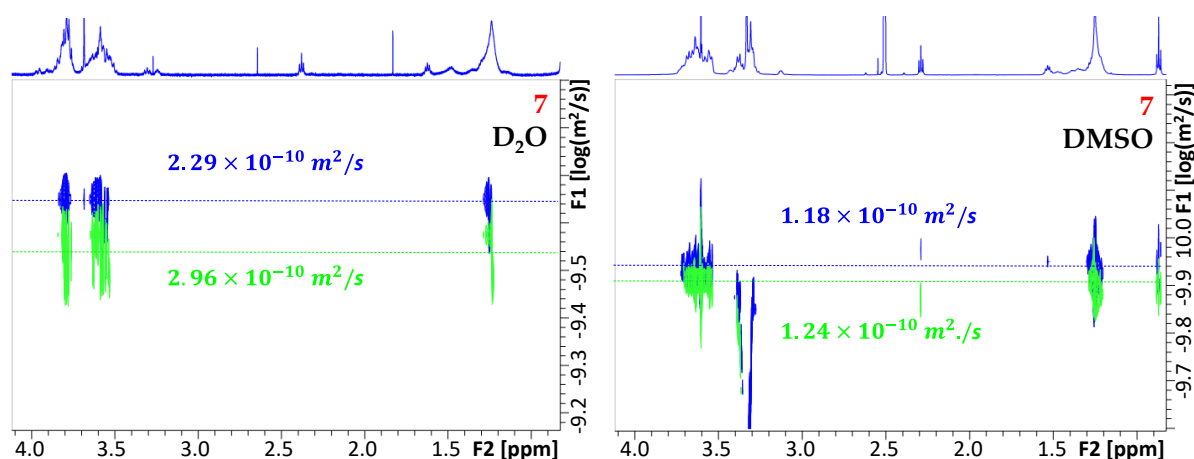


Figure 121 : Expériences RMN DOSY (600 MHz, 298 K) réalisées sur l'isomère **7** (OH6, C10) dans (a) le  $D_2O$  à 0.6 mM (vert) et 1.1 mM (bleu), ou (b) le  $DMSO-d_6$  à 0.7 mM (vert) et 7.1 mM (bleu).

Il est notable que la différence de coefficient de diffusion, entre les échantillons dilués et concentrés, est supérieure dans le  $D_2O$  ( $\Delta D = 0.67 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) en comparaison du  $DMSO-d_6$  ( $\Delta D = 0.06 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ), malgré une différence de concentration moins importante. De plus, la différence observée dans le

DMSO-*d*6 est peu significative en comparaison de la résolution que peut offrir l'expérience DOSY. Cette diminution du coefficient de diffusion observée dans le D<sub>2</sub>O peut être interprétée par un phénomène d'agrégation, cohérent avec une solubilité limitée dans ce solvant. A l'inverse, cette expérience montre qu'il n'y a pas, à priori, de phénomènes d'agrégation dans le DMSO-*d*6. Ces observations sont cohérentes avec la nature amphiphile des LipβCD, générant une organisation dans le D<sub>2</sub>O en raison des différentes forces induites par ce solvant, absentes dans le DMSO-*d*6.

Il est possible de conclure, d'après ces résultats, que les corrélations dipolaires observées dans le DMSO-*d*6 correspondent à de l'auto-inclusion de la chaîne lipidique dans la cavité de la βCD. Il est donc notable que cette propriété d'auto-inclusion est différente, avec l'inclusion de la chaîne estérifiée ou non estérifiée en fonction des isomères. De plus, l'observation de l'inclusion de la chaîne non-estérifiée sur deux isomères pour chacune des positions de greffage OH3 et OH6 semble indiquer une similitude en terme de conformation. Dans les deux cas, une substitution en C9 et en C10 est impliquée et correspondent aux isomères élus en premiers lors de leur séparation par chromatographie liquide. Afin de rationaliser ces résultats, l'analyse des structures modélisées a été entreprise pour rechercher si une observation analogue du point de vue théorique est envisageable.

#### II.2.5.2.3. Structures théoriques représentatives

L'approche par métadynamique effectuée précédemment offre la possibilité d'observer, sur la base d'un grand nombre de structures, les conformations les plus probables. Pour ce faire, un regroupement sur critère géométrique des structures les plus stables (environ 25 000 par isomère) a été réalisé, afin d'obtenir les structures les plus représentatives. Pour inclure un maximum de conformations représentatives, dix conformations ont été recherchées pour tous les isomères.

Les conformations et leur pourcentage de représentativité ainsi obtenus sont représentés Figure 122. Il est remarquable que, pour la majorité des isomères, cette conformation est représentative d'une grande proportion des structures les plus stables modélisées. Il est à noter que l'isomère LipβCD (OH3, C9, SS) est le seul dont la distribution de CCS est répartie en deux populations distinctes, ce qui s'explique par la présence d'une deuxième conformation, significativement différente, représentative de 35 % des structures modélisées pour cet isomère.

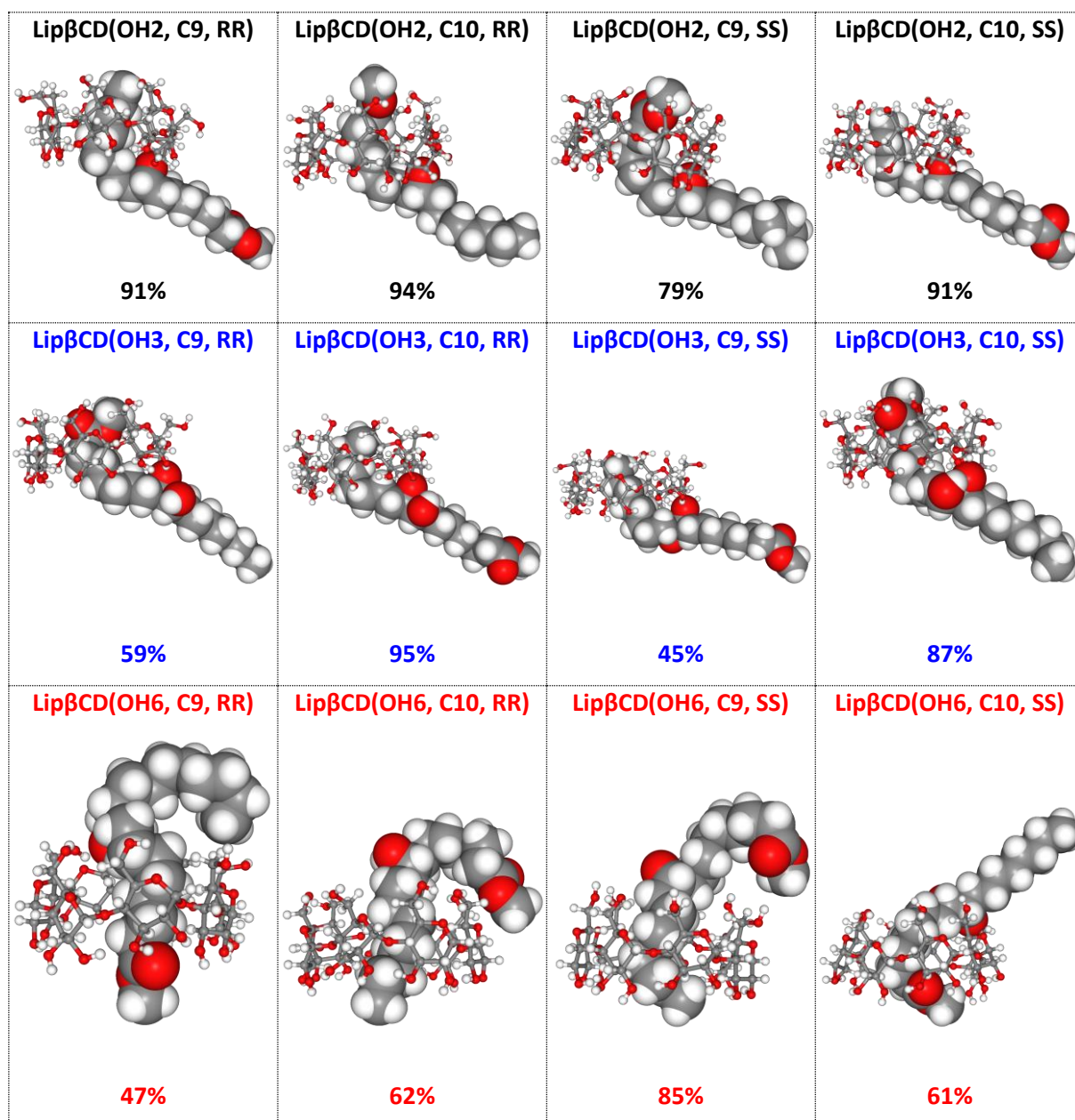


Figure 122 : Structures représentatives majoritaires des 12 isomères de Lip $\beta$ CD de DS1. Le pourcentage de représentativité est indiqué pour chaque isomère. La face primaire est toujours orientée vers le haut.

La première observation est que, du point de vue théorique et dans l'eau, la conformation la plus stable de tous les DS1 des Lip $\beta$ CD présente au moins une auto-inclusion partielle de l'oléate de méthyle. La seconde observation principale concerne la partie de la chaîne lipidique incluse. En effet, il est notable que pour chaque position de greffage sur la  $\beta$ CD, deux isomères ont la partie estérifiée incluse et deux isomères la partie non-estérifiée incluse. De manière intéressante, les résultats de cette modélisation réalisée dans l'eau concordent avec les observations réalisées expérimentalement dans le DMSO- $d_6$ , pour les isomères greffés en position OH3 et OH6. Les données expérimentales et théoriques se confortent, apportant une confirmation de cette auto-inclusion observée par les expériences ROESY.



Cette similarité observée malgré une nature de solvant différente peut s'interpréter par la présence d'interactions intramoléculaires, diminuant l'effet de solvation sur les conformations de ces structures. En effet, les modèles théoriques montrent la présence d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de l'oléate de méthyle et la  $\beta$ CD, imposant une orientation particulière de la chaîne lipidique (Figure 123). Cette observation permet d'expliquer que, malgré des stéréochimies différentes, les expériences de JRes sélectives n'ont pas permis de dégager de tendance en terme de constante de couplage. En effet, comme le montre la comparaison des deux diastéréoisomères de Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>, C9) sur la Figure 123, la différence d'angles entre les H-C9-C10-H est minimisée en raison de la présence de cette liaison hydrogène qui induirait une conformation particulière de l'oléate de méthyle.

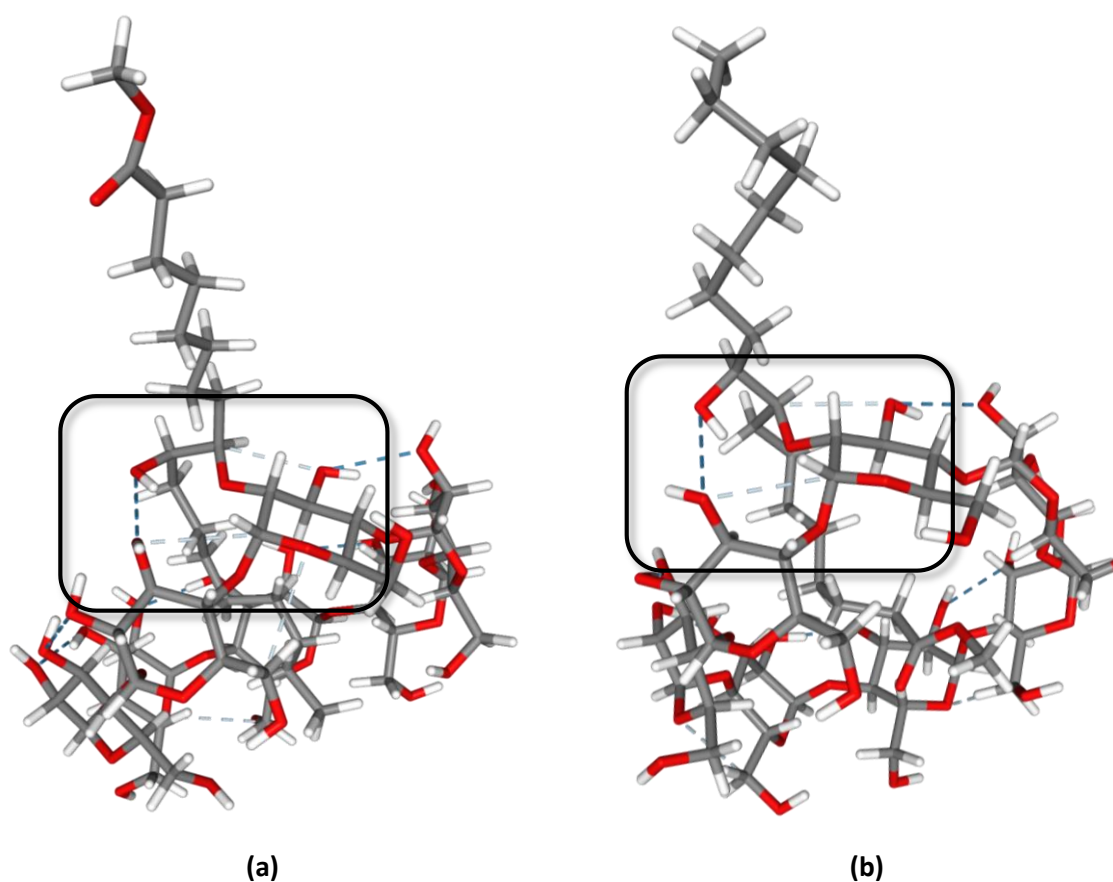


Figure 123 : Représentation de la conformation représentative majoritaire des diastéréoisomères (a) Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>, C9, RR) et (b) Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>, C9, SS). Les encadrés mettent en avant la zone où sont observées les liaisons hydrogène entre l'hydroxyle libre de l'oléate de méthyle et l'hydroxyle OH<sub>3</sub> de l'unité glucosidique adjacente.



## II.2.6. Conclusion

La mise en place d'une approche analytique exploitant le couplage UPHLC-IMS-HRMS a été réalisée par l'analyse du mélange d'isomères de Lip $\beta$ CD, utilisé comme modèle.

La chromatographie liquide, en phase inverse sur une phase stationnaire C8, a offert une séparation chromatographique des 12 isomères de DS1 correctement résolus. Leur séparation, à l'origine d'interactions différentes avec les chaînes hydrophobes de la phase stationnaire, est un indicateur d'une différence de structure 3D en phase liquide.

La mobilité ionique a également permis de différencier ces isomères, à travers l'observation des temps de dérives des ions  $[M+Na]^+$  correspondants. Malgré une résolution moins prononcée que celle obtenue par chromatographie liquide, leur différence est significative, constituant une preuve de conformations hétérogènes entre ces isomères. Leur fragmentation MS/MS n'a pas été informative en terme d'ions caractéristiques, les fragments générés étant identiques pour tous les DS1 de Lip $\beta$ CD. Cependant, des différences notables d'intensité de ces fragments ont été relevées, menant à la formation de 3 groupes de 4 isomères au sein desquels les spectres MS/MS sont identiques. Ces groupes ont été attribués à des positions de greffage différentes de l'oléate de méthyle sur la  $\beta$ CD, représentant d'une part l'isomérisation de position la plus discriminante et d'autre part l'unique facteur 3 menant à la formation des 12 isomères.

Le regroupement, par position de greffage sur la  $\beta$ CD a permis de dégager une tendance sur les données issues de la mobilité ionique. En effet, les structures correspondant à une position de greffage (4 isomères) sont apparues globalement plus volumineuses que les deux autres, parmi lesquels une seconde position est plus compacte. Retranscrites en terme de CCS, ces différences ont été comparées avec des données théoriques issues de modélisations moléculaires. Une approche par métadynamique a été réalisée, générant un très grand nombre de conformations par isomère ( $\approx 300\,000$ ) qui a été réduit à 25 000 environ sur le critère de la stabilité énergétique. Le calcul des CCS théoriques de ces structures a mené à l'obtention d'une distribution de valeur, pour chaque isomère, représentant un format de données analogue à celui obtenu expérimentalement. Ces données ont mis en évidence une moyenne de CCS plus grande des isomères greffés en position OH3 de la  $\beta$ CD ainsi qu'une plus haute compacité de ceux greffés en position OH6. La mise en place d'un système de scores adapté aux différences expérimentales a permis de définir, par la comparaison des CCS expérimentales et théoriques, la position de greffage de l'oléate de méthyle sur la  $\beta$ CD (OH2, OH3 ou OH6). L'objectif étant de pouvoir appliquer cette approche à d'autres mélanges de dérivés de CDs, les validations des conditions expérimentales et du résultat de l'attribution ont été réalisées.

Dans un premier temps, l'effet du changement de la composition de la phase mobile sur la mesure de CCS a été évalué afin de valider les conditions expérimentales. Il en est ressorti que les conditions

d'analyse employées n'affectent pas significativement les temps de dérive moyens, malgré un élargissement des traces de mobilité indiquant des conformations légèrement différentes et non-résolues. Le gradient employé pour séparer ces 12 isomères ne génère qu'une différence de 28% de solvant organique, une augmentation suffisamment faible pour ne pas affecter significativement les CCS mesurées. Cette étude a également permis de conditionner cette approche à des méthodes dont la variation de composition de phase mobile n'est pas trop importante. En effet, les différences observées entre l'utilisation d'un solvant 100% aqueux ou 100% organique peut induire des biais significatifs au regard des différences de CCS entre les composés analysés.

Dans un second temps, la validation de l'attribution des régioisomères a été réalisée par l'analyse RMN des 12 isomères purifiés. Les différences d'étendues des valeurs de CCS<sub>th</sub> et CCS<sub>exp</sub> différentes et l'absence de charge sur les modèles théoriques ont motivé cette étape de validation. Le déblindage caractéristique d'un unique carbone appartenant à la  $\beta$ CD (C<sub>2CD</sub>, C<sub>3CD</sub> ou C<sub>6CD</sub>), observé sur les expériences HSQC, a permis de valider l'attribution des positions de greffage. De plus, la position de substitution sur l'oléate de méthyle (C<sub>9oléate</sub> ou C<sub>10oléate</sub>) a pu être déterminée grâce à l'expérience TOCSY. Cette attribution a permis de mettre en évidence un schéma non-répétable des temps de rétention au sein de chaque groupe de régioisomères sur la  $\beta$ CD, indiquant l'influence significative de la stéréochimie (RR ou SS) sur le temps de rétention de ces composés. Enfin, l'analyse conformationnelle réalisée par l'expérience ROESY a mis en évidence un phénomène d'auto-inclusion de la chaîne lipidique à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ CD, dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>, indiquant une forte stabilité de ce phénomène. Cette auto-inclusion est également la conformation majoritaire observée sur les structures théoriques modélisées dans l'eau.

Cette approche a donc permis, grâce au le couplage UHPLC-IMS-MS/HRMS associé à la modélisation moléculaire, d'assigner aux 12 isomères de Lip $\beta$ CD leur régioisométrie sur la  $\beta$ CD, sans étape de purification. Ce couplage exploite les différences d'interactions en phase liquide (UHPLC), les différences de conformation en phase gazeuse (IMS, MS/MS) et en phase liquide (modélisation dans l'eau), regroupant une grande quantité d'informations descriptives. De plus, l'utilisation de la métadynamique comme approche théorique offre la génération d'un nombre élevé de structures, constituant une base de données conformationnelles intéressante. Enfin, l'analyse approfondie par RMN a mis en évidence l'intérêt d'une caractérisation avancée des mélanges de dérivés de CDs, notamment par l'observation d'auto-inclusions stables et différentes, pouvant être à l'origine de variations de propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, la capacité d'inclusion ou l'aptitude à interagir avec les membranes biologiques.



### **III. Partie Expérimentale**



### III.1. Apport des cyclodextrines à une formulation orale liquide du carvedilol

#### III.1.1. Chemicals

European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) grade carvedilol (molecular mass = 406.5 g/mol) was purchased from INRESA (Bartheinheim, France). The following CDs were supplied by Wacker Chemie AG (Munich, Germany):  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ CD, Cavamax W6 Pharma),  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD, Cavamax W7 Pharma),  $\gamma$ -cyclodextrin ( $\gamma$ CD, Cavamax W8 Pharma), randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (RAMEB, Cavasol W7 M; degree of substitution (DS) = 1.6-1.9) and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD, Cavasol W7 HP, DS = 0.6-0.9). Hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin (HP $\gamma$ CD, DS = 0.6), sodium acetate, acetic acid, trisodium citrate dihydrate, citric acid monohydrate, phosphoric acid, disodium phosphate and 1 M hydrochloric acid were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Heptakis(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ CD (DIMEB) was synthesized as described previously [192], and its measured properties were in line with the literature data. Deuterated water and DMSO was purchased from Sigma-Aldrich. The water used was MilliQ grade. All solvents used were analytical grade.

#### III.1.2. Ultra high performance liquid chromatography

Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) was performed on an ACQUITY UPLC H-Class system coupled to an ACQUITY TUV detector (Waters, Manchester, UK) set to carvedilol's  $\lambda_{\max}$  = 240 nm. For solubility studies, we used a previously described UPLC method on a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100x2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) column maintained at 60 °C (333 K) [161].

The stability analysis was based on a slightly modified Ph. Eur. method, using a Phenomenex Kinetex LC C8 (150x4.6 mm, 2.6  $\mu$ m) column maintained at 55 °C (328 K). To check for possible deviation in detection, new calibration curves were generated and analyzed twice during each sample run.

#### III.1.3. Solubility studies

To evaluate the influence of CDs in various aqueous media, we prepared 10 mM solutions of  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, HP $\gamma$ CD or RAMEB in pure water (with a pH close to 7), aqueous 0.1 M citrate buffer or acetate buffer (pH 4.7), and hydrochloric acid (26 mM, pH  $\sim$ 3.5). An excess amount of carvedilol (10 mg/mL) was added to 3 mL of medium. The obtained suspension was capped, stirred for 3 days at room temperature (296  $\pm$  2 K), and then filtered through a polyvinylidene fluoride filter (pore size: 0.2  $\mu$ m; Acrodisc, Waters). After appropriate dilution, the carvedilol concentration was determined using a dedicated UHPLC method. Blanks were prepared with the same experimental procedure but in the absence of CD. Solutions were prepared in triplicate for each condition.

The superimposition of calibration curves obtained for each condition is shown Figure 124.

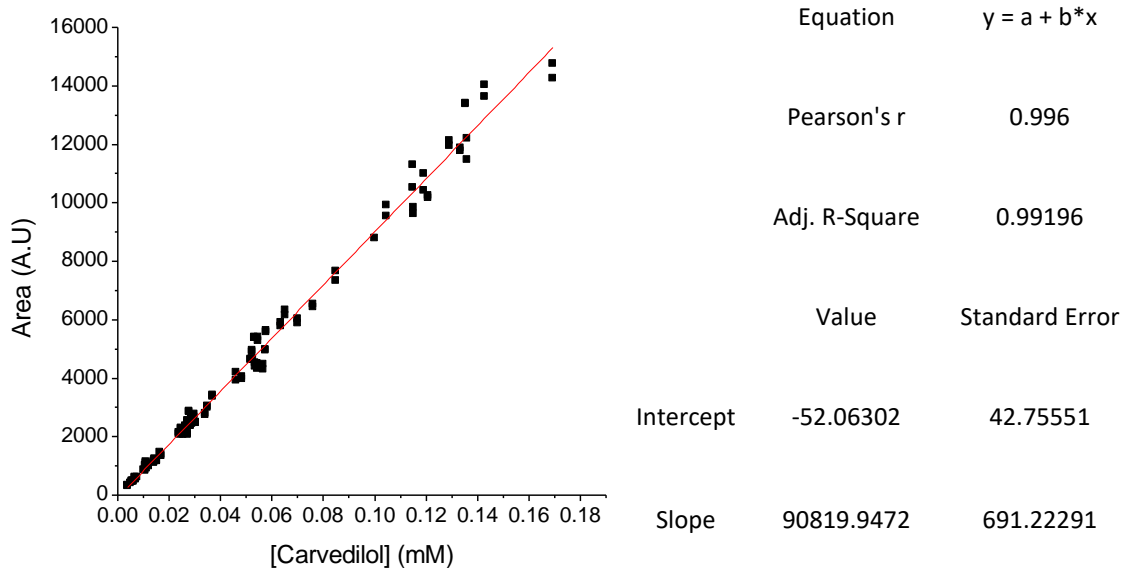


Figure 124 : Superimposition of calibration curves used for the solubility study.

#### III.1.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analyses

All NMR experiments were performed on an AVANCE III 600 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) equipped with a Z-gradient unit (for pulsed-field gradient spectroscopy) and a triple resonance probe (TXI, 5-mm tube, maximum gradient strength value = 5.35 G/mm). Spectra were acquired at 298 K with close temperature control. D<sub>2</sub>O was used as the solvent, while the system's pulse automation program was used to optimize the duration of the 90° pulse. Residual signal of HOD protons was used as the reference for calibration. One-dimensional NMR spectra were recorded at a resolution of 0.2 Hz (64K data points). <sup>1</sup>H spectra of acetate buffer samples were obtained with the Bruker sequence zg30, and <sup>1</sup>H spectra of HCl samples were obtained by using the Bruker sequence zgcprr to delete the water signal from the added HCl. Two-dimensional (2D) DOSY <sup>1</sup>H NMR experiments were performed using the Bruker sequence ledbpgp2s with the gradient pulse duration ( $\delta/2$ ) and the diffusion time ( $\Delta$ ) set to 1.9 ms and 50 ms, respectively. The strength of the pulsed-field gradient was increased linearly from 2% to 98% in 16 steps. The probe's gradient calibration was based on the water signal from a 90:10 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O mixture; a gradient strength value of 4.9 G/mm was obtained for the water diffusion value D at  $2.3 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s at 298 K. The longitudinal eddy current delay and the spoil gradient delay were set to 5 ms and 0.6 ms, respectively. Spectral data were processed with the TopSpin dosy2d software module (V4.0.7, Bruker). 2D ROESY <sup>1</sup>H NMR experiments were carried out using the phase-sensitive roesyph.2 sequence; the mixing time was set to 800 ms, with resolutions of 2.6 Hz and 21.1 Hz for F2 and F1, respectively. COSY and HSQC experiments were carried out using standard sequences of Bruker library.

#### III.1.5. Aggregation studies

To study carvedilol aggregation in acetate buffer, samples were prepared at high concentration (5 mM) by heating at 313 K overnight with stirring, leading to clear stock solution. We analysed by NMR five carvedilol concentrations (from 0.5 mM to 5 mM) in 0.1 M acetate-buffered D<sub>2</sub>O (pH = pK<sub>a</sub> = 4.7). The lower concentrations were obtained by diluting the 5 mM stock solution in the same buffer.

### III.1.6. Complex stoichiometry

The stoichiometry of carvedilol's inclusion complexes with  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD and DIMEB were investigated by applying Job's method (the "method of continuous variation") to <sup>1</sup>H NMR analysis [91,92]. 11 samples were prepared, with linear variations of the molar ratio of both components ranging from 0 to 1. Job plots with  $\beta$ CD and  $\gamma$ CD were obtained with solutions in 0.1 M acetate buffer (pH = pK<sub>a</sub> = 4.7), and the total concentration ([carvedilol] + [CD]) was kept constant at 3.65 mM. Note that with DIMEB, the solutions were prepared in D<sub>2</sub>O with 13 mM HCl (pH ~3.5), and the total concentration ([carvedilol] + [DIMEB]) was kept constant at 2 mM (Table 22). The complexes' stoichiometry was determined from the chemical shifts of protons located in the CD cavity.

Table 22 : Preparation of samples used for the Job experiment with carvedilol and DIMEB. The concentrations of carvedilol and DIMEB stock solutions are 2 mM.

<i>NMR tube</i>	[Carvedilol] (mM)	V Carvédilol ( $\mu$ L)	[DIMEB] (mM)	V DIMEB ( $\mu$ L)	<i>r (Carvedilol)</i>	<i>R (DIMEB)</i>
<b>1</b>	2	500	0	0	1.000	0.000
<b>2</b>	1.8	450	0.2	50	0.900	0.100
<b>3</b>	1.6	400	0.4	100	0.800	0.200
<b>4</b>	1.4	350	0.6	150	0.700	0.300
<b>5</b>	1.2	300	0.8	200	0.600	0.400
<b>6</b>	1	250	1	250	0.500	0.500
<b>7</b>	0.8	200	1.2	300	0.400	0.600
<b>8</b>	0.6	150	1.4	350	0.300	0.700
<b>9</b>	0.4	100	1.6	400	0.200	0.800
<b>10</b>	0.2	50	1.8	450	0.100	0.900
<b>11</b>	0	0	2	500	0.000	1.000

### III.1.7. Isothermal titration calorimetry (ITC) studies

Thermodynamic parameters (the formation constant K, the inclusion enthalpy  $\Delta H^\circ$ , the entropy  $\Delta S^\circ$ , the Gibbs free energy  $\Delta G^\circ$ , and the heat capacity  $\Delta C_p^\circ$ ) were determined for carvedilol/ $\gamma$ CD and carvedilol/RAMEB systems using an isothermal calorimeter (ITC<sub>200</sub>, MicroCal Inc., USA). Carvedilol and CDs solutions were prepared in degassed acetate buffer adjusted to pH = pK<sub>a</sub> = 4.7. Each system was characterized in three distinct experiments, made at three temperatures (288, 298 and 308 K). The first experiment (titration: protocol A) was performed by filling the cell (V<sub>0</sub> = 202.8  $\mu$ L) with a 0.5 mM carvedilol solution and filling the syringe with a 5 mM CD solution. The second



experiment (release: protocol B) was performed by filling the cell with a buffer solution and filling the syringe with a 1 mM carvedilol + 5 mM CD solution. The third experiment (protocol C) was performed by filling the cell with a 0.5 mM carvedilol solution and filling the syringe with a 1 mM carvedilol + 5 mM CD solution. Blank experiments were carried out under the same experimental conditions by injecting individual species into buffers, buffers into species, or buffers into buffer; this yielded the heat of dilution, which was subtracted from the values in the interaction experiments. For all experiments, and after the addition of an initial aliquot of 1  $\mu\text{L}$ , 10 aliquots of 3.5  $\mu\text{L}$  of the syringe solution were delivered over 7 s for each injection. The time interval between two consecutive injections was set to 70 s, which proved to be sufficient for a systematic and complete return to baseline. The stirring speed was set to 1000 rpm. The resulting heat flow was recorded as a function of time. The peak area following each injection was obtained by integration of the resulting signal and was expressed as the heat effect per injection. The binding parameters ( $K$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$ , and  $\Delta C_p^\circ$ ) were determined for a 1:1 stoichiometry, by means of a dedicated treatment [84], involving a global analysis of all the binding isotherms obtained for a given system.

#### III.1.8. Mass Spectrometry Studies

Mass spectrometry analyses were performed on a Synapt-G2-Si (Waters, Manchester, UK) equipped with an ESI probe. Solutions were injected through FIA (Flow Injection Analysis) using  $\text{H}_2\text{O}$  or directly infused with a syringe pump. It was operated in positive ion mode with capillary voltage set at 2 kV, source temperature at 100  $^\circ\text{C}$  and sampling cone at 20 V.

#### III.1.9. Photostability study

A six-month photostability study was performed in accordance with the ICH Q1A and Q1B guidelines on environmental conditions and light exposure. We measured the photostability of aqueous carvedilol solutions containing  $\gamma\text{CD}$  or RAMEB at a  $[\text{CD}]/[\text{carvedilol}]$  ratio of 5, relative to that of a control solution. Carvedilol stock solutions (5 mg/mL, 12.3 mM) with  $\gamma\text{CD}$  ( $n=15$ ) or RAMEB ( $n=15$ ) were prepared in water with 13 mM HCl (pH  $\sim 3.5$ ). The control 5 mg/mL aqueous carvedilol stock solution ( $n=15$ ) in the absence of CDs was prepared in  $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$  (50:50), with a final HCl concentration of 13 mM. Acetonitrile was chosen because it generates fewer degradation products than other organic solvents like ethanol or methanol.

All stock solutions were prepared in volumetric flasks and filtered under aseptic conditions through sterile 0.2  $\mu\text{m}$  polyethersulphone filters (PharmAssure, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) into sterile vials. All the vials were then sealed to avoid bacterial contamination and evaporation. Samples were stored in climatic chambers (KBF P240, Binder, Tuttlingen, Germany) and exposed to visible light (7500 lux) and ultraviolet A light ( $1.1 \text{ W}/\text{m}^2$ ) at 298 K and 60% relative humidity. The

carvedilol concentrations in n=3 vials per solution were measured initially (T0) and 1, 2, 3 and 6 months later. The results were expressed as the amount of carvedilol relative to T0. The first-order degradation kinetics were modelled and compared using R software (version 4.0.2) [193].

Degradation products were analysed with the Synapt-G2-Si mass spectrometer hyphenated with UHPLC using the previously described method on a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100x2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) column maintained at 60 °C (333 K) [161]. MS/MS spectra were recorded using the trap cell under Argon as the collision gas.

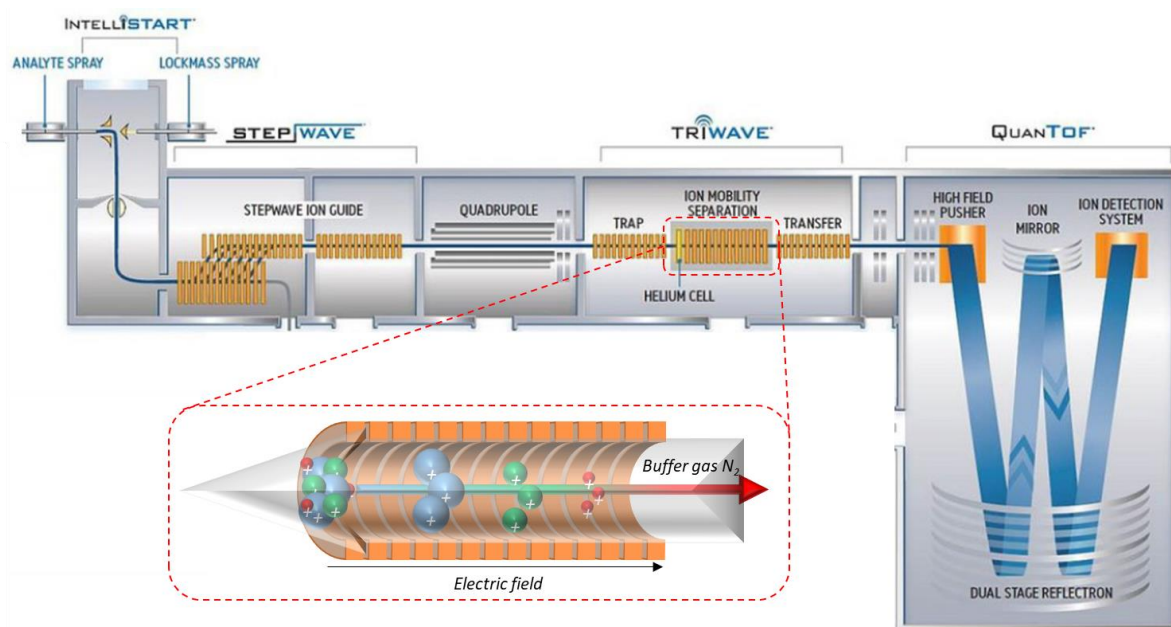
### III.2. Mise en place d'une approche de caractérisation des mélanges de dérivés de CDs

#### III.2.1. Chemicals

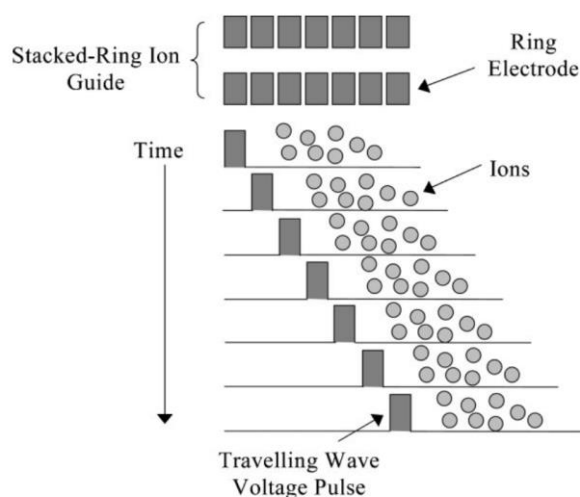
The Lipidyl cyclodextrins Lip $\beta$ CD were obtained by an in-home synthesis developed by Estefania Oliva during her PhD [175,176].  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD, Cavamax W7 Pharma), was supplied by Wacker Chemie AG (Munich, Germany). Deuterated water and DMSO-*d*6 were purchased from Sigma-Aldrich. The water used was MilliQ grade. All solvents used were analytical grade.

#### III.2.2. UHPLC, HRMS, MS/MS and IMS

Analyses were performed with an UPLC H-Class chromatographic system in line with a Synapt-G2-Si hybrid Q-TOF mass spectrometer (Scheme 18) (Waters, Manchester, UK) equipped with an ESI source ionization and a travelling wave ion mobility cell (TWIM, Scheme 19).



Scheme 18 : Representation of the Synapt-G2-Si mass spectrometer with its ion mobility cell (embedded schematic representation).



Scheme 19 : Schematic diagram illustrating the progression of the travelling wave voltage pulse along the TWIM cell [194].

UHPLC conditions: Samples were prepared in MeOH at a concentration of  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\approx 50 \text{ }\mu\text{M}$ ) and  $1 \text{ }\mu\text{L}$  was injected. For UHPLC separations an ACQUITY UPLC BEH C8 (100 mm, 2.1 mm,  $1.8 \text{ }\mu\text{m}$ ) column maintained at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  was used. The elution was performed using a  $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mobile phase gradient of water (A) and methanol (B), programmed as follows (A:B): 60:40 ( $t = 0 \text{ min}$ ), 20:80 ( $t = 10 \text{ min}$ ), 20:80 ( $t = 11 \text{ min}$ ), 0:100 ( $t = 12 \text{ min}$ ), 0:100 ( $t = 15 \text{ min}$ ), 60:40 ( $t = 16 \text{ min}$ ), 60:40 ( $t = 20 \text{ min}$ ).

The ESI source was operated in the positive ionization mode using a capillary voltage of  $+3 \text{ kV}$  and the following conditions: cone voltage,  $120 \text{ V}$ ; source offset,  $20 \text{ V}$ ; source temperature,  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ; desolvation gas temperature,  $450 \text{ }^\circ\text{C}$ ; desolvation gas flow,  $800 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; and cone gas flow,  $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Nitrogen ( $>99.5\%$ ) was employed as the desolvation gas. Mass calibration was carried out using a sodium formate solution ( $10 \text{ mM NaOH}$  in isopropanol/water/formic acid 49.9:49.9:0.2, v/v/v) and the lock mass correction was applied for accurate mass measurements using a Leu-enkephalin solution ( $m/z 556.2771$ ). The scan range was  $m/z 50\text{--}2000$  at  $0.20 \text{ s}\cdot\text{scan}^{-1}$ . The TOF was operated in the resolution mode, providing an average resolving power of 25,000 (FWHM). For MS/MS, spectra were recorded using the trap cell, with a collision energy set to  $95 \text{ eV}$  under Argon (99.9999%) as the collision gas. All spectra were recorded in the continuum mode.

Ion mobility: Ion mobility separation has been carried out with a TWIM cell operating under nitrogen ( $>99.5\%$ ) with wave height (WH), wave velocity (WV), and gas flow values at  $40 \text{ V}$ ,  $550 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  and  $90 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively. The mass of  $\text{DS}=1$  ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$   $m/z 1469.6260$ ) was previously selected by the quadrupole to reduce noise. The TWIM cell needs to be calibrated to obtain collision cross section (CCS) values from drift time [178]: calibration was performed using a MajorMix solution (Waters). Data acquisition was performed with the MassLynx software (V4.2, Waters). The arrival time (AT) of each ions of interest (calibration ions and CDs ions) was extracted with the Driftscope software (V2.9,

Waters) and apex was determined by a gaussian fit performed with the Origin software (v2019, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Direct introduction conditions: the purified isomers (**1**, **4** and **10**) and natural CDs ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD and  $\gamma$ CD) were solubilized at 5  $\mu$ M in different solvents: H<sub>2</sub>O 100%, H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 v/v and MeOH 100%. Each sample (3 per CD) was analyzed by flow injection analysis (FIA) using isocratic H<sub>2</sub>O 100%, H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 v/v or MeOH 100% as the mobile phase with a flow rate of 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. All mass spectrometer and ion mobility parameters were the same as for UHPLC analyses.

To control the calibration efficiency, natural CDs were analyzed and the  $\Delta$  CCS obtained ( $[M+Na]^+$ ) were below 2% in comparison with CCS obtained with DTIMS in the literature (Table 23) [105,114].

Table 23 : Comparison of CCS directly measured by DTIMS\* or obtained with our TWIMS after calibration.

	CCS (DTIMS)*	CCS <sub>exp</sub> (TWIMS)	$\Delta$ (%)
$\alpha$ CD	278.2	280.7	0.89
$\beta$ CD	309.0	312.4	1.11
$\gamma$ CD	316.0	321.0	1.57

\* Values obtained from [114]

### III.2.3 Computational Details

Initial geometries for the twelve isomers of lipidyl- $\beta$ CDs studied in this work were built using the LEaP program from the AmberTools16 distribution [195]. The fragments needed to build the native  $\beta$ CDs were taken from the R.E.DD.B. database [196] under project F-85 and the fragments needed to construct the lipidyl arm were parameterized and defined according to the general strategy we developed previously for substituted cyclodextrins [179]. All molecular dynamics simulations were carried out using the SANDER module from the AmberTools16 program suite [195]. The twelve Lip $\beta$ CD isomers were solvated in a truncated octahedral box with a buffer distance of 10.0 Å. The q4md-CD force field parameters [179] were used to model the  $\beta$ CD scaffold and the AMBER99SB force field [180] was used for the lipidyl substituent. The parameters used for water were taken from the TIP3P model [197]. After minimization, the systems were brought to target temperature by ramping up the temperature over periods of 25 ps followed by a run of 200 ps to relax and equilibrate the system and short classical MD simulations of 5 ns were performed using the NPT ensemble at a pressure of 1 atm and a temperature of 300 K. Finally, metadynamics simulations of 300 ns were then conducted: all biasing to molecular dynamics and definition of collective coordinates were carried out using the open-source, community-developed PLUMED library [198], version 2.4.2. [199] Metadynamics placed potentials of the initial height of 0.3 kcal.mol<sup>-1</sup> and width of 0.1Å for the radius of gyration every 100 steps applying a biasfactor of 20. Throughout the simulations, the weak coupling algorithm [200] was used to regulate the temperature and pressure to 398 K and 1 atm, respectively. The temperature was

maintained close to the intended value by weak coupling to an external temperature bath with a relaxation time of 2 ps and the pressure to an external pressure bath of 1 atm with a coupling constant of 2 ps. The SHAKE algorithm [201] was used to constrain C-H bonds, and a time step of 2 fs was used to integrate the equations of motion. Periodic boundary conditions were imposed during simulation. The distance cutoff of 9.0 Å was applied to non-bonded interactions and the PME method [202] was used to compute long-range interactions. Configurations of the systems were stored at intervals of 1 ps. Analyses of the trajectories were performed using the Cpptraj module [203] available in the AmberTools distribution. The Qhull program [204] was used to evaluate the geometrical surface and the volume of the Lip $\beta$ CD structures, and  $CCS_{th}$  values were calculated with the Impact software using the trajectory method and the projection approximation [205]. These  $CCS_{th}$  values have been calculated on structures extracted from MD simulations in explicit water, hence present a solvated conformation. It has been shown in the literature that for comparisons with IM-MS work performed in vacuum, this strategy is valid because during the evaporation phase, CDs should retain their native solution structure [183]. Furthermore, this assumption has been experimentally verified in this work. But, direct comparisons between theoretical calculations of  $CCS_{th}$  and values obtained through IM-MS experiments is not advisable, as the theoretical structures lack the presence of the Na<sup>+</sup> ion.

#### III.2.4. Purification method

Isomers purification was performed with autopurification system with a 1525 binary pump coupled with a single quadrupole mass spectrometer SQD2 (Waters-Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray ion source (ESI-MS). The separation was performed at room temperature on a Fuji SPS-300-5-C8T (250 mm, 25 mm, 5  $\mu$ m) column using a sample injection volume of 600  $\mu$ L (solution of isomers mixture at 50 g.L<sup>-1</sup> in DMSO). The following mobile phase gradient at a flow rate of 23 mL.min<sup>-1</sup> was used: (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH; (A:B): 70:30 (t = 0 min), 30:70 (t = 20 min), 30:70 (t = 30 min), 0:100 (t = 30.1 min), 0:100 (t = 40 min), 70:30 (t = 40.10 min), 70:30 (t = 50 min). An in-line splitter was set at 1/1000 to reduce the flow toward the ESI-MS source. The ESI source was operated in the positive ionization mode using a capillary voltage of +3 kV and the following conditions: cone voltage, 60 V; source temperature, 150 °C; desolvation gas temperature, 350 °C; desolvation gas flow, 650 L.h<sup>-1</sup>; and cone gas flow, 20 L.h<sup>-1</sup>. Nitrogen (>99.5%) was employed as the desolvation gas. Both [M + Na]<sup>+</sup> (m/z 1470) and [M + 2Na]<sup>2+</sup> (m/z 746) were used to detect and auto-collect DS=1 isomers. Data acquisition and processing were performed with the MassLynx V4.1 software.

#### III.2.5. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analyses

NMR experiments were performed on an AVANCE III 600 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) equipped with a Z-gradient unit (for pulsed-field gradient spectroscopy) and a triple resonance probe (TXI, 5-mm tube). Spectra were acquired at 298 K with close temperature control. DMSO-*d*6 was used as the solvent, with D<sub>2</sub>O 2% to exchange free H of CD's free alcohol groups. The system's pulsecal automation program was used to optimize the duration of the 90° pulse. Residual <sup>1</sup>H signal of deuterated solvent was used as the reference for calibration. One-dimensional NMR spectra were recorded at a resolution of 0.12 Hz (64 K data points). <sup>1</sup>H spectra were obtained with the Bruker sequence zg30. TOCSY experiments were performed using the Bruker sequence mlevph, mixing time was set as 160 ms; F1 and F2 resolution are 37.5 Hz and 4.7 Hz respectively. COSY, relayed COSY and HSQC experiments were carried out using standard sequences of Bruker library. 2D ROESY <sup>1</sup>H NMR experiments were carried out using the phase-sensitive roesyph.2 sequence; the mixing time was set to 800 ms, with resolutions of 2.3 Hz and 18.7 Hz for F2 and F1, respectively. The TopSpin software (Bruker) v3.8 was used for acquisition and v4.0.7 for data treatment.

Some NMR experiments were realized on an AVANCE NEO 900 MHz to gain in resolution and sensitivity. DMSO-*d*6 100 % was used as solvent allowing the observation of alcohol with good resolution. COSY and HSQC experiments were performed using the Bruker sequence cosygpqf and hsqcedetgpsisp (v2.4), respectively. Selective J-Resolved experiments were performed using the DS9\_SERFau2d-pr sequence.

### III.2.6. PCA analyses

MS/MS data treatment: Followed shared ions fragment obtained by MS/MS ([M+Na]<sup>+</sup>, m/z 1469.6260) for the 12 isomers were used : 185.0405, 347.0918, 497.3075, 509.1462, 659.3608, 671.2031, 821.4163, 833.256, 983.472, 995.3152, 1145.5276, 1307.5757. Their intensity (I) were pretreated as follow:  $I \rightarrow \log\left(\frac{I}{I_{parent}}\right)$ . PCA was realized with Pareto scaling to keep small variance's variations between variables.

NMR data: <sup>1</sup>H NMR spectra (600 MHz, 128 scans, D1 = 18 sec, 298K) were recorded with zg pulseprog (600 MHz, Bruker) with larger spectral window (SW = 14 ppm, O1P = 4.7 ppm) to optimize baseline. NMRProcFlow tool (v1.4.16) [189] was used to obtain homogenous baseline correction (global correction, noise windows: 11.5 – 9.0 ppm) on previously phased spectra. From these spectra, NMRprocflow automatically generates and integrates buckets of 0.04 ppm at the following defined windows: 4.95-4.72 (H<sub>1 CD</sub>), 4.15-3.48 (H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6 CD</sub>; H<sub>9-10 Oleate</sub>), 3.39-3.0 (H<sub>2</sub>, H<sub>4 CD</sub>; H<sub>9-10 Oleate</sub>), 2.34-2.14 (H<sub>2 Oleate</sub>), 1.6-1.05 (H of CH<sub>2 Oleate</sub>), 0.95-0.72 (H<sub>18 Oleate</sub>). For each spectrum, the integration values of buckets were normalized to the sum of the integrations to constitute the variables. PCA was performed

with Unit-Variance (UV, standard distribution) scaling to keep same contribution of each windows, i.e. to avoid strong contribution of methyl singlet.

PCA were realized with the Origin software (v2019, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## **Conclusion générale et perspectives**





La première partie de ce manuscrit a été dédiée à l'étude de l'intérêt des CDs pour le développement d'une formulation liquide de carvedilol à destination pédiatrique. A l'exception de l' $\alpha$ CD, toutes les CDs étudiées ont montré un effet solubilisant sur cette substance active, plus ou moins prononcé. Sa faible solubilité aqueuse a nécessité l'utilisation d'un milieu acide afin d'augmenter sa solubilité par la formation de sels. L'efficacité des CDs s'est montrée dépendante du milieu utilisé, malgré une tendance générale selon laquelle la RAMEB est la plus efficace, suivie des dérivés  $\gamma$ CD. L'utilisation d'HCl a finalement permis d'obtenir les résultats de solubilisation attendus, permettant d'atteindre la concentration cible, fixée à 12.3 mM. La nature du milieu, la quantité de CDs utilisée et les constantes d'association mesurées sont en bon accord avec une administration par voie orale de cette solution. Cette étude constitue donc une première étape vers le développement d'une formulation liquide de carvedilol à destination pédiatrique. Ces systèmes ont été caractérisés, démontrant la coexistence de deux complexes d'inclusion de stœchiométries 1:1 avec la RAMEB ou la  $\gamma$ CD, correspondants à l'inclusion des deux groupements aromatiques dans la cavité. L'identification d'un phénomène d'agrégation du carvedilol, l'effet protecteur des CDs et l'analyse des produits de dégradation ont également été étudiés. L'ensemble des informations ainsi obtenues constitue une description homogène de ces systèmes, impliquant le carvedilol et la RAMEB ou la  $\gamma$ CD, qui peut s'avérer utile pour de futures études de substances actives aux motifs structuraux voisins.

Les perspectives de cette étude seraient de déterminer l'intérêt des CDs en terme de biodisponibilité, ce qui permettrait une réduction de la quantité de substance active à administrer aux jeunes patients. Le développement d'une formulation finie, contenant arômes et agents stabilisants est également à envisager, en prenant en considération les faibles constantes d'association pouvant générer une compétition d'inclusion et la précipitation du carvedilol.

Plus généralement, la mise en place d'une approche systématique est à envisager pour l'étude des substances actives classées BCS II et IV et reportées dans les European Pediatric Needs. Pour ce faire, le dopage de phases mobiles par des CDs en chromatographie liquide peut être réalisé afin d'évaluer la force des interactions CDs-SAs de différents systèmes. Le développement d'une unique méthode de chromatographie dédiée à l'élution de composés hydrophobes de différentes natures dans un temps raisonnable en absence de CDs est à envisager. L'observation de la variation des temps de rétention des SAs par l'ajout de différentes CDs dans la phase mobile serait un indicateur de la présence d'interactions. De manière analogue, la comparaison rapide de différents systèmes peut être envisagée grâce à l'analyse par spectrométrie de masse en FIA des SAs, combinée à l'infusion d'une solution de CDs. La faible solubilité aqueuse des SAs de classe BCS II et IV imposerait l'utilisation de solvants organiques en solvant de poussée. Cette approche permettrait d'observer les associations CDs-SA les plus intenses, prenant en considération l'absence de l'effet de l'eau dans la formation des associations. La comparaison systématique des associations observées avec les homologues linéaires

de CDs serait réalisée afin de corriger les intensités observées. Une intensité significative des ions correspondant à leur association serait dans ce cas un indicateur d'une association stabilisée par des forces électrostatiques, également favorables à la formation de complexes d'inclusion en milieux aqueux. L'utilisation de conditions expérimentales identiques, en chromatographie liquide ou en spectrométrie de masse, permettrait la comparaison rapide de nombreux systèmes différents, orientant alors les études de solubilité.

Ces expériences apporteraient des informations en terme de forces d'association entre les SAs et les CDs, sans prendre en considération l'effet solubilisant qui en découle ni l'effet du milieu sur cette association. La formation de sel paraît être une étape indispensable à l'obtention de solubilités suffisamment hautes pour une utilisation pédiatrique de solutions de SAs de classes II et IV en raison de leur faible solubilité aqueuse. La recherche du milieu le plus efficace pour augmenter la solubilité intrinsèque de ces substances en milieu aqueux apparaît donc être une étape préliminaire indispensable, prenant en considération les critères d'acceptabilité pour une administration pédiatrique par voie orale (pH, nature des sels, qualités organoleptiques).

La mise en commun des informations obtenues par chromatographie liquide et /ou spectrométrie de masse avec celles des mesures de solubilité des SAs en absence de CDs devrait permettre de limiter considérablement le nombre d'expériences à réaliser et le temps consacré à chaque système. Néanmoins, la réalisation d'études de solubilité dans l'eau pure reste intéressante en vue de corrélérer les effets solubilisants avec les différences d'interactions définies par les expériences rapides proposées. Les analyses structurales par RMN pourraient également être réalisées directement sur les échantillons préparés lors des expériences de solubilité grâce à l'utilisation de capillaires de D<sub>2</sub>O et de séquences adaptées. Cette approche permettrait de limiter la quantité de SA utilisée pour ces études, de s'affranchir des différences entre l'H<sub>2</sub>O et le D<sub>2</sub>O et de corrélérer directement les caractérisations structurales à l'effet solubilisant des CDs. Un dosage réalisé directement par RMN peut également être envisagé pour atteindre cet objectif.

La deuxième partie de ce manuscrit a été consacrée à la détermination de l'apport du couplage UHPLC-IMS-MS/HRMS pour la caractérisation des mélanges de dérivés de CDs, à travers le modèle des Lip $\beta$ CD. Ce couplage impliquant deux étapes de séparation, l'une en phase liquide et l'autre en phase gazeuse, a permis d'améliorer le niveau de caractérisation des isomères de DS1 de Lip $\beta$ CD en une seule analyse, grâce à son association avec de la modélisation moléculaire. En effet, l'attribution des isomères de position de greffage sur la  $\beta$ CD a pu être réalisée, sans étape de purification. La validation de cette approche, couvrant les conditions expérimentales et l'attribution proposée a été réalisée. L'utilisation d'une modélisation de type métadynamique a généré un grand nombre de structures théoriques, permettant l'obtention d'une distribution de valeurs de CCS analogue aux données expérimentales. De plus, la quantité de conformations représentatives générée mène à la constitution d'une base de données conformationnelles intéressante, pouvant être exploitée par comparaison avec des données expérimentales autres que la CCS. En effet, les expériences ROESY ont expérimentalement démontré un phénomène d'auto-inclusion des Lip $\beta$ CD de DS1, ce qui a été corrélé avec les conformations théoriques. Cette approche permet donc l'amélioration du niveau de caractérisation d'un mélange de dérivés de CDs tout en créant une base de données théoriques pouvant être exploitée à des fins différentes.

Les perspectives principales de ce travail se divisent en trois parties, correspondant à l'amélioration des modèles théoriques, à la recherche de conditions expérimentales plus discriminantes et au transfert de cette approche à d'autres mélanges de CDs modifiées.

Une des limites de l'approche par métadynamique réalisée dans l'eau est l'absence de charge, constituant une différence notable entre les données théoriques et expérimentales issues de la mobilité ionique. Une solution envisageable pour pallier cette limite serait d'extraire les structures représentatives et d'effectuer une seconde étape de modélisation en ajoutant la charge de nature correspondant à celle observée expérimentalement. Réalisée en phase gazeuse, cette seconde étape serait soit de la dynamique moléculaire classique, soit de la minimisation, afin de conserver en partie la conformation représentative extraite de la métadynamique.

La nature de la charge influence significativement les différenciations observables par la mobilité ionique, notamment les différences induites par les métaux alcalins. C'est pourquoi la réussite de l'amélioration du protocole de modélisation moléculaire permettrait, du point de vue expérimental, d'explorer cet effet différenciant. Le cas échéant, l'infusion de solutions de sels de métaux alcalins combinée à la chromatographie permettrait de déterminer si la nature de différents adduits améliore la résolution entre des isomères de CDs modifiées. L'augmentation des différences de CCS, associée à la modélisation, représenterait une amélioration significative de l'approche proposée dans ce chapitre de thèse.

Enfin, l'application de cette approche à d'autres mélanges de dérivés de CDs est à envisager, les Lip $\beta$ CD ayant été utilisés comme modèles. Du point de vue applicatif, les mélanges commerciaux de SBE $\beta$ CD, d'HP $\beta$ CD et de RAMEB sont à étudier. Les différences de structures entre les régioisomères et diastéréoisomères contenus dans ces mélanges étant moins discriminantes que les Lip $\beta$ CD, en terme de taille et de forme, leur différenciation représente un enjeu particulier. D'une part, l'approche d'un regroupement fondé sur la fragmentation MS/MS permettrait une annotation plus détaillée des profils chromatographiques. D'autre part, l'utilisation d'une cellule de mobilité plus résolutive que celle employée dans cette étude est à envisager. Enfin, l'amélioration de l'approche par l'utilisation de métaux alcalins représente un moyen de discrimination pouvant être déterminant, notamment pour les dérivés méthylés.

## **Références bibliographiques**



1. Villiers, A. Sur la transformation de la féculé en dextrine par le ferment butyrique. *Compte Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 1891, CXII, 435–437.
2. Schardinger, F. The Formation of Crystallin Polysaccharides (Dextrins) from Starch Paste by Microorganisms. *Centr. Bakt. Parasitenk* 1911, II Abt.;29, 188–197.
3. Freudenberg, K.; Cramer, F. Constitution of the Schardinger dextrins  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . *Zeitschrift fuer Naturforsch* 1948, 3b, 464.
4. French, D.; Knapp, D.W.; Pazur, J.H. Studies on the Schardinger Dextrins. VI. The Molecular Size and Structure of the  $\gamma$ -Dextrin 1. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, 72, 5150–5152, doi:10.1021/ja01167a096.
5. Steiner, T.; Saenger, W. Geometry of carbon-hydrogen.cntdot.cntdot.cntdot.oxygen hydrogen bonds in carbohydrate crystal structures. Analysis of neutron diffraction data. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10146–10154, doi:10.1021/ja00052a009.
6. Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S.M.; Takaha, T. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues-Beyond the Doughnut. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1787–1802, doi:10.1021/cr9700181.
7. Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743–1754, doi:10.1021/cr970022c.
8. Szejtli, J.; Osa, T. *Comprehensive supramolecular chemistry*; Pergamon: Oxford, 1996, ISBN 0080427154.
9. Brewster, M.E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59, 645–666, doi:10.1016/j.addr.2007.05.012.
10. Ryzhakov, A.; Do Thi, T.; Stappaerts, J.; Bertoletti, L.; Kimpe, K.; Sá Couto, A.R.; Saokham, P.; van den Mooter, G.; Augustijns, P.; Somsen, G.W.; et al. Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions. *J. Pharm. Sci.* 2016, 105, 2556–2569, doi:10.1016/j.xphs.2016.01.019.
11. Loftsson, T.; Saokham, P.; Sá Couto, A.R. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* 2019, 560, 228–234, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.02.004.
12. Jansook, P.; Ogawa, N.; Loftsson, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 2018, 535, 272–284, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.018.
13. Khan, A.R.; Forgo, P.; Stine, K.J.; D'Souza, V.T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1977–1996, doi:10.1021/cr970012b.
14. Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry* 2004, 76, 1825–1845, doi:10.1351/pac200476101825.
15. Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*, 1st ed.; John Wiley & Sons Incorporated: Hoboken, 2006, ISBN 9783527608447.
16. Popielec, A.; Loftsson, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. *Int. J. Pharm.* 2017, 531, 532–542, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.009.
17. Morin-Crini, N.; Fourmentin, S.; Fenyvesi, É.; Lichtfouse, E.; Torri, G.; Fourmentin, M.; Crini, G. 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture, and the industry: a review. *Environ Chem Lett* 2021, 19, 2581–2617, doi:10.1007/s10311-020-01156-w.
18. Periasamy, R. A systematic review on the significant roles of cyclodextrins in the construction of supramolecular systems and their potential usage in various fields. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 2020, 39, 189–216, doi:10.1080/07328303.2020.1792919.



19. Connors, K.A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* 1997, 97, 1325–1358, doi:10.1021/cr960371r.
20. Liu, L.; Guo, Q.-X. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2002, 42, 1–14, doi:10.1023/A:1014520830813.
21. Arima, H.; Higashi, T.; Motoyama, K. Improvement of the bitter taste of drugs by complexation with cyclodextrins: applications, evaluations and mechanisms. *Ther. Deliv.* 2012, 3, 633–644, doi:10.4155/tde.12.28.
22. Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 2004, 39, 1033–1046, doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9.
23. Vikas, Y.; Sandeep, K.; Braham, D.; Manjusha, C.; Budhwar, V. Cyclodextrin Complexes: An Approach to Improve the Physicochemical Properties of Drugs and Applications of Cyclodextrin Complexes. *AJP* 2018, 12, doi:10.22377/AJP.V12I02.2367.
24. Connors, K.A. Population characteristics of cyclodextrin complex stabilities in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, 843–848, doi:10.1002/jps.2600840712.
25. Defaye, J.; García Fernández, J.-M.; Ortiz Mellet, C. Les cyclodextrines en pharmacie : perspectives pour le ciblage d'actifs thérapeutiques et le contrôle d'interactions membranaires. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2007, 65, 33–49, doi:10.1016/S0003-4509(07)90015-2.
26. Szente, L.; Szejtli, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 2004, 15, 137–142, doi:10.1016/j.tifs.2003.09.019.
27. Bilensoy, E. Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine 2011, doi:10.1002/9780470926819.
28. Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* 2010, 62, 1607–1621, doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.
29. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 46, 3–26, doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0.
30. Lipinski, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000, 44, 235–249, doi:10.1016/S1056-8719(00)00107-6.
31. Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2011, 63, 1119–1135, doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01279.x.
32. Stella, V.J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 2008, 36, 30–42, doi:10.1177/0192623307310945.
33. Gonzalez Pereira, A.; Carpena, M.; García Oliveira, P.; Mejuto, J.C.; Prieto, M.A.; Simal Gandara, J. Main Applications of Cyclodextrins in the Food Industry as the Compounds of Choice to Form Host-Guest Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, doi:10.3390/ijms22031339.
34. European medicines Agency. Background review for cyclodextrins used as excipients. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/background-review-cyclodextrins-used-excipients-context-revision-guideline-excipients-label-package\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/background-review-cyclodextrins-used-excipients-context-revision-guideline-excipients-label-package_en.pdf) (accessed on 28 September 2022).

35. Alsarra, I.A.; Ahmed, M.O.; El-Badry, M.; Alanazi, F.K.; Al-Mohizea, A.M.; Ahmed, S.M. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives on the kinetics of degradation of cefotaxime sodium in solution state. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2007, 17, 353–357, doi:10.1016/S1773-2247(07)50054-7.
36. Aso, Y.; Yoshioka, S.; Takeda, Y. Epimerization and racemization of some chiral drugs in the presence of cyclodextrin and liposomes. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1989, 37, 2786–2789, doi:10.1248/cpb.37.2786.
37. Hidaka, S.; Tokumura, T.; Tomono, K.; Suzuki, T.; Ueda, H.; Nagai, T.; Nagaoka, M.; Nakane, R.; Machida, Y. Effect of beta-cyclodextrin on the degradation rate of amoxicillin in acidic solution. *Yakugaku Zasshi* 2010, 130, 889–893, doi:10.1248/yakushi.130.889.
38. Popielec, A.; Fenyvesi, É.; Yannakopoulou, K.; Loftsson, T. Effect of cyclodextrins on the degradation rate of benzylpenicillin. *Pharmazie* 2016, 71, 68–75, doi:10.1691/ph.2016.5114.
39. Ma, D.Q.; Rajewski, R.A.; Vander Velde, D.; Stella, V.J. Comparative Effects of (SBE)7m- $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD on the Stability of Two Anti-neoplastic Agents, Melphalan and Carmustine. *J. Pharm. Sci.* 2000, 89, 275–287, doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2%3C275:AID-JPS15%3E3.0.CO;2-C.
40. Mathiron, D.; Marçon, F.; Dubaele, J.-M.; Cailleu, D.; Pilard, S.; Djedaïni-Pilard, F. Benefits of methylated cyclodextrins in the development of midazolam pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Sci.* 2013, 102, 2102–2111, doi:10.1002/jps.23558.
41. Wouessidjewe, D.; Crassous, A.; Duchêne, D.; Coleman, A.; Rysanek, N.; Tsoucaris, G.; Perly, B.; Djedaini, F. Inclusion of spironolactone in cyclomaltoheptaose: A guest affected by the hospitality of the host. *Carbohydrate Research* 1989, 192, 313–322, doi:10.1016/0008-6215(89)85189-4.
42. Blaschke, G.; Lamparter, E.; Schlüter, J. Racemization and hydrolysis of tropic acid alkaloids in the presence of cyclodextrins. *Chirality* 1993, 5, 78–83, doi:10.1002/chir.530050207.
43. Loftsson, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2002, 44, 63–67, doi:10.1023/a:1023088423667.
44. Khadka, P.; Ro, J.; Kim, H.; Kim, I.; Kim, J.T.; Kim, H.; Cho, J.M.; Yun, G.; Lee, J. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, 9, 304–316, doi:10.1016/j.ajps.2014.05.005.
45. Gwak, H.-S.; Choi, J.-S.; Choi, H.-K. Enhanced bioavailability of piroxicam via salt formation with ethanolamines. *Int. J. Pharm.* 2005, 297, 156–161, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.016.
46. Zawilska, J.B.; Wojcieszak, J.; Olejniczak, A.B. Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacological Reports* 2013, 65, 1–14, doi:10.1016/s1734-1140(13)70959-9.
47. Jouyban, A. Review of the cosolvency models for predicting solubility of drugs in water-cosolvent mixtures. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2008, 11, 32–58, doi:10.18433/j3pp4k.
48. V.K. Mourya; Nazma Inamdar; R.B. Nawale; S.S. Kulthe. Polymeric micelles: General consideration and their applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Research and Education* 2011, 45, 128–138.
49. Leuner, C. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50, 47–60, doi:10.1016/s0939-6411(00)00076-x.
50. Loftsson, T.; Vogensen, S.B.; Brewster, M.E.; Konráðsdóttir, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J. Pharm. Sci.* 2007, 96, 2532–2546, doi:10.1002/jps.20992.
51. Carrier, R.L.; Miller, L.A.; Ahmed, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Control. Release* 2007, 123, 78–99, doi:10.1016/j.jconrel.2007.07.018.

52. Stella, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 36, 3–16, doi:10.1016/s0169-409x(98)00052-0.
53. Dhoka, M.V.; Nimbalkar, U.A.; Pande, A. Preparation of Cefpodoxime Proxetil -polymeric microspheres by the emulsion solvent diffusion method for taste masking. *International journal of PharmTech Research* 2011, 3, 411–419.
54. al-Shammari, S.A.; Khoja, T.; al-Yamani, M.J. Compliance with short-term antibiotic therapy among patients attending primary health centres in Riyadh, Saudi Arabia. *J. R. Soc. Health* 1995, 115, 231–234, doi:10.1177/146642409511500407.
55. Szejtli, J.; Szente, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005, 61, 115–125, doi:10.1016/j.ejpb.2005.05.006.
56. Toda J.; Misaki M.; Konno A.; Wada T.; Yasumatsu K. Interaction of cyclodextrins with taste substances 1985, 1, 19–34.
57. Pereva, S.; Sarafska, T.; Bogdanova, S.; Spassov, T. Efficiency of “cyclodextrin-ibuprofen” inclusion complex formation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2016, 35, 34–39, doi:10.1016/j.jddst.2016.04.006.
58. Mennini, N.; Maestrelli, F.; Cirri, M.; Mura, P. Analysis of physicochemical properties of ternary systems of oxaprozin with randomly methylated- $\beta$ -cyclodextrin and L-arginine aimed to improve the drug solubility. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 129, 350–358, doi:10.1016/j.jpba.2016.07.024.
59. Loh, G.O.K.; Tan, Y.T.F.; Peh, K.-K. Enhancement of norfloxacin solubility via inclusion complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivative hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, 11, 536–546, doi:10.1016/j.ajps.2016.02.009.
60. Kfoury, M.; Auezova, L.; Ruellan, S.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydr. Polym.* 2015, 118, 156–164, doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.073.
61. Miletic, T.; Kyriakos, K.; Graovac, A.; Ibric, S. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: solubility, dissolution rate and chemical stability. *Carbohydr. Polym.* 2013, 98, 122–131, doi:10.1016/j.carbpol.2013.05.084.
62. Wei, Y.; Zhang, J.; Memon, A.H.; Liang, H. Molecular model and in vitro antioxidant activity of a water-soluble and stable phloretin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Molecular Liquids* 2017, 236, 68–75, doi:10.1016/j.molliq.2017.03.098.
63. Xu, J.; Zhang, Y.; Li, X.; Zheng, Y. Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterization and water solubility. *Journal of Molecular Structure* 2017, 1141, 328–334, doi:10.1016/j.molstruc.2017.03.116.
64. Alonso, E.C.P.; Riccomini, K.; Silva, L.A.D.; Galter, D.; Lima, E.M.; Durig, T.; Taveira, S.F.; Martins, F.T.; Cunha-Filho, M.S.S.; Marreto, R.N. Development of carvedilol-cyclodextrin inclusion complexes using fluid-bed granulation: a novel solid-state complexation alternative with technological advantages. *J. Pharm. Pharmacol.* 2016, 68, 1299–1309, doi:10.1111/jphp.12601.
65. Gao, R.; Jin, Y.; Yang, Q.-Y.; Sun, B.-W.; Lin, J. Study of stability and drug-excipient compatibility of estradiol and pharmaceutical excipients. *J Therm Anal Calorim* 2015, 120, 839–845, doi:10.1007/s10973-014-4234-0.

66. Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Santana, B.V.; Nunes, R.S.; Quintans, L.J.; Silva, G.F.; Medeiros, I.A.; Marchioro, M.; Fraga, B.P.; Santos, M.R.V.; et al. Solid-state  $\beta$ -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica Acta* 2012, 548, 45–50, doi:10.1016/j.tca.2012.08.023.
67. Araújo, É.J.F.d.; Silva, O.A.; Rezende-Júnior, L.M.; Sousa, I.J.O.; Araújo, D.Y.M.L.d.; Carvalho, R.B.F.d.; Pereira, S.T.; Gutierrez, S.J.C.; Ferreira, P.M.P.; Lima, F.d.C.A. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure* 2017, 1142, 84–91, doi:10.1016/j.molstruc.2017.04.026.
68. Christoforides, E.; Papaioannou, A.; Bethanis, K. Crystal structure of the inclusion complex of cholesterol in  $\beta$ -cyclodextrin and molecular dynamics studies. *Beilstein J. Org. Chem.* 2018, 14, 838–848, doi:10.3762/bjoc.14.69.
69. Pokharkar, V.; Khanna, A.; Venkatpurwar, V.; Dhar, S.; Mandpe, L. Ternary complexation of carvedilol,  $\beta$ -cyclodextrin and citric acid for mouth-dissolving tablet formulation. *Acta Pharmaceutica* 2009, 59, 85, doi:10.2478/v10007-009-0001-3.
70. Smulevich, G.; Feis, A.; Mazzi, G.; Vincieri, F.F. Inclusion complex formation of 1,8-dihydroxyanthraquinone with cyclodextrins in aqueous solution and in solid state. *J. Pharm. Sci.* 1988, 77, 523–526, doi:10.1002/jps.2600770612.
71. Jadhav, G.S.; Vavia, P.R. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol-beta-cyclodextrin complex. *Int. J. Pharm.* 2008, 352, 5–16, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.005.
72. K., U.; T., F.; F., H.; M., O.; M., Y. Inclusion complexations of steroid hormones with cyclodextrins in water and in solid phase. *Int. J. Pharm.* 1982, 10, 1–15, doi:10.1016/0378-5173(82)90057-6.
73. Hirose, K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2001, 39, 193–209, doi:10.1023/A:1011117412693.
74. Péan, C.; Créminon, C.; Wijkhuisen, A.; Perly, B.; Djedaïni-Pilard, F. Apport de la RMN pour l'étude en solution du complexe  $\beta$ -cyclodextrine/prostaglandine E 2. *J. Chim. Phys.* 1999, 96, 1486–1493, doi:10.1051/jcp:1999224.
75. Amato, M.E.; Djedaïni-Pilard, F.; Perly, B.; Scarlata, G. High field NMR techniques and molecular modelling study of the inclusion complexes of the nootropic drug tenilsetam (CAS-997) in cyclodextrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1992, 26, 2065–2069, doi:10.1039/P29920002065.
76. Otter, A.; Kotovych, G. The solution conformation of the synthetic tubulin fragment Ac-tubulin- $\alpha$ (430–441)-amide based on two-dimensional ROESY experiments. *Can. J. Chem.* 1988, 66, 1814–1820, doi:10.1139/v88-293.
77. Wimmer, R.; Aachmann, F.L.; Larsen, K.L.; Petersen, S.B. NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. *Carbohydrate Research* 2002, 337, 841–849, doi:10.1016/S0008-6215(02)00066-6.
78. Lin, M.; Jayawickrama, D.A.; Rose, R.A.; DelViscio, J.A.; Larive, C.K. Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of the selective complexation of the cis and trans isomers of phenylalanylproline by  $\beta$ -cyclodextrin. *Analytica Chimica Acta* 1995, 307, 449–457, doi:10.1016/0003-2670(95)00006-1.
79. Oliva, E.; Mathiron, D.; Bertaut, E.; Landy, D.; Cailleu, D.; Pilard, S.; Clément, C.; Courrot, E.; Bonnet, V.; Djedaïni-Pilard, F. Physico-chemical studies of resveratrol, methyl-jasmonate and cyclodextrin interactions: an approach to resveratrol bioproduction optimization. *RSC Adv.* 2018, 8, 1528–1538, doi:10.1039/C7RA11619E.

80. Bezamat, J.M.; Yokaichiya, F.; Dias Franco, M.K.K.; Castro, S.R.; Paula, E. de; Cabeça, L.F. Complexation of the local anesthetic pramoxine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin can improve its bioavailability. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2020, 55, 101475, doi:10.1016/j.jddst.2019.101475.
81. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J.F.; Lin, L.-N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* 1989, 179, 131–137, doi:10.1016/0003-2697(89)90213-3.
82. Thordarson, P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 1305–1323, doi:10.1039/c0cs00062k.
83. Schönbeck, C.; Holm, R. Exploring the Origins of Enthalpy-Entropy Compensation by Calorimetric Studies of Cyclodextrin Complexes. *J. Phys. Chem. B* 2019, 123, 6686–6693, doi:10.1021/acs.jpcc.9b03393.
84. Bertaut, E.; Landy, D. Improving ITC studies of cyclodextrin inclusion compounds by global analysis of conventional and non-conventional experiments. *Beilstein J. Org. Chem.* 2014, 10, 2630–2641, doi:10.3762/bjoc.10.275.
85. Higuchi, T.; Connors, K.A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 1965, 4, 117–122.
86. Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* 2005, 302, 18–28, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.042.
87. Loftsson, T.; Másson, M.; Brewster, M.E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* 2004, 93, 1091–1099, doi:10.1002/jps.20047.
88. Loftsson, T.; Másson, M. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. *S.T.P. Pharma Sciences* 1999, 9, 237–242.
89. Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. The complexation efficiency. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2007, 57, 545–552, doi:10.1007/s10847-006-9247-2.
90. Benesi, H.A.; Hildebrand, J.H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71, 2703–2707, doi:10.1021/ja01176a030.
91. Job P. Formation and stability complexes in solution. *Ann. Chim.* 1928, 9, 113–203.
92. Mathiron, D.; Iori, R.; Pilard, S.; Soundara Rajan, T.; Landy, D.; Mazzon, E.; Rollin, P.; Djedaïni-Pilard, F. A Combined Approach of NMR and Mass Spectrometry Techniques Applied to the  $\alpha$ -Cyclodextrin/Moringin Complex for a Novel Bioactive Formulation †. *Molecules* 2018, 23, doi:10.3390/molecules23071714.
93. YANG, C.; Liu, L.; MU, T.-W.; Guo, Q.-X. The Performance of the Benesi-Hildebrand Method in Measuring the Binding Constants of the Cyclodextrin Complexation. *J. Pharm. Sci.* 2000, 16, 537–539, doi:10.2116/analsci.16.537.
94. Djedaini, F.; Zhao Lin, S.; Perly, B.; Wouessidjewe, D. High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a [beta]-cyclodextrin:indomethacin inclusion complex. *J. Pharm. Sci.* 1990, 79, 643–646.
95. Ulatowski, F.; Dąbrowa, K.; Bałakier, T.; Jurczak, J. Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host-Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* 2016, 81, 1746–1756, doi:10.1021/acs.joc.5b02909.
96. Brynn Hibbert, D.; Thordarson, P. The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis. *Chem. Commun. (Camb)* 2016, 52, 12792–12805, doi:10.1039/c6cc03888c.

97. Przybylski, M.; Glocker, M.O. Electrospray Mass Spectrometry of Biomacromolecular Complexes with Noncovalent Interactions—New Analytical Perspectives for Supramolecular Chemistry and Molecular Recognition Processes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 806–826, doi:10.1002/anie.199608061.
98. Schalley, C.A. Molecular recognition and supramolecular chemistry in the gas phase. *Mass Spectrom. Rev.* 2001, 20, 253–309, doi:10.1002/mas.10009.
99. Gabelica, V.; Galic, N.; Pauw, E. de. On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002, 13, 946–953, doi:10.1016/s1044-0305(02)00416-6.
100. Guo, M.; Song, F.; Liu, Z.; Liu, S. Characterization of non-covalent complexes of rutin with cyclodextrins by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2004, 39, 594–599, doi:10.1002/jms.605.
101. Lee, J.-U.; Lee, S.-S.; Lee, S.; Oh, H.B. Noncovalent Complexes of Cyclodextrin with Small Organic Molecules: Applications and Insights into Host-Guest Interactions in the Gas Phase and Condensed Phase. *Molecules* 2020, 25, doi:10.3390/molecules25184048.
102. Daniel, J.M.; Friess, S.D.; Rajagopalan, S.; Wendt, S.; Zenobi, R. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 2002, 216, 1–27, doi:10.1016/S1387-3806(02)00585-7.
103. Chen, Y.; Zuo, Z.; Dai, X.; Xiao, P.; Fang, X.; Wang, X.; Wang, W.; Ding, C.-F. Gas-phase complexation of  $\alpha$ - $\beta$ -cyclodextrin with amino acids studied by ion mobility-mass spectrometry and molecular dynamics simulations. *Talanta* 2018, 186, 1–7, doi:10.1016/j.talanta.2018.04.003.
104. Qi, Y.; Geib, T.; Volmer, D.A. Determining the Binding Sites of  $\beta$ -Cyclodextrin and Peptides by Electron-Capture Dissociation High Resolution Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2015, 26, 1143–1149, doi:10.1007/s13361-015-1118-x.
105. Mason, E.A.; Schamp, H.W. Mobility of gaseous ions in weak electric fields. *Annals of Physics* 1958, 4, 233–270, doi:10.1016/0003-4916(58)90049-6.
106. Kralj, B.; Smidovnik, A.; Kobe, J. Mass spectrometric investigations of alpha- and beta-cyclodextrin complexes with ortho-, meta- and para-coumaric acids by negative mode electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 171–180, doi:10.1002/rcm.3868.
107. Zimnicka, M.; Troć, A.; Ceborska, M.; Jakubczak, M.; Koliński, M.; Danikiewicz, W. Structural elucidation of specific noncovalent association of folic acid with native cyclodextrins using an ion mobility mass spectrometry and theoretical approach. *Anal. Chem.* 2014, 86, 4249–4255, doi:10.1021/ac4039042.
108. Przybylski, C.; Bonnet, V. Discrimination of cyclic and linear oligosaccharides by tandem mass spectrometry using collision-induced dissociation (CID), pulsed-Q-dissociation (PQD) and the higher-energy C-trap dissociation modes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, 27, 75–87, doi:10.1002/rcm.6422.
109. Bruni, P.S.; Schürch, S. Fragmentation mechanisms of protonated cyclodextrins in tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 2021, 504, 108316, doi:10.1016/j.carres.2021.108316.
110. Yamagaki, T.; Sato, A. Peak width-mass correlation in CID MS/MS of isomeric oligosaccharides using traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2009, 44, 1509–1517, doi:10.1002/jms.1641.
111. Liu, Y.; Clemmer, D.E. Characterizing oligosaccharides using injected-ion mobility/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2504–2509, doi:10.1021/ac9701344.

112. Lee, S.; Wyttenbach, T.; Bowers, M.T. Gas phase structures of sodiated oligosaccharides by ion mobility/ion chromatography methods. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1997, 167-168, 605–614, doi:10.1016/S0168-1176(97)00105-5.
113. Dodds, J.N.; Baker, E.S. Ion Mobility Spectrometry: Fundamental Concepts, Instrumentation, Applications, and the Road Ahead. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2019, 30, 2185–2195, doi:10.1007/s13361-019-02288-2.
114. Klein, C.; Cologna, S.M.; Kurulugama, R.T.; Blank, P.S.; Darland, E.; Mordehai, A.; Backlund, P.S.; Yergey, A.L. Cyclodextrin and malto-dextrose collision cross sections determined in a drift tube ion mobility mass spectrometer using nitrogen bath gas. *Analyst* 2018, 143, 4147–4154, doi:10.1039/c8an00646f.
115. Rabus, J.M.; Pellegrinelli, R.P.; Khodr, A.H.A.; Bythell, B.J.; Rizzo, T.R.; Carrascosa, E. Unravelling the structures of sodiated  $\beta$ -cyclodextrin and its fragments. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021, 23, 13714–13723, doi:10.1039/d1cp01058a.
116. Liu, J.; Wang, B.; Przybylski, C.; Bistri-Aslanoff, O.; Ménand, M.; Zhang, Y.; Sollogoub, M. Programmed Synthesis of Hepta-Differentiated  $\beta$ -Cyclodextrin: 1 out of 117655 Arrangements. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2021, 60, 12090–12096, doi:10.1002/anie.202102182.
117. Szente, L.; Szemán, J.; Sohajda, T. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 130, 347–365, doi:10.1016/j.jpba.2016.05.009.
118. Fenyvesi, É.; Szemán, J.; Csabai, K.; Malanga, M.; Szente, L. Methyl-beta-cyclodextrins: the role of number and types of substituents in solubilizing power. *J. Pharm. Sci.* 2014, 103, 1443–1452, doi:10.1002/jps.23917.
119. Schönbeck, C.; Westh, P.; Madsen, J.C.; Larsen, K.L.; Städe, L.W.; Holm, R. Hydroxypropyl-substituted  $\beta$ -cyclodextrins: influence of degree of substitution on the thermodynamics of complexation with tauroconjugated and glycoconjugated bile salts. *Langmuir* 2010, 26, 17949–17957, doi:10.1021/la103124n.
120. Schönbeck, C.; Westh, P.; Madsen, J.C.; Larsen, K.L.; Städe, L.W.; Holm, R. Methylated  $\beta$ -cyclodextrins: influence of degree and pattern of substitution on the thermodynamics of complexation with tauro- and glycoconjugated bile salts. *Langmuir* 2011, 27, 5832–5841, doi:10.1021/la200381f.
121. Tongiani, S.; Velde, D.V.; Ozeki, T.; Stella, V.J. Sulfoalkyl ether-alkyl ether cyclodextrin derivatives, their synthesis, NMR characterization, and binding of 6 $\alpha$ -methylprednisolone. *J. Pharm. Sci.* 2005, 94, 2380–2392, doi:10.1002/jps.20367.
122. Malanga, M.; Szemán, J.; Fenyvesi, É.; Puskás, I.; Csabai, K.; Gyémánt, G.; Fenyvesi, F.; Szente, L. "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 2016, 105, 2921–2931, doi:10.1016/j.xphs.2016.04.034.
123. Beadle, J.B. Analysis of cyclodextrin mixtures by gas chromatography of their dimethylsilyl ethers. *Journal of Chromatography A* 1969, 42, 201–206, doi:10.1016/S0021-9673(01)80616-6.
124. Deege, A.; Husmann, H.; Hübinger, E.; Kobor, F.; Schomburg, G. Purification and analysis of partially alkylated cyclodextrins by liquid and gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 1993, 16, 587–593, doi:10.1002/jhrc.1240161004.
125. Szemán, J.; Csabai, K.; Kékesi, K.; Szente, L.; Varga, G. Novel stationary phases for high-performance liquid chromatography analysis of cyclodextrin derivatives. *J. Chromatogr. A* 2006, 1116, 76–82, doi:10.1016/j.chroma.2006.03.019.

126. Jaramillo, M.; Kirschner, D.L.; Dai, Z.; Green, T.K. Separation of sulfoalkylated cyclodextrins with hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2013, 1316, 92–96, doi:10.1016/j.chroma.2013.09.080.
127. Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. Characterization of sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrins mixtures by anion-exchange chromatography using evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* 2000, 897, 185–193, doi:10.1016/S0021-9673(00)00816-5.
128. Luna, E.A.; Bornancini, E.R.; Thompson, D.O.; Rajewski, R.A.; Stella, V.J. Characterization of Sulfobutyl Ether  $\beta$ -Cyclodextrin Mixtures 1996, 120, 133–136, doi:10.1007/978-94-011-5448-2\_28.
129. Caron, I.; Elfakir, C.; Dreux, M. Partially Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin Analysis: A Systematic Approach to Appropriate RP Column Selection. *J. High Resol. Chromatogr.* 1998, 21, 554–560, doi:10.1002/(SICI)1521-4168(19981001)21:10%3C554:AID-JHRC554%3E3.0.CO;2-E.
130. Fougère, L.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Evaluation of a liquid chromatography method for quality control of methylated cyclodextrins. *J. Chromatogr. A* 2013, 1277, 42–47, doi:10.1016/j.chroma.2012.12.053.
131. Mercier, J.P.; Debrun, J.L.; Dreux, M.; Elfakir, C.; Hakim, B. Mass spectrometric study of randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrins using ionspray, atmospheric pressure chemical ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 68–70, doi:10.1002/(SICI)1097-0231(20000130)14:2%3C68:AID-RCM835%3E3.0.CO;2-W.
132. Jacquet, R.; Favetta, P.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Characterization of a new methylated beta-cyclodextrin with a low degree of substitution by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and liquid chromatography using evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* 2005, 1083, 106–112, doi:10.1016/j.chroma.2005.06.021.
133. Kieken, F.; West, C.; Keddadouche, K.; Elfakir, C.; Choisnard, L.; Gèze, A.; Wouessidjewe, D. Characterisation of complex amphiphilic cyclodextrin mixtures by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008, 1189, 385–391, doi:10.1016/j.chroma.2007.10.049.
134. Salvador, A.; Herbreteau, B.; Dreux, M. Electrospray mass spectrometry and supercritical fluid chromatography of methylated  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* 1999, 855, 645–656, doi:10.1016/S0021-9673(99)00718-9.
135. Eggertsen, R.; Sivertsson, R.; Andrén, L.; Hansson, L. Haemodynamic Effects of Carvedilol, A new Beta-Adrenoreceptor Blocker and Precapillary Vasodilator in Essential Hypertension. *Journal of Hypertension* 1984, 2, 529–534.
136. Wiedemann, F.; Kampe, W.; Thiel, M.; Sponer, G.; Roesch, E.; Dietmann, K. Carboxyl-(4)-oxypropanolamine compounds and therapeutic compositions, 1985, US 4503067 A.
137. Beattie, K.; Phadke, G.; Novakovic, J. Carvedilol. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 2013, 38, 113–157, doi:10.1016/B978-0-12-407691-4.00004-6.
138. Kim, S.J.; Jong, C.W.; Kang, H.B.; Moon, B.H.; Quan, L.G.; Won, D.K.; Jin, K.Y. Process for the preparation of highly optical pure carvedilol, 2009, US 20090176992 A1.
139. Keating, G.M.; Jarvis, B. Carvedilol A Review of its Use in Chronic Heart Failure. *Drugs* 2003, 63, 1697–1741.
140. Ruffolo, R.R.; Feuerstein, G.Z. Carvedilol. *Comprehensive Medicinal Chemistry II* 2007, 8, 137–147.
141. Ruffolo, R.R.; Feuerstein, G.Z. Carvedilol case history: the discovery and development of the first  $\beta$ -blocker for the treatment of congestive heart failure. In *Carvedilol // Comprehensive medicinal chemistry II*;



Ruffolo, R.R., Feuerstein, G.Z., Taylor, J.B., Triggle, D.J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, London, 2007; pp 85–89, ISBN 0-08-044521-7.

142. Hamed, R.; Awadallah, A.; Sunoqrot, S.; Tarawneh, O.; Nazzal, S.; AlBaraghthi, T.; Al Sayyad, J.; Abbas, A. pH-Dependent Solubility and Dissolution Behavior of Carvedilol--Case Example of a Weakly Basic BCS Class II Drug. *AAPS PharmSciTech* 2016, 17, 418–426, doi:10.1208/s12249-015-0365-2.

143. Schönherr, D.; Wollatz, U.; Haznar-Garbacz, D.; Hanke, U.; Box, K.J.; Taylor, R.; Ruiz, R.; Beato, S.; Becker, D.; Weitschies, W. Characterisation of selected active agents regarding pKa values, solubility concentrations and pH profiles by SiriusT3. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, 92, 155–170, doi:10.1016/j.ejpb.2015.02.028.

144. Alabed, S.; Sabouni, A.; Al Dakhoul, S.; Bdaiwi, Y.; Frobels-Mercier, A.-K. Beta-blockers for congestive heart failure in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016, 7, CD007037, doi:10.1002/14651858.CD007037.pub3.

145. European medicines Agency. Inventory of paediatric therapeutic needs - Cardiovascular diseases. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/inventory-paediatric-medicines-cardiovascular-therapeutic-area\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/inventory-paediatric-medicines-cardiovascular-therapeutic-area_en.pdf) (accessed on 28 September 2022).

146. Sharma, A.; Jain, C.P. Carvedilol- $\beta$ -cyclodextrin Systems: Preparation, Characterization and in vitro Evaluation. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci* 2013, 12, 51–58, doi:10.3329/dujps.v12i1.16300.

147. R. Arun Raj, Sruthy S. Nair, Jyoti Harindran. Formulation and evaluation of cyclodextrin inclusion complex tablets of carvedilol. *Asian Journal of Pharmaceutics* 2016, 10, 84-94.

148. Wen, X.; Tan, F.; Jing, Z.; Liu, Z. Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 34, 517–523, doi:10.1016/S0731-7085(03)00576-4.

149. Cappello, B.; Rosa, G. de; Giannini, L.; La Rotonda, M.I.; Mensitieri, G.; Miro, A.; Quaglia, F.; Russo, R. Cyclodextrin-containing poly(ethyleneoxide) tablets for the delivery of poorly soluble drugs: potential as buccal delivery system. *Int. J. Pharm.* 2006, 319, 63–70, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.03.031.

150. Hirlekar, R.; Kadam, V. Preparation and characterization of inclusion complexes of carvedilol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2009, 63, 219–224, doi:10.1007/s10847-008-9506-5.

151. JESSIE SOFIA PAMUDJI, RACHMAT MAULUDIN, VISI ANISA LESTARI. IMPROVEMENT OF CARVEDILOL DISSOLUTION RATE THROUGH FORMATION OF INCLUSION COMPLEX WITH B-CYCLODEXTRIN. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014, 6, 228–233.

152. Taveira, S.F.; Varela-Garcia, A.; Dos Santos Souza, B.; Marreto, R.N.; Martin-Pastor, M.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C. Cyclodextrin-based poly(pseudo)rotaxanes for transdermal delivery of carvedilol. *Carbohydr. Polym.* 2018, 200, 278–288, doi:10.1016/j.carbpol.2018.08.017.

153. Abdelmoumin Zoghbi, B.W.\*. CARVEDILOL SOLUBILITY ENHANCEMENT BY INCLUSION COMPLEXATION AND SOLID DISPERSION: REVIEW. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 2015, 5, 1–8.

154. Savic-Gajic, I.; Savic, I.M.; Nikolic, V.D.; Nikolic, L.B.; Popsavin, M.M.; Kapor, A.J. Study of the solubility, photostability and structure of inclusion complexes of carvedilol with  $\beta$ -cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2016, 86, 7–17, doi:10.1007/s10847-016-0635-y.

155. Zoghbi, A.; Geng, T.; Wang, B. Dual Activity of Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin and Water-Soluble Carriers on the Solubility of Carvedilol. *AAPS PharmSciTech* 2017, 18, 2927–2935, doi:10.1208/s12249-017-0769-2.

156. Shewale, B.D.; Sapkal, N.P.; Raut, N.A.; Gaikwad, N.J.; Fursule, R.A. Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on Solubility of Carvedilol. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 70, 255–257, doi:10.4103/0250-474X.41470.

157. Loftsson, T.; Vogensen, S.B.; Desbos, C.; Jansook, P. Carvedilol: solubilization and cyclodextrin complexation: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 2008, 9, 425–430, doi:10.1208/s12249-008-9055-7.
158. Mistry, P.; Batchelor, H. Evidence of acceptability of oral paediatric medicines: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 2017, 69, 361–376, doi:10.1111/jphp.12610.
159. Avdeef, A.; Fuguet, E.; Llinàs, A.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Völgyi, G.; Verbić, T.; Boldyreva, E.; Takács-Novák, K. Equilibrium solubility measurement of ionizable drugs – consensus recommendations for improving data quality. *ADMET DMPK* 2016, 4, 117, doi:10.5599/admet.4.2.292.
160. Kfoury, M.; Landy, D.; Fourmentin, S. Characterization of Cyclodextrin/Volatile Inclusion Complexes: A Review. *Molecules* 2018, 23, doi:10.3390/molecules23051204.
161. Sajjan P.G, Rohith T., Santosh P., Mantelingu K., Rangappa K.S., Kumara M.N. Rapid, Highly efficient and stability indicating RP-UPLC method for the quantitative determination of potential impurities of carvedilol active pharmaceutical ingredient. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014, 6, 214–220.
162. Kawakami, K.; Miyoshi, K.; Ida, Y. Impact of the amount of excess solids on apparent solubility. *Pharm. Res.* 2005, 22, 1537–1543, doi:10.1007/s11095-005-6247-7.
163. Uekama, K.; Otagiri, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1987, 3, 1–40.
164. Food and Drug Administration. US FDA/CFSAN - Approximate pH of Foods and Food Products. Available online: [https://www.webpal.org/SAFE/aaarecovery/2\\_food\\_storage/Processing/lacf-phs.htm](https://www.webpal.org/SAFE/aaarecovery/2_food_storage/Processing/lacf-phs.htm).
165. Fine-Shamir, N.; Beig, A.; Zur, M.; Lindley, D.; Miller, J.M.; Dahan, A. Toward Successful Cyclodextrin Based Solubility-Enabling Formulations for Oral Delivery of Lipophilic Drugs: Solubility-Permeability Trade-Off, Biorelevant Dissolution, and the Unstirred Water Layer. *Mol. Pharm.* 2017, 14, 2138–2146, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00275.
166. Lanzanova, F.A.; Argenta, D.; Arend, M.Z.; Junior, L.B.; Cardoso, S.G. LC and LC-MS Evaluation of Stress Degradation Behavior of Carvedilol. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2009, 32, 526–543, doi:10.1080/10826070802671481.
167. Stojanovic, J.; Vladimirov, S.; Marinkovic, V.; Velickovic, D.; Sibinovic, P. Monitoring of the photochemical stability of carvedilol and its degradation products by the RP-HPLC method. *J Serb Chem Soc* 2007, 72, 37–44, doi:10.2298/JSC0701037S.
168. Martin, T.; Moody, C.J. A new route to 1-oxygenated carbazoles. Synthesis of the carbazole alkaloids murrayafoline-A and murrayaquinone-A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1988, 235, doi:10.1039/P19880000235.
169. Domalain, V.; Hubert-Roux, M.; Tognetti, V.; Joubert, L.; Lange, C.M.; Rouden, J.; Afonso, C. Enantiomeric differentiation of aromatic amino acids using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Chem. Sci.* 2014, 5, 3234–3239, doi:10.1039/c4sc00443d.
170. Wu, Q.; Wang, J.-Y.; Han, D.-Q.; Yao, Z.-P. Recent advances in differentiation of isomers by ion mobility mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2020, 124, 115801, doi:10.1016/j.trac.2019.115801.
171. Hofmann, J.; Hahm, H.S.; Seeberger, P.H.; Pagel, K. Identification of carbohydrate anomers using ion mobility-mass spectrometry. *Nature* 2015, 526, 241–244, doi:10.1038/nature15388.
172. Juvonen, M.; Bakx, E.; Schols, H.; Tenkanen, M. Separation of isomeric cereal-derived arabinoxylan-oligosaccharides by collision induced dissociation-travelling wave ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (CID-TWIMS-MS/MS). *Food Chem.* 2022, 366, 130544, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130544.

173. Li, H.; Bendiak, B.; Siems, W.F.; Gang, D.R.; Hill, H.H. Ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric disaccharide precursor, product and cluster ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, 27, 2699–2709, doi:10.1002/rcm.6720.
174. Dear, G.J.; Munoz-Muriedas, J.; Beaumont, C.; Roberts, A.; Kirk, J.; Williams, J.P.; Campuzano, I. Sites of metabolic substitution: investigating metabolite structures utilising ion mobility and molecular modelling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010, 24, 3157–3162, doi:10.1002/rcm.4742.
175. Oliva, E. Nano-réacteurs à base de cyclodextrines amphiphiles pour la catalyse et la vectorisation; LG2A, UPJV, 2019.
176. Oliva, E.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Monflier, E.; Sevin, E.; Bricout, H.; Tilloy, S.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Bonnet, V.; et al. New Lipidyl-Cyclodextrins Obtained by Ring Opening of Methyl Oleate Epoxide Using Ball Milling. *Biomolecules* 2020, 10, doi:10.3390/biom10020339.
177. B.Y., C. PCA: The Basic Building Block of Chemometrics. In *Analytical Chemistry*; Krull, I.S., Ed.; InTech, 2012, ISBN 978-953-51-0837-5.
178. Lanucara, F.; Holman, S.W.; Gray, C.J.; Evers, C.E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat. Chem.* 2014, 6, 281–294, doi:10.1038/nchem.1889.
179. Cézard, C.; Trivelli, X.; Aubry, F.; Djedaïni-Pilard, F.; Dupradeau, F.-Y. Molecular dynamics studies of native and substituted cyclodextrins in different media: 1. Charge derivation and force field performances. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13, 15103–15121, doi:10.1039/c1cp20854c.
180. Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 2006, 65, 712–725, doi:10.1002/prot.21123.
181. Lobanov, M.Y.; Bogatyreva, N.S.; Galzitskaya, O.V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Mol Biol* 2008, 42, 623–628, doi:10.1134/S0026893308040195.
182. Cuyckens, F.; Wassvik, C.; Mortishire-Smith, R.J.; Tresadern, G.; Campuzano, I.; Claereboudt, J. Product ion mobility as a promising tool for assignment of positional isomers of drug metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25, 3497–3503, doi:10.1002/rcm.5258.
183. Servage, K.A.; Silveira, J.A.; Fort, K.L.; Russell, D.H. From solution to gas phase: the implications of intramolecular interactions on the evaporative dynamics of substance P during electrospray ionization. *J. Phys. Chem. B* 2015, 119, 4693–4698, doi:10.1021/jp512708u.
184. Wyttenbach, T.; Bowers, M.T. Structural stability from solution to the gas phase: native solution structure of ubiquitin survives analysis in a solvent-free ion mobility-mass spectrometry environment. *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 12266–12275, doi:10.1021/jp206867a.
185. Cumeras, R.; Figueras, E.; Davis, C.E.; Baumbach, J.I.; Gràcia, I. Review on ion mobility spectrometry. Part 2: hyphenated methods and effects of experimental parameters. *Analyst* 2015, 140, 1391–1410, doi:10.1039/c4an01101e.
186. Brantley, M.; Zekavat, B.; Harper, B.; Mason, R.; Solouki, T. Automated deconvolution of overlapped ion mobility profiles. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2014, 25, 1810–1819, doi:10.1007/s13361-014-0963-3.
187. Brantley, M.R.; Pettit, M.E.; Harper, B.; Brown, B.; Solouki, T. Automated peak width measurements for targeted analysis of ion mobility unresolved species. *Analytica Chimica Acta* 2016, 941, 49–60, doi:10.1016/j.aca.2016.08.019.

188. Gao, R.; Li, J.; Gao, W.; Li, L.; Wang, X.; Wu, B.; Wu, Y.; Yu, J. An overlapping peaks separation algorithm for ion mobility spectrometry based on second-order differentiation and dynamic inertia weight particle swarm optimization algorithm. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2022, 36, e9220, doi:10.1002/rcm.9220.
189. Jacob, D.; Deborde, C.; Lefebvre, M.; Maucourt, M.; Moing, A. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics* 2017, 13, 36, doi:10.1007/s11306-017-1178-y.
190. Letort, S.; Mathiron, D.; Grel, T.; Albaret, C.; Daulon, S.; Djedaini-Pilard, F.; Gouhier, G.; Estour, F. The first 2(IB),3(IA)-heterodifunctionalized  $\beta$ -cyclodextrin derivatives as artificial enzymes. *Chem. Commun. (Camb)* 2015, 51, 2601–2604, doi:10.1039/c4cc09189b.
191. Rivero-Barbarroja, G.; Benito, J.M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J.M. Cyclodextrin-Based Functional Glyconanomaterials. *Nanomaterials (Basel)* 2020, 10, doi:10.3390/nano10122517.
192. Djedaini-Pilard, F.; Nevers, M.-C.; Weisse, S.; Grassi, J.; Perly, B.; Créminon, C. A sensitive and specific enzyme immunoassay for the detection of methyl ether derivatives of cyclomaltoheptaose. *Carbohydrate Research* 2003, 338, 2091–2099, doi:10.1016/S0008-6215(03)00311-2.
193. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
194. Giles, K.; Pringle, S.D.; Worthington, K.R.; Little, D.; Wildgoose, J.L.; Bateman, R.H. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 2401–2414, doi:10.1002/rcm.1641.
195. Case DA, Betz BM, Botello-Smith W, Cerutti, Cheatham I, T.E. , T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, York DM, Kollman PA. AMBER 2016; University of California, San Francisco, 2016.
196. Dupradeau, F.-Y.; Pigache, A.; Zaffran, T.; Savineau, C.; Lelong, R.; Grivel, N.; Lelong, D.; Rosanski, W.; Cieplak, P. The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 7821–7839, doi:10.1039/C0CP00111B.
197. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 1983, 79, 926–935, doi:10.1063/1.445869.
198. Bonomi M, Bussi G, Camilloni C, Tribello GA, Banáš P, Barducci A, Bernetti M, Bolhuis PG, Bottaro S, Branduardi D, Capelli R, Carloni P, Ceriotti M, Cesari A, Chen H, Chen W, Colizzi F, De S, De La Pierre M, Donadio D, Drobot V, Ensing B, Ferguson AL, Filizola M, Fraser JS, Fu H, Gasparotto P, Gervasio FL, Giberti F, Gil-Ley A, Giorgino T, Heller GT, Hocky GM, Iannuzzi M, Invernizzi M, Jelfs KE, Jussupow A, Kirilin E, Laio A, Limongelli V, Lindorff-Larsen K, Löhr T, Marinelli F, Martin-Samos L, Masetti M, Meyer R, Michaelides A, Molteni C, Morishita T, Nava M, Paissoni C, Papaleo E, Parrinello M, Pfaendtner J, Piaggi P, Piccini G, Pietropaolo A, Pietrucci F, Pipolo S, Provasi D, Quigley D, Raiteri P, Raniolo S, Rydzewski J, Salvalaglio M, Sosso GC, Spiwok V, Šponer J, Swenson DWH, Tiwary P, Valsson O, Vendruscolo M, Voth GA, White A. Promoting transparency and reproducibility in enhanced molecular simulations. *Nat. Methods* 2019, 16, 670–673, doi:10.1038/s41592-019-0506-8.
199. Tribello, G.A.; Bonomi, M.; Branduardi, D.; Camilloni, C.; Bussi, G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Computer Physics Communications* 2014, 185, 604–613, doi:10.1016/j.cpc.2013.09.018.
200. Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; DiNola, A.; Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 1984, 81, 3684–3690, doi:10.1063/1.448118.

201. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* 1977, 23, 327–341, doi:10.1016/0021-9991(77)90098-5.
202. Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* 1995, 103, 8577–8593, doi:10.1063/1.470117.
203. Roe, D.R.; Cheatham, T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* 2013, 9, 3084–3095, doi:10.1021/ct400341p.
204. Barber, C.B.; Dobkin, D.P.; Huhdanpaa, H. The quickhull algorithm for convex hulls. *ACM Trans. Math. Softw.* 1996, 22, 469–483, doi:10.1145/235815.235821.
205. Marklund, E.G.; Degiacomi, M.T.; Robinson, C.V.; Baldwin, A.J.; Benesch, J.L.P. Collision cross sections for structural proteomics. *Structure* 2015, 23, 791–799, doi:10.1016/j.str.2015.02.010.






# Annexe 1

*Rigaud, S.; Mathiron, D.; Moufawad, T.; Landy, D.; Djedaini-Pilard, F.; Marçon, F. Cyclodextrin Complexation as a Way of Increasing the Aqueous Solubility and Stability of Carvedilol. *Pharmaceutics* **2021**, 13, 1746, doi:10.3390/pharmaceutics13111746.*



## Article

# Cyclodextrin Complexation as a Way of Increasing the Aqueous Solubility and Stability of Carvedilol

Sébastien Rigaud <sup>1</sup>, David Mathiron <sup>2</sup>, Tarek Moufawad <sup>3</sup>, David Landy <sup>3</sup>, Florence Djedaini-Pilard <sup>1,\*</sup>  
and Frédéric Marçon <sup>4,5</sup>

- <sup>1</sup> Laboratoire de Glycochimie des Antimicrobiens et des Agroressources UMR 7378 CNRS, Université de Picardie Jules Verne, 33 Rue Saint-Leu, F-80039 Amiens, France; sebastien.rigaud@etud.u-picardie.fr
- <sup>2</sup> Plateforme-Analytique, Université de Picardie Jules Verne, 33 Rue Saint-Leu, F-80039 Amiens, France; david.mathiron@u-picardie.fr
- <sup>3</sup> Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, UR 4492), ULCO, F-59140 Dunkerque, France; tarek.moufawad@univ-littoral.fr (T.M.); david.landy@univ-littoral.fr (D.L.)
- <sup>4</sup> Laboratoire AGIR UR4294, Université de Picardie Jules Verne, 1 Rue des Louvels, F-80039 Amiens, France; frederic.marcon@u-picardie.fr
- <sup>5</sup> Pharmacie à Usage Intérieur, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens-Picardie, 1 Rue du Professeur Christian Cabrol, F-80054 Amiens, France
- \* Correspondence: florence.pilard@u-picardie.fr; Tel.: +33-322-827-562



**Citation:** Rigaud, S.; Mathiron, D.; Moufawad, T.; Landy, D.; Djedaini-Pilard, F.; Marçon, F. Cyclodextrin Complexation as a Way of Increasing the Aqueous Solubility and Stability of Carvedilol. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1746. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111746>

Academic Editors: Fabrizio Caldera, José Manuel López Nicolás, Francesco Trotta and Adrián Matencio

Received: 23 September 2021  
Accepted: 15 October 2021  
Published: 20 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** We studied the effect of several CDs on carvedilol's solubility and chemical stability in various aqueous media. Our present results show that it is possible to achieve a carvedilol concentration of 5 mg/mL (12.3 mM) in the presence of 5 eq of  $\gamma$ CD or RAMEB in an aqueous medium with an acceptable acid pH (between 3.5 and 4.7). Carvedilol formed 1:1 inclusion complexes but those with RAMEB appear to be stronger ( $K = 317 \text{ M}^{-1}$  at 298 K) than that with  $\gamma$ CD ( $K = 225 \text{ M}^{-1}$  at 298 K). The complexation of carvedilol by RAMEB significantly increased the drug's photochemical stability in aqueous solution. These results might constitute a first step towards the development of a novel oral formulation of carvedilol.

**Keywords:** carvedilol; cyclodextrins; pharmaceutical solutions; NMR; ITC

## 1. Introduction

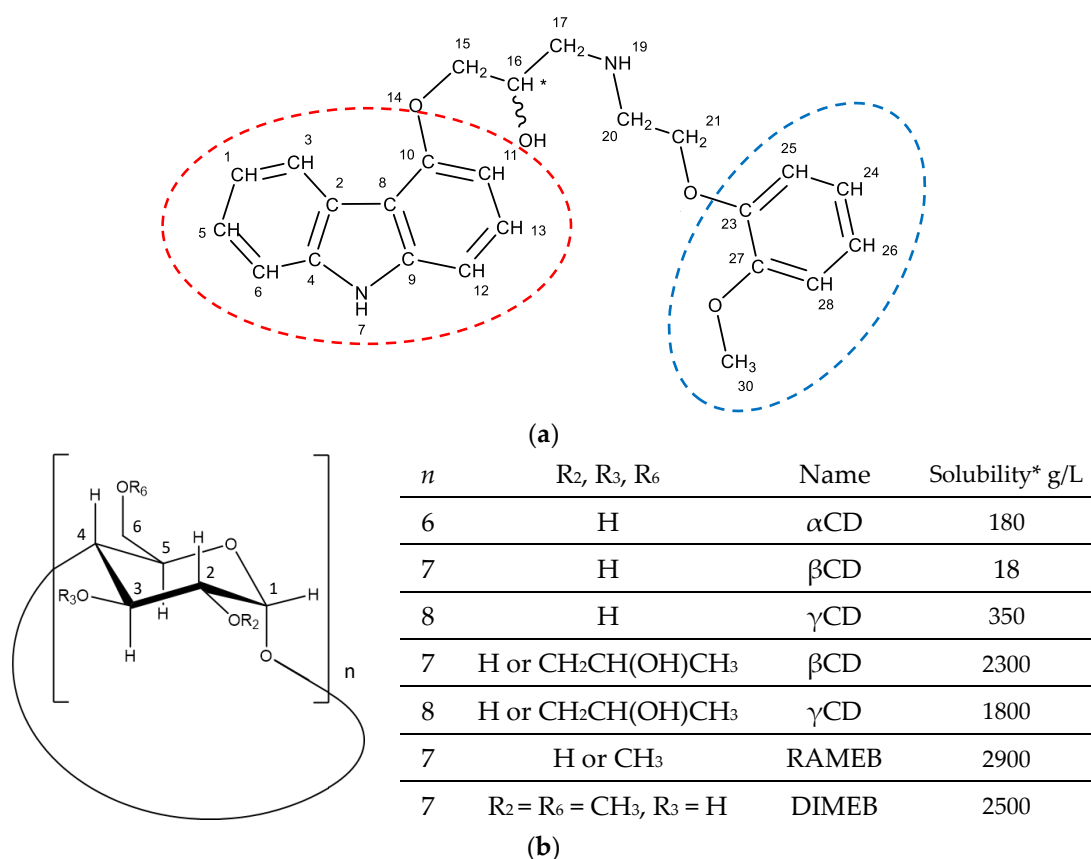
Carvedilol (Scheme 1a) is a nonselective  $\alpha$  and  $\beta$  adrenoceptor antagonist indicated for the treatment of heart failure in children [1]. The European Medicine Agency added carvedilol to the list of pediatric therapeutic needs for cardiology since an age-appropriate pharmaceutical form was not available for children [2]. The maintenance dose typically used is around 0.5 mg/kg/d, although dose-finding studies in children have yet to be performed [1].

From a pharmaceutical point of view, carvedilol is a racemic compound with low aqueous solubility (ranging from 0.01 to 1 mg/mL depending on the pH) [3]. It is part of class II in the Biopharmaceutics Classification System [4]. Carvedilol's bioavailability is low-around 24% in adults-and is further reduced by the compound's low solubility in intestinal tract fluids when given orally. Hence, formulating an oral solution of carvedilol might be a valuable way of addressing the lack of age-appropriateness drugs and enhancing the compound's low bioavailability. Given the recommended maintenance dose and the usual acceptable volume for oral administration route in children, the carvedilol solution's target concentration should be around 5 mg/mL (12.3 mM) [5].

Many attempts to overcome low aqueous drug solubility have been made [6–8]; these notably include the formation of inclusion complexes between cyclodextrins (CDs) and hydrophobic drug compounds [9–11]. Inclusion complexes between carvedilol and several CDs have already been reported [12], and some studies have described the preparation of complexes by physical mixing, kneading and co-precipitation [13–15]. Other attempts



to improve carvedilol's solubility involved the formation of ternary complexes using citric [16] and tartaric acid [14] or used a mixture of solvents such as H<sub>2</sub>O/ethanol before evaporation [12]. In water, under uncontrolled pH, carvedilol's solubility is 57.7  $\mu$ M and 62.9  $\mu$ M in the presence of 2.5 mM hydroxypropyl- $\beta$ CD (HP $\beta$ CD) and 2.5 mM  $\beta$ CD, respectively [12,17]. It should be noted that the formation of a ternary complex between carvedilol,  $\beta$ CD and citric acid increases the drug's solubility to 120  $\mu$ M, i.e., by a factor of around 110 [16].



**Scheme 1.** Numbered chemical structures of (a) carvedilol (carbazole and methoxyphenyl groups are highlighted by red and blue circles, respectively) and (b) the CDs used in the present study. \* Solubility in water at 24 °C.

Lastly, at an acidic pH, carvedilol is a lipophilic cation with amphiphilic character and thus self-aggregation properties. Salt formation is the most common method of increasing the intrinsic solubility of an ionic drug. Furthermore, drug solubilization in aqueous media can be optimized by CDs complexation of the drug salt, as already demonstrated by Loftsson et al. [18]. It has been shown that carvedilol is 400 times less soluble as a hydrochloride than as an acetate. More surprisingly, carvedilol's solubility is highest (6.91 mg/mL) in an unbuffered acetic acid solution (1% *v/v*). In the latter medium,  $\beta$ CD showed the greatest solubilizing effect, followed by  $\gamma$ CD. Furthermore, the complexation efficiency of  $\beta$ CD is lower than that of its hydroxypropyl and sulfobutylether derivatives. Similarly, carvedilol's solubility in tartrate buffer was reportedly 1.89 mg/mL in the presence of 690 mg of HP $\beta$ CD [14].

Hence, we sought to study the effect of the CDs shown in Scheme 1b on carvedilol's aqueous solubility and chemical stability, in order to develop liquid oral dosage forms for children. Our objective was to prepare and characterize inclusion complexes of carvedilol with CDs in suitable aqueous media, while bearing in mind the 5 mg/mL (12.3 mM) target concentration for an oral formulation in the presence of less than 5 equivalents of CD (61.5 mM) to prevent a decrease of the bioavailability. To achieve this, we analyzed the

influence of CDs on the solubility of carvedilol in various aqueous media. Next, the best inclusion complexes in the most appropriate aqueous media were characterized using NMR and isothermal calorimetry (ITC). Lastly, carvedilol's photochemical stability at the target concentration in the presence or absence of CDs was investigated under the standardized conditions described in the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) grade carvedilol (molecular mass = 406.5 g/mol) was purchased from INRESA (Barthelemy, France). The following CDs were supplied by Wacker Chemie AG (Munich, Germany):  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ CD, Cavamax W6 Pharma),  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD, Cavamax W7 Pharma),  $\gamma$ -cyclodextrin ( $\gamma$ CD, Cavamax W8 Pharma), randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin (RAMEB, Cavasol W7 M; degree of substitution (DS) = 1.6–1.9) and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD, Cavasol W7 HP, DS = 0.6–0.9). Hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin (HP $\gamma$ CD, DS = 0.6), sodium acetate, acetic acid, trisodium citrate dihydrate, citric acid monohydrate, and 1 M hydrochloric acid were purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Per-2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -CD (DIMEB) was synthesized as described previously [19], and its measured properties were in line with the literature data. Deuterated water was purchased from Sigma-Aldrich. The water used was MilliQ grade. All solvents used were analytical grade.

### 2.2. Ultra High Performance Liquid Chromatography

Ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) was performed on an ACQUITY UPLC H-Class system coupled to an ACQUITY TUV detector (Waters, Manchester, UK) set to carvedilol's  $\lambda_{\max}$  = 240 nm. For solubility studies, we used a previously described UHPLC method on a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) column maintained at 60 °C (333 K) [20]. The 9-point calibration curve (generated in triplicate) had an  $r^2$  greater than 99% (Figure S1).

The stability analysis was based on a slightly modified Ph. Eur. method, using a Phenomenex Kinetex LC C8 (150 × 4.6 mm, 2.6  $\mu$ m) column maintained at 55 °C (328 K). To check for possible deviation in detection, new calibration curves were generated and analyzed twice during each sample run.

### 2.3. Solubility Studies

To evaluate the influence of CDs in various aqueous media, we prepared 10 mM solutions of  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, HP $\gamma$ CD or RAMEB in pure water (with a pH close to 7), aqueous 0.1 M citrate buffer or acetate buffer (pH 4.7) and hydrochloric acid (13 mM, pH ~3.5). An excess amount of carvedilol (10 mg/mL) was added to 3 mL of medium. The obtained suspension was capped, stirred for 3 days at room temperature (296 ± 2 K), and then filtered through a polyvinylidene fluoride filter (pore size: 0.2  $\mu$ m; Acrodisc, Waters). After appropriate dilution, the carvedilol concentration was determined using a dedicated UHPLC method. Blanks were prepared with the same experimental procedure but in the absence of CD. Solutions were prepared in triplicate for each condition.

### 2.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analyses

All NMR experiments were performed on an AVANCE III 600 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) equipped with a Z-gradient unit (for pulsed-field gradient spectroscopy) and a triple resonance probe (TXI, 5-mm tube, maximum gradient strength value = 5.35 G/mm). Spectra were acquired at 298 K with close temperature control. D<sub>2</sub>O was used as the solvent, while the system's pulse automation program was used to optimize the duration of the 90° pulse. Residual signal of HOD protons was used as the reference for calibration. One-dimensional NMR spectra were recorded at a resolution of 0.2 Hz (64 K data points). <sup>1</sup>H spectra of acetate buffer samples were obtained with the Bruker sequence zg30, and <sup>1</sup>H spectra of HCl samples were obtained by using the

Bruker sequence zgcprr to delete the water signal from the added HCl. Two-dimensional (2D) DOSY  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed using the Bruker sequence ledbpgp2s with the gradient pulse duration ( $\delta/2$ ) and the diffusion time ( $\Delta$ ) set to 1.9 ms and 50 ms, respectively. The strength of the pulsed-field gradient was increased linearly from 2% to 98% in 16 steps. The probe's gradient calibration was based on the water signal from a 90:10  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  mixture; a gradient strength value of 4.9 G/mm was obtained for the water diffusion value  $D$  at  $2.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  at 298 K. The longitudinal eddy current delay and the spoil gradient delay were set to 5 ms and 0.6 ms, respectively. Spectral data were processed with the TopSpin dosy2d software module (V4.0.7, Bruker). 2D ROESY  $^1\text{H}$  NMR experiments were carried out using the phase-sensitive roesyph.2 sequence; the mixing time was set to 800 ms, with resolutions of 2.6 Hz and 21.1 Hz for F2 and F1, respectively. COSY and HSQC experiments were carried out using standard sequences of Bruker library.

### 2.5. Aggregation Studies

To study carvedilol aggregation in acetate buffer, samples were prepared at high concentration (5 mM) by heating at 313 K overnight with stirring, leading to clear stock solution. We analyzed by NMR five carvedilol concentrations (from 0.5 mM to 5 mM) in 0.1 M acetate buffered  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{pH} = \text{pK}_a = 4.7$ ). The lower concentrations were obtained by diluting the 5 mM stock solution in the same buffer.

### 2.6. Complex Stoichiometry

The stoichiometry of carvedilol's inclusion complexes with  $\beta\text{CD}$ ,  $\gamma\text{CD}$  and DIMEB were investigated by applying Job's method (the "method of continuous variation") to  $^1\text{H}$  NMR analysis [9,21]. Eleven samples were prepared, with linear variations of the molar ratio of both components ranging from 0 to 1. Job plots with  $\beta\text{CD}$  and  $\gamma\text{CD}$  were obtained with solutions in 0.1 M acetate buffer ( $\text{pH} = \text{pK}_a = 4.7$ ), and the total concentration ((carvedilol) + (CD)) was kept constant at 3.65 mM. Note that with DIMEB, the solutions were prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  with 13 mM HCl ( $\text{pH} \sim 3.5$ ) and the total concentration ((carvedilol) + (DIMEB)) was kept constant at 2 mM. The complexes' stoichiometry was determined from the chemical shifts of protons located in the CD cavity.

### 2.7. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) Studies

Thermodynamic parameters (the formation constant  $K$ , the inclusion enthalpy  $\Delta H^\circ$ , the entropy  $\Delta S^\circ$ , the Gibbs free energy  $\Delta G^\circ$  and the heat capacity  $\Delta C_p^\circ$ ) were determined for carvedilol/ $\gamma\text{CD}$  and carvedilol/RAMEB systems using an isothermal calorimeter (MicroCal iTC200, Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK). Carvedilol and CDs solutions were prepared in degassed acetate buffer adjusted to  $\text{pH} = \text{pK}_a = 4.7$ . Each system was characterized in three distinct experiments, made at three temperatures (288, 298 and 308 K). The first experiment (titration: protocol A) was performed by filling the cell ( $V_0 = 202.8 \mu\text{L}$ ) with a 0.5 mM carvedilol solution and filling the syringe with a 5 mM CD solution. The second experiment (release: protocol B) was performed by filling the cell with a buffer solution and filling the syringe with a 1 mM carvedilol + 5 mM CD solution. The third experiment (protocol C) was performed by filling the cell with a 0.5 mM carvedilol solution and filling the syringe with a 1 mM carvedilol + 5 mM CD solution. Blank experiments were carried out under the same experimental conditions by injecting individual species into buffers, buffers into species, or buffers into buffer; this yielded the heat of dilution, which was subtracted from the values in the interaction experiments. For all experiments, and after the addition of an initial aliquot of  $1 \mu\text{L}$ , 10 aliquots of  $3.5 \mu\text{L}$  of the syringe solution were delivered over 7 s for each injection. The time interval between two consecutive injections was set to 70 s, which proved to be sufficient for a systematic and complete return to baseline. The stirring speed was set to 1000 rpm. The resulting heat flow was recorded as a function of time. The peak area following each injection was obtained by integration of the resulting signal and was expressed as the heat effect per injection. The binding parameters ( $K$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$  and  $\Delta C_p^\circ$ ) were determined for a 1:1

stoichiometry, by means of a dedicated treatment [22], involving a global analysis of all the binding isotherms obtained for a given system.

### 2.8. Mass Spectrometry Studies

Mass spectrometry analyses were performed on a Synapt-G2-Si (Waters, Manchester, UK) equipped with an ESI probe. Solutions were directly infused with a syringe pump and analyzed in positive ion mode with capillary voltage set at 2 kV, source temperature at 100 °C and sampling cone at 20 V. Each solution was prepared at 1:1 molar ratio of carvedilol:CD in acetate buffer with (carvedilol) = 8  $\mu$ M.

### 2.9. UV Studies

UV-visible analyses were realized with a Shimadzu UV 2600 (Shimadzu, Duisbourg, Germany) at 200–800 nm range, in water with 13 mM HCl. Stock solution of carvedilol were prepared at 1 mM and those of  $\gamma$ CD and RAMEB at 10 mM. Samples were prepared by adding 1 mL of the medium or CDs solution in 1 mL of carvedilol solution to keep constant the carvedilol's concentration in the presence or absence of CDs. Solutions were diluted by a factor 10 in the same medium before analyses to avoid the detector saturation, final concentration of carvedilol was 0.05 mM and that of CDs 0.5 mM leading to 1:10 molar ratio of carvedilol:CD.

### 2.10. Photostability Study

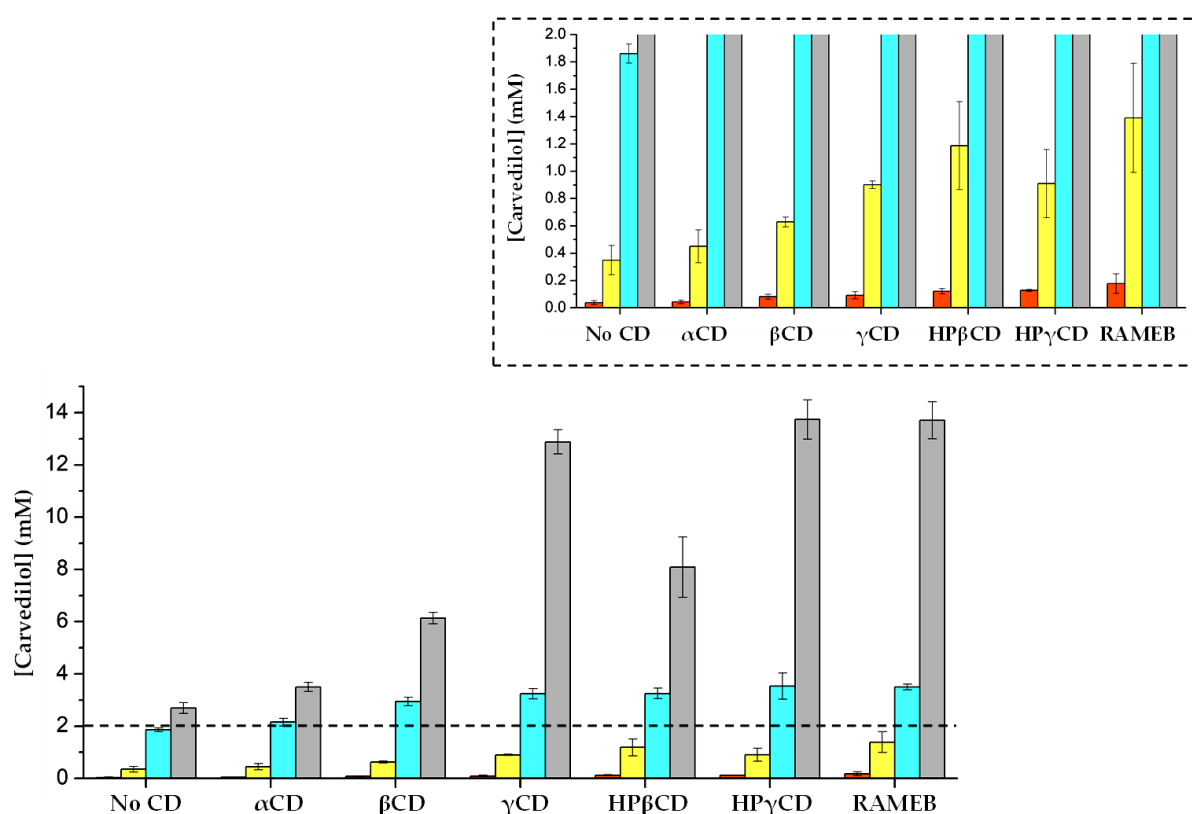
A six-month photostability study was performed in accordance with the ICH Q1A and Q1B guidelines on environmental conditions and light exposure. We measured the photostability of aqueous carvedilol solutions containing  $\gamma$ CD or RAMEB at a (CD)/(carvedilol) ratio of 5, relative to that of a control solution. Carvedilol stock solutions (5 mg/mL, 12.3 mM) with  $\gamma$ CD ( $n = 15$ ) or RAMEB ( $n = 15$ ) were prepared in water with 13 mM HCl (pH  $\sim$ 3.5). The control 5 mg/mL aqueous carvedilol stock solution ( $n = 15$ ) in the absence of CDs was prepared in H<sub>2</sub>O/acetonitrile (50:50), with a final HCl concentration of 13 mM. Acetonitrile was chosen because it generates fewer degradation products than other organic solvents like ethanol or methanol.

All stock solutions were prepared in volumetric flasks and filtered under aseptic conditions through sterile 0.2  $\mu$ m polyethersulphone filters (PharmAssure, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) into sterile vials. All the vials were then sealed to avoid bacterial contamination and evaporation. Samples were stored in climatic chambers (KBF P240, Binder, Tuttlingen, Germany) and exposed to visible light (7500 lux) and ultraviolet A light (1.1 W/m<sup>2</sup>) at 298 K and 60% relative humidity. The carvedilol concentrations in  $n = 3$  vials per solution were measured initially (T<sub>0</sub>) and 1, 2, 3 and 6 months later. The results were expressed as the amount of carvedilol relative to T<sub>0</sub>. The first-order degradation kinetics were modelled and compared using R software (version 4.0.2) [23].

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Solubility Studies

Carvedilol alone is much more soluble at acidic pHs (between 3 and 4.7) than at neutral pH, since it can form the water-soluble salts mentioned above (Figure 1 and Table 1) [18]. Under our experimental conditions, carvedilol was respectively 9, 48 and 70 times more soluble in citrate ((carvedilol) = 0.35 mM), hydrochloride (1.86 mM) and acetate solutions (2.69 mM) than in water at pH  $\sim$ 7 (0.04 mM). Moreover, the carvedilol concentrations were 10 times lower in citrate buffer than in acetate buffer-suggesting that citrate reduces carvedilol's solubility at the same pH value. It should be noted that the target carvedilol concentration (12.3 mM) could not be reached in acetate buffer alone at this pH.



**Figure 1.** Carvedilol's solubility in various media at room temperature and in the presence or absence of 10 mM CDs: pure water (■), 0.1 M citrate buffer (pH = pKa<sub>2</sub> = 4.7) (■), 13 mM HCl (pH ~3.5) (■), 0.1 M acetate buffer (pH = pKa = 4.7) (■). The rescaled Y axis from (carvedilol) = 0 mM to 2 mM has been included, to show the compound's solubility in pure water.

**Table 1.** Carvedilol's solubility (S, mM) and its enhancement (R ratio) by CDs (10 mM) relative to carvedilol alone in the same medium.

	Pure Water		0.1 M Acetate Buffer		0.1 M Citrate Buffer		13 mM HCl	
	S (mM)	R	S (mM)	R	S (mM)	R	S (mM)	R
No CD	0.039	-	2.694	-	0.350	-	1.861	-
αCD	0.044	1.14	3.501	1.30	0.450	1.29	2.157	1.16
βCD	0.081	2.10	6.133	2.28	0.629	1.80	2.946	1.58
γCD	0.092	2.38	12.881	4.78	0.901	2.58	3.242	1.74
HPβCD	0.122	3.14	8.082	3.00	1.188	3.40	3.252	1.75
HPγCD	0.128	3.30	13.734	5.10	0.910	2.60	3.527	1.89
RAMEB	0.177	4.58	13.708	5.09	1.390	3.98	3.502	1.88

To evaluate the influence of CDs in various aqueous media, 10 mM of each CD was dissolved in pure water, aqueous 0.1 M citrate buffer or acetate buffer (pH 4.7), or hydrochloric acid (13 mM, pH ~3.5). To investigate the CDs' ability to increase the solubility of carvedilol in various media, we calculated the R ratio:

$$R = (\text{carvedilol})_{10 \text{ mM CD}} / (\text{carvedilol})_{\text{No CD}} \quad (1)$$

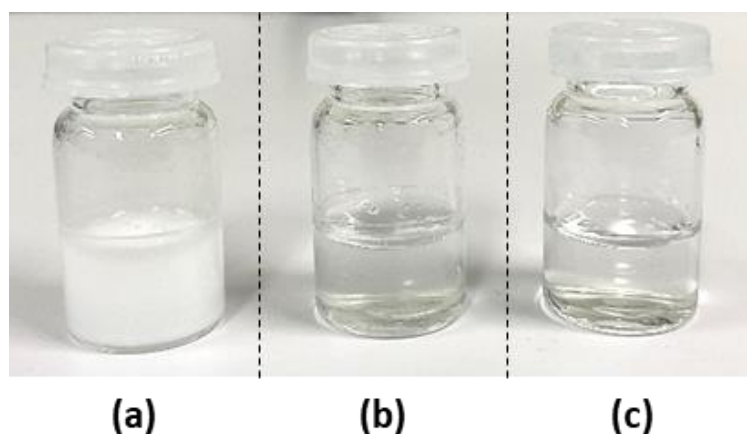
where  $(\text{carvedilol})_{10 \text{ mM CD}}$  was the concentration of carvedilol dissolved in the presence of 10 mM CD, and  $(\text{carvedilol})_{\text{No CD}}$  was the concentration of carvedilol dissolved in the

absence of the CD. The addition of  $\alpha$ CD did not significantly change the dissolution of carvedilol in any of the media, as illustrated by the R values close to 1 (Table 1).

Carvedilol's solubility in all the studied media was greater in the presence of  $\beta$ CD and  $\gamma$ CD derivatives in general and RAMEB,  $\gamma$ CD and HP $\gamma$ CD in particular. It should be noted that  $\gamma$ CD and HP $\gamma$ CD were only less effective than  $\beta$ CD derivatives in citrate buffer. The greatest R ratios were obtained in acetate buffer, with values of between 4.78 and 5.10 (reaching the target of 12.3 mM) in the presence of 10 mM  $\gamma$ CD, HP $\gamma$ CD and RAMEB. These findings are in line with literature reports on the greater impact of acetic acid on carvedilol solubilization by HP $\beta$ CD, relative to phosphoric acid at pH 3.7 [18].

Likewise, a positive impact of citric acid on carvedilol solubilization by 2 mM  $\beta$ CD has been reported previously, however, this impact decreased at citric acid concentrations above 2 mM and the pH was not described [16]. Our study used a higher citric acid concentration and a known pH, and our results suggested that citric acid increases the solubilization of carvedilol by CDs—even though a carvedilol concentration of 12.3 mM was not achieved with any of the CDs tested here. This might be due to the formation of a ternary complex, as reported with hydroxy acids [24].

Lastly, we found that HCl increased the solubilization of carvedilol less than acetate but more than citrate. To reach the target carvedilol concentration (12.3 mM),  $\gamma$ CD was selected due to its European pharmacopeia presence and RAMEB for its better solubilizing effect. Then, 12.3 mM Carvedilol was added in 13 mM HCl aqueous solution containing 61.5 mM (5 eq) CD, leading to clear solutions for both CDs at pH  $\sim$ 3.5 as displayed on Figure 2.



**Figure 2.** Carvedilol (12.3 mM) in 13 mM HCl solution (a) in absence of CDs or in presence of 61.5 mM (b)  $\gamma$ CD or (c) RAMEB, after 24 h of stirring at room temperature ( $296 \pm 2$  K).

Several variables must be considered when developing an oral solution. Firstly, the CD concentration should be kept within an acceptable range, so as not to reduce the bioavailability [25]. The buffered pH should also be within a suitable range; for example, most fruits and fruit juices have a pH of between 3 and 4, which seems appropriate for drug formulation [26]. Although acetic acid is nauseating and should not be used to compound pediatric oral solutions, it enabled us to perform physicochemical studies (such as ITC and NMR) under buffered conditions. It should be noted that the  $^1\text{H}$  NMR spectra of carvedilol in acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  were very similar to those in  $\text{D}_2\text{O}$  with HCl pH adjustment (Figure S2). The same was true in the presence of CDs (Figure S3).

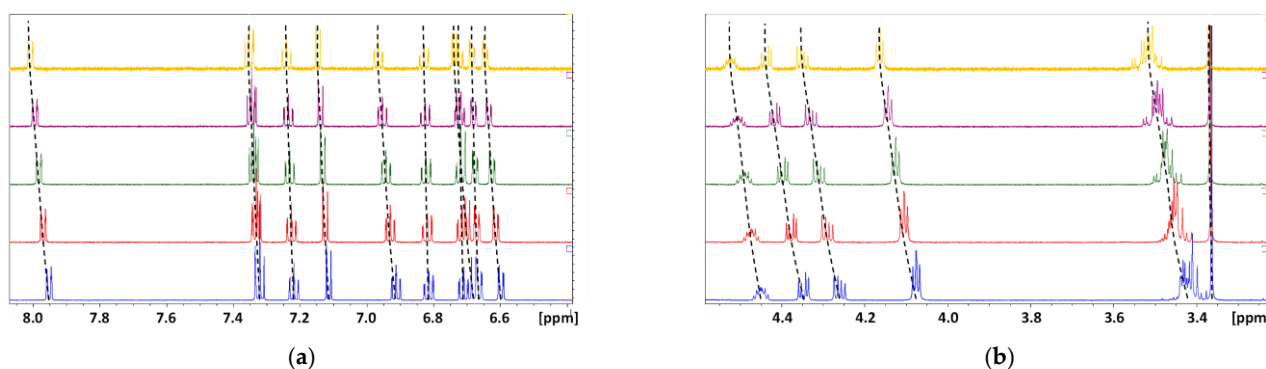
Therefore, we selected acetate and hydrochloride solutions for further investigation with the two most effective CDs at this stage:  $\gamma$ CD and RAMEB. On the basis of our preliminary results, the NMR studies were carried out in both media, the ITC studies were carried out in acetate buffer only, and the photostability studies were carried out in hydrochloride solution (in order to be as close as possible to a potential formulation).



### 3.2. Aggregation Studies

We first characterized 5 mM carvedilol in 0.1 M acetate-buffered D<sub>2</sub>O, using conventional 2D NMR (COSY and phase-sensitive HSQC). The spectral features of the aliphatic moiety were similar to those reported in the literature [3]. The chemical shifts of signals from the non-equivalent protons H20a and H20b (and H21a and H21b) were similar in our assignment. In contrast, Beatie et al. recorded the spectrum in deuterated methanol with a 400 MHz spectrometer and reported a non-equivalent H20a near H21a and an inequivalent H20b near H21b. This disparity might be due to differences in the deuterated solvent and the spectrometer resolution. The <sup>1</sup>H and COSY spectra are provided as Supplementary Materials (Figures S4 and S5, respectively).

As mentioned above, carvedilol is an amphiphilic compound at acidic pH. Its potential self-aggregation properties should be investigated before carvedilol/CD interactions are studied. More precisely, the threshold concentration for carvedilol self-aggregation (i.e., above which the solution is no longer homogeneous) should be estimated before ITC is performed. Self-association phenomenon is a concentration-dependent process that competes with the formation of inclusion complexes; this potentially leads to discrepancies and misinterpretations of the ITC and NMR data [10]. As shown in Figure 3, self-association of carvedilol in aqueous solution was evidenced by changes in the NMR spectra over the concentration range from 0.5 to 5 mM. As is observed for many polyaromatic compounds, carvedilol can form dimers by  $\pi$ -stacking—as suggested by the observed downshift in the aromatic proton signals. It should be noted that aliphatic proton chemical shift values were also concentration-dependent, which implies a change in the drug's three-dimensional (3D) structure. Based on these results, the ITC study was carried out with a 0.5 mM carvedilol solution and only CD proton signals were considered in the <sup>1</sup>H NMR titration experiments (i.e., the Job plot).

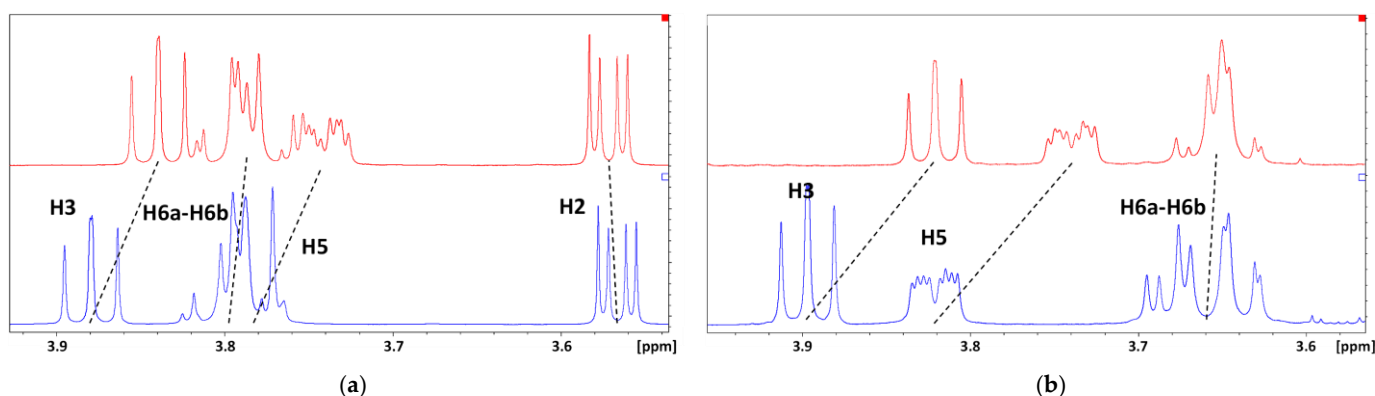


**Figure 3.** Stacking of partial <sup>1</sup>H NMR spectra (600 MHz, 298 K) obtained from carvedilol solutions (0.1 M acetate-buffered D<sub>2</sub>O) at a concentration of 5 mM (—), 3.5 mM (—), 2.5 mM (—), 1.5 mM (—) and 0.5 mM (—); (a) the aromatic moieties; (b) the aliphatic moiety.

### 3.3. Complexation Studies

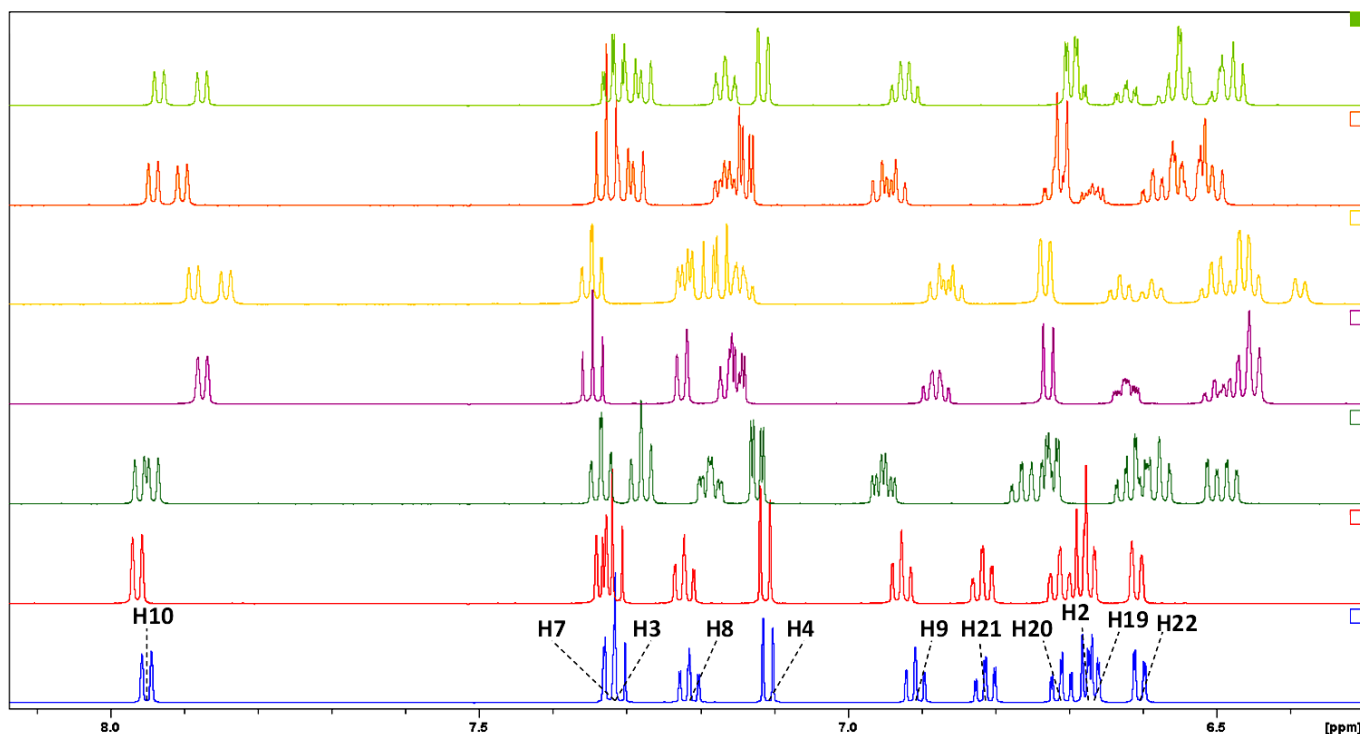
#### 3.3.1. NMR Studies

To confirm the formation of inclusion complexes between CDs ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, HP $\gamma$ CD and DIMEB (a homogeneous RAMEB model for NMR)) and carvedilol, <sup>1</sup>H NMR experiments were first carried out in acetate or hydrochloride solutions (Figure 4). We compared the CDs' <sup>1</sup>H NMR spectra in the presence and absence of equimolar carvedilol, in order to highlight the chemical shift variations mainly of the H3 and H5 protons located inside the CD's cavity. The addition of carvedilol to CDs shifted the signal upfield for all the protons in the CD and especially for H3, H5 and H6—revealing the formation of inclusion complexes between carvedilol and all the CDs. It should be noted that the largest chemical shift variations were observed for  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD and DIMEB. The noticeable shielding for H3, H5 and H6 suggested a strong interaction with carvedilol.



**Figure 4.** Stacking of partial  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, 298 K) spectra of (a) 3 mM  $\beta\text{CD}$  (0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$ ) and (b) 2 mM DIMEB (13 mM HCl in  $\text{D}_2\text{O}$ ) in the absence (—) or presence of an equimolar concentration of carvedilol (—).

Similarly, we studied the influence of CDs on the  $^1\text{H}$  NMR spectra of carvedilol solutions in acetate buffer (Figure 5). At equal concentrations, significant differences between the spectra were observed. The magnitude of these differences depended on the CD used. In line with the solubility results, the low-affinity  $\alpha\text{CD}$  had a negligible effect on the carvedilol signals. Chemical shift variations were observed with all other CDs considered and especially with  $\gamma\text{CD}$ ,  $\text{HP}\beta\text{CD}$ ,  $\text{HP}\gamma\text{CD}$  and DIMEB. These results were in full agreement with the corresponding R ratios (4.78, 3.0, 5.1 and 5.09 for  $\gamma\text{CD}$ ,  $\text{HP}\beta\text{CD}$ ,  $\text{HP}\gamma\text{CD}$  and DIMEB, respectively) and confirmed that the increase in solubility in the presence of CDs was due to the formation of an inclusion complex.

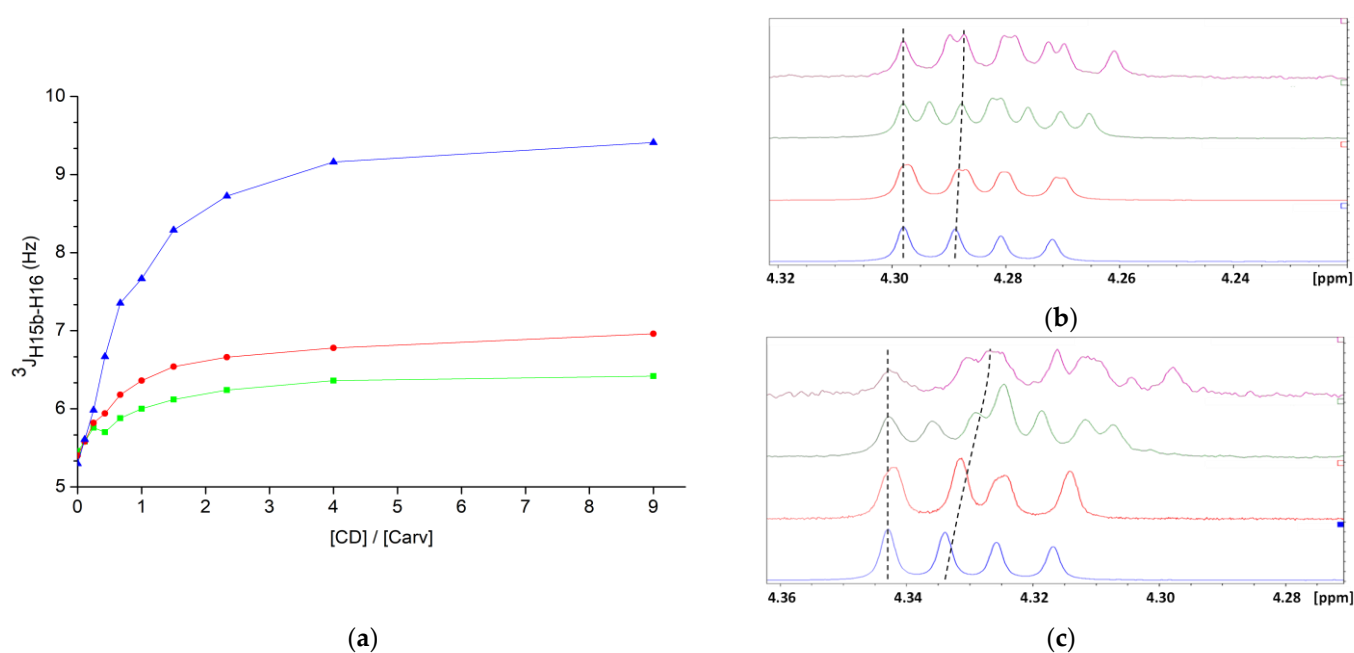


**Figure 5.** Partial  $^1\text{H}$  NMR spectra (600 MHz, 298 K, 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  (pH = pKa = 4.7)) of the aromatic moieties of carvedilol (5 mM) in the absence of CDs (—) or in the presence of an equimolar concentration of  $\alpha\text{CD}$  (—),  $\beta\text{CD}$  (—),  $\gamma\text{CD}$  (—),  $\text{HP}\beta\text{CD}$  (—),  $\text{HP}\gamma\text{CD}$  (—) or DIMEB (—).



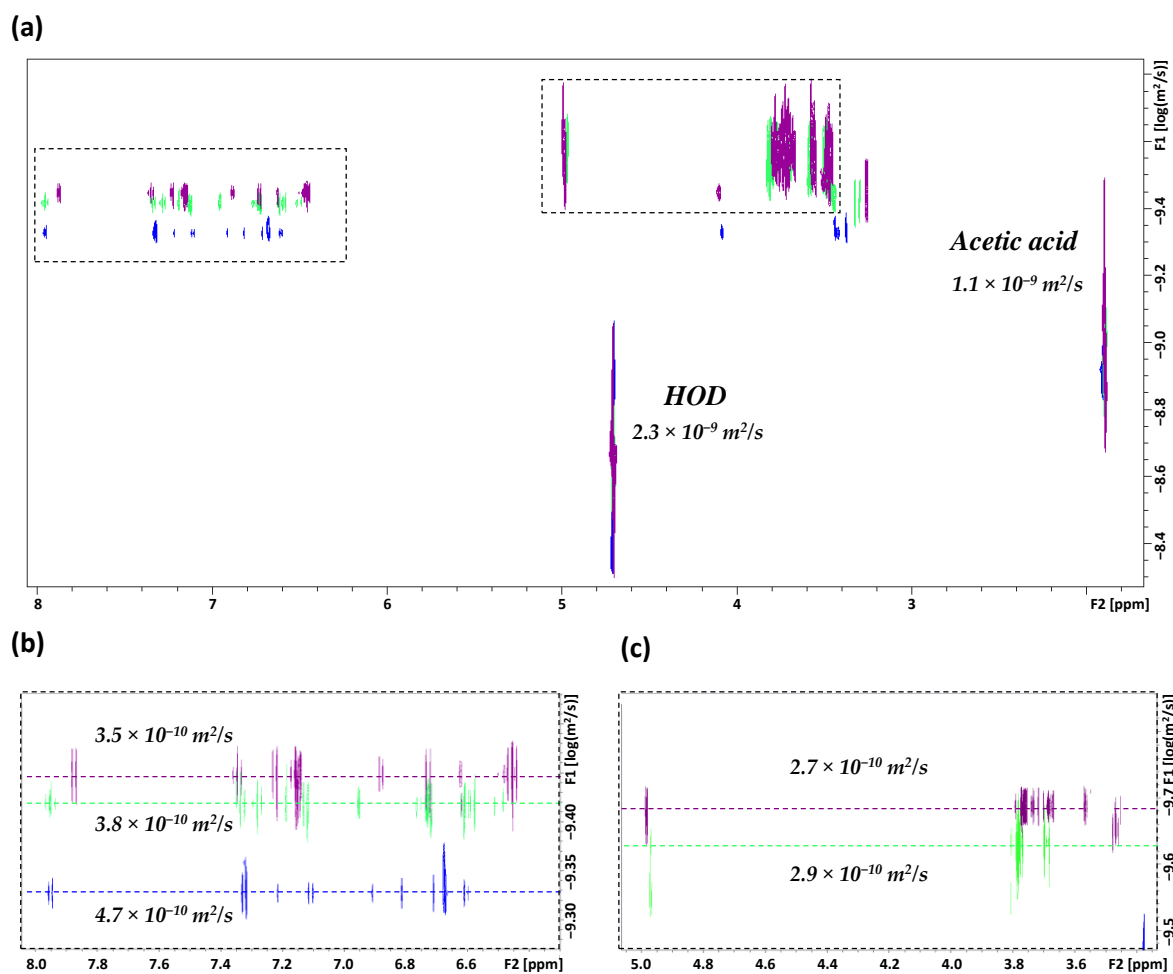
Decoupling of several carvedilol signals was noted in some spectra—particularly for the  $\beta$ CD derivatives. Given that we used racemic carvedilol [3], each enantiomer probably formed a specific inclusion complex with a distinct 3D structure and affinity—both of which influence the chemical shift. As the cavities of  $\beta$ CD derivatives are smaller than that of  $\gamma$ CD, chiral differentiation is likely to be more effective.

More surprisingly, the values of the vicinal coupling constant between carvedilol's H15b and H16 protons ( $^3J_{\text{H15b-H16}}$ ) increased with the CD concentration (Figure 6). The value of  $^3J_{\text{H15b-H16}}$  was 5.40 Hz in the absence of CD, 6.4 Hz with  $\beta$ CD, 6.9 Hz with  $\gamma$ CD and 9.4 Hz with DIMEB (Table S1). The 4 Hz variation with DIMEB implied the existence of a preferred conformation, with a greater dihedral angle probably due to the formation of a hydrogen bond between OH16 on carvedilol and one of the free OH3 on DIMEB.



**Figure 6.** (a) Variation of the  $^3J_{\text{H15b, H16}}$  coupling constant in the presence of  $\beta$ CD (—■—) or  $\gamma$ CD (—●—) in 0.1 M acetate buffer or DIMEB (—▲—) in 13 mM HCl, at different molar fractions. (b) Stacking of partial  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, 298 K) spectra scaled on H15b of carvedilol, corresponding to experiments with  $\gamma$ CD and (c) with DIMEB at the following CD molar fractions: 0.0 (—), 0.3 (—), 0.6 (—), 0.9 (—). The gap between the dotted lines corresponds to the  $^3J_{\text{H15b-H16}}$ .

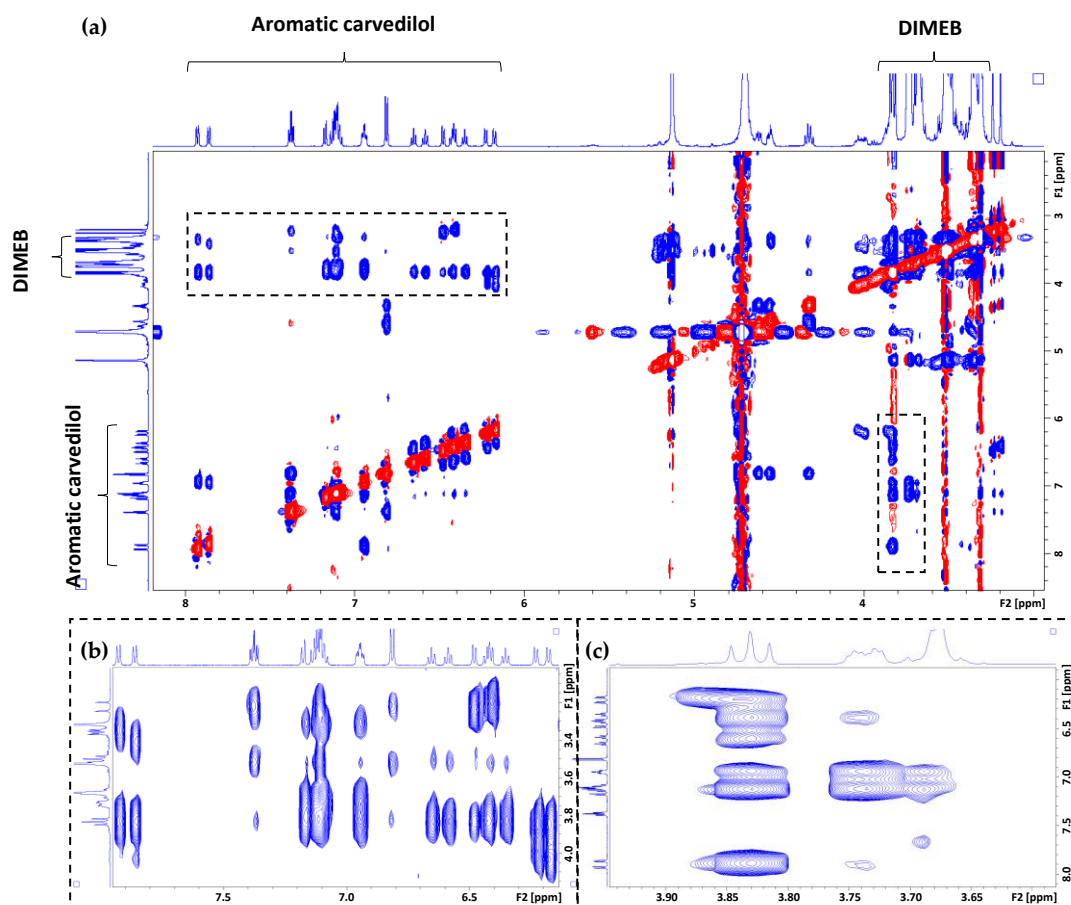
The differences in the diffusion coefficient  $D$  in the DOSY NMR experiments confirmed the formation of an inclusion complex between the carvedilol guest and the CD [10].  $D$  is related to the translational motion of molecules in solution, and its value decreases as the object size increases.  $D$  was  $4.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  for carvedilol alone,  $3.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  in the presence of  $\beta$ CD (suggesting the formation of an inclusion complex) and  $3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  with the larger  $\gamma$ CD (Figure 7). These data are in line with those already reported for the moringine/ $\alpha$ CD [9], methyljasmonate/ $\beta$ CD and resveratrol/DIMEB complexes [10].



**Figure 7.** (a) Overlay of full range 2D DOSY experiments (600 MHz, 298 K) of carvedilol (5 mM) in the absence of CDs (■) or in the presence of an equimolar concentration of  $\beta$ CD (■) or  $\gamma$ CD (■), as measured in 0.1 M acetate-buffered  $D_2O$  ( $pH = pK_a = 4.7$ ); (b) the expanded aromatic moiety region of carvedilol; (c) the expanded region of CDs.

We next used ROESY experiments to characterize  $\beta$ CD/carvedilol,  $\gamma$ CD/carvedilol and DIMEB/carvedilol inclusion complexes in acetate or hydrochloride solutions. As shown in Figures 8, S6 and S7, the presence of cross-correlation peaks between aromatic protons in carvedilol and those in the CD cavity shows that an inclusion complex was formed in all cases.

The supramolecular host-guest interactions are described in more detail in Table 2. For  $\gamma$ CD, the protons involved were H3, H5 (as expected) and (to a lesser extent) H6, in agreement with a literature report of deeper inclusion in the broader CD [27]. It is noteworthy that (i) the protons in carvedilol's two aromatic parts interacted with the H3 and H5 protons in the three CDs but (ii) the protons in the aliphatic part in the middle of carvedilol did not interact; the only interaction featured H15b in carvedilol and H3 protons in the three CDs (Table S2). This suggested the existence of two different complexation sites: one involving the carbazole moiety and stabilized by a supramolecular hydrogen bond between the guest's OH16 and the host's OH3 and the other involving the methoxyphenyl moiety. In the absence of further studies, we cannot determine whether the complex has a stoichiometry of 2:1 or 1:1.



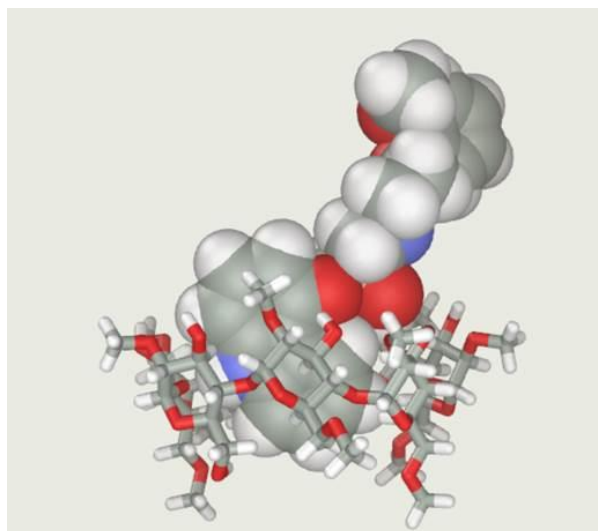
**Figure 8.** (a) A complete 2D ROESY NMR experiment (mixing time = 800 ms) with an equimolar mixture of carvedilol (2 mM) and DIMEB in 13 mM HCl in D<sub>2</sub>O, with an expanded region in the F2 dimension for (b) aromatic protons in carvedilol and (c) inner protons in DIMEB.

**Table 2.** Relative intensities of dipolar correlations between protons of carvedilol and CDs, as observed in 2D ROESY experiments.

		Carbazole					Methoxyphenyl					
		H1	H3	H5	H6	H11	H12	H13	H28	H26	H24	H25
$\beta$ CD	H3	++	+++	++	+++	-	++	+	++	++	++	++
	H5	+++	+	++	+++	-	-	-	-	+	+	-
$\gamma$ CD	H3	++	+++	+	+	+	+++	+	+++	++	+	ND
	H5	+++	++	++	++	-	ND	-	++	++	++	+++
DIMEB	H3	++	+++	++	++	+	++	+	++	++	+++	+++
	H5	+++	+	+++	++	-	-	-	+	+	+	-
	CH <sub>3</sub> (2)	+	-	-	-	++	++	++	-	+	+	-
	CH <sub>3</sub> (6)	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-

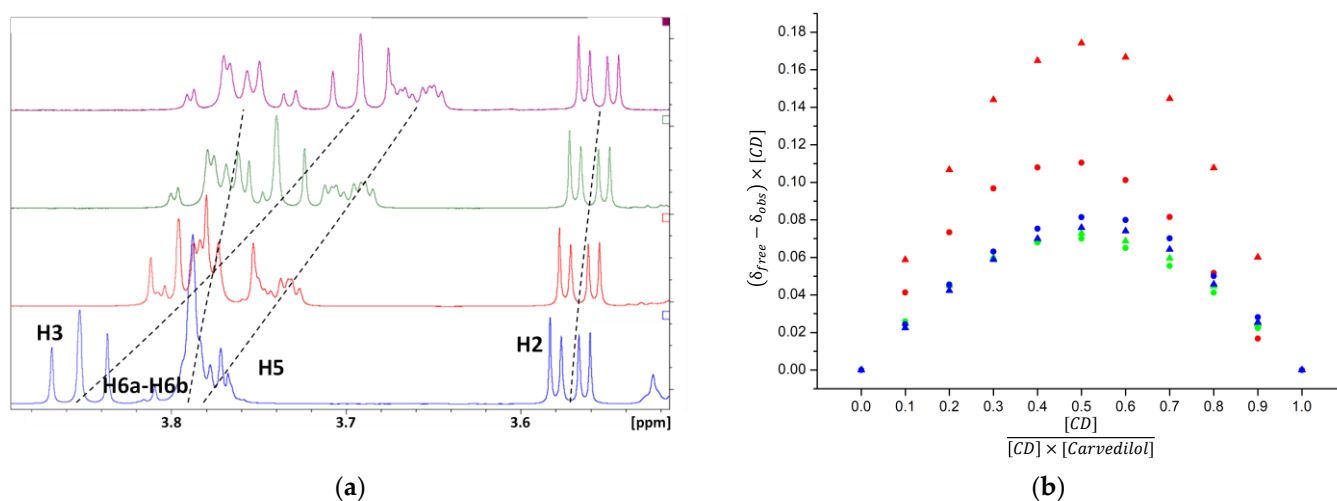
ND: not determined due to overlapping of the <sup>1</sup>H NMR signals. (-) no dipolar correlations were observed. (+), (++) and (+++) correspond respectively to low, medium and high intensity of observed dipolar correlation.

Lastly, strong interactions were observed between the OCH<sub>3</sub> of DIMEB and specific protons of the carbazole moiety. On the one hand, the primary OCH<sub>3</sub>, located on the narrower side of the CD, interacted with protons H1 and H6 and, on the other hand, OCH<sub>3</sub>, in position 2, located on the wider side of the CD, interacted with protons H11, H12 and H13. This last point is in agreement with a hydrogen bond between OH16 of carvedilol and one of the OH3 remaining free of DIMEB, as already discussed. An energy-minimized 3D structure of the carvedilol/DIMEB complex (in agreement with the NMR data) is illustrated in Figure 9.



**Figure 9.** Example of the carvedilol/DIMEB conformation, extracted from a molecular dynamics simulation (Hybrid LS and CD minimization after a 5 ns molecular dynamics simulation at 298 K; OPLS force field with implicit water; Abalone software).

We then used NMR to unambiguously determine the stoichiometry of CD/carvedilol complexes. As is common with CDs, rapid exchange was observed (Figures 10a and S8) and so the complex's stoichiometry could not be determined directly. Here, Job's method was based on <sup>1</sup>H NMR titration experiments [9,21]. The total concentration of the host (βCD, γCD or DIMEB) plus carvedilol was kept constant, and the *r* coefficient ranged from 0 to 1. We produced a Job plot of the observed Δδ·(CD) vs. *r* (Figure 10b). It should be noted that only CD proton signals were considered, since self-aggregation prevents the same approach with carvedilol proton signals. In all cases, the Job plots showed a maximum at *r* = 0.5 and a symmetrical shape—suggesting that the stoichiometry of the carvedilol complex with βCD, γCD and DIMEB is 1:1. The experiments were performed in acetate and hydrochloride solutions, with no noticeable differences between the two.

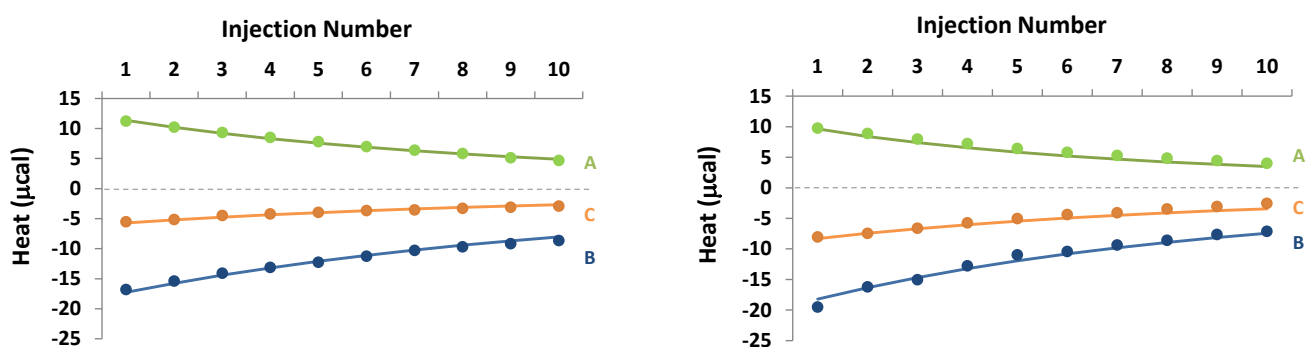


**Figure 10.** (a) Stacking of partial  $^1\text{H}$  NMR spectra, corresponding to a Job plot for carvedilol/ $\gamma\text{CD}$  in 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  at the following  $\gamma\text{CD}$  molar fractions: 1.0 (—), 0.7 (—), 0.4 (—), 0.1 (—). (b) A Job plot for a carvedilol/CD mixture obtained from  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, 298 K). Observation of protons located inside the CD's cavity: H3  $\beta\text{CD}$  ( $\blacktriangle$ ), H5  $\beta\text{CD}$  ( $\bullet$ ), H3  $\gamma\text{CD}$  ( $\blacktriangle$ ), H5  $\gamma\text{CD}$  ( $\bullet$ ), H3 DIMEB ( $\blacktriangle$ ), H5 DIMEB ( $\bullet$ ).

### 3.3.2. ITC Studies

In order to evaluate the thermodynamic parameters of carvedilol/CD complexes, we used ITC to investigate the interaction between carvedilol and  $\gamma\text{CD}$  or RAMEB in acetate buffer. As low wisdoman “c” parameters [28] were expected for titration of these systems, we decided to combine three different kinds of ITC protocols at three temperatures and thus obtain a sufficient degree of accuracy. A single set of thermodynamic parameters ( $K$ ,  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta C_p^\circ$ ) was employed for the simultaneous nonlinear regression analyses of the resulting isotherms (nine for each system). Such experimental approach, associating complementary experiments to global data treatment, is known to substantially reduce the degree of uncertainty for the evaluated variables [22].

Figure 11 shows the experimental and theoretical isotherms obtained for carvedilol/ $\gamma\text{CD}$  and carvedilol/RAMEB systems at 298 K. The isotherms obtained at 288 K and 308 K are presented in Figure S9 (corresponding thermograms are available in Figures S10–S12). The lower isotherm corresponds to the conventional titration experiment (protocol A), in which the injection of the CD solution into the carvedilol solution leads to complex formation and thus heat production (a negative signal) as a result of a negative inclusion enthalpy value. The upper isotherm corresponds to the release experiment (protocol B), in which the injection of a mixed carvedilol + CD solution into buffer leads to the dissociation of the corresponding complex and thus consuming heat (a positive signal). Lastly, the injection of a carvedilol + CD solution into a carvedilol solution constitutes the intermediate isotherm (protocol C, with signals closer to zero) because the free carvedilol concentrations in the cell and in the syringe are not dissimilar. Although this third experiment yields a weaker signal than the other two, it is mainly controlled by the inclusion constant (rather than the inclusion enthalpy) and is therefore an ideal complement to the titration and release experiments.



**Figure 11.** Experimental (dots) and theoretical (curves) ITC isotherms obtained for carvedilol/ $\gamma$ CD (left) and carvedilol/RAMEB (right) systems at 298 K in acetate buffer, according to protocol A (0.5 mM carvedilol in the cell and 5 mM CD in the syringe, —), B (buffer in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, —) and C (0.5 mM carvedilol in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, —).

The theoretical and experimental isotherms showed a high level of agreement—confirming that the 1:1 stoichiometry used in the data treatment correctly described the interaction of carvedilol with both  $\gamma$ CD and RAMEB. The corresponding thermodynamic parameters are described in Table 3.

**Table 3.** Thermodynamic parameters obtained by ITC for the carvedilol/ $\gamma$ CD and carvedilol/RAMEB systems.

	Temperature (K)	K ( $M^{-1}$ )	$\Delta H^\circ$ ( $kJ \cdot mol^{-1}$ )	$-T\Delta S^\circ$ ( $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ )	$\Delta G^\circ$ ( $kJ \cdot mol^{-1}$ )
carvedilol/ $\gamma$ CD	288	$296 \pm 39$	$-18.3 \pm 0.4$	$4.7 \pm 0.7$	$-13.6 \pm 0.3$
	298	$225 \pm 30$	$-21.4 \pm 0.5$	$8.4 \pm 0.9$	$-13.0 \pm 0.3$
	308	$166 \pm 22$	$-24.4 \pm 0.7$	$11.3 \pm 1.1$	$-13.1 \pm 0.3$
carvedilol/RAMEB	288	$408 \pm 60$	$-17.7 \pm 0.7$	$3.3 \pm 1.0$	$-14.4 \pm 0.4$
	298	$317 \pm 47$	$-18.0 \pm 0.8$	$3.7 \pm 1.2$	$-14.3 \pm 0.4$
	308	$250 \pm 37$	$-18.3 \pm 0.9$	$4.1 \pm 1.3$	$-14.1 \pm 0.4$

The formation of carvedilol/ $\gamma$ CD and carvedilol/RAMEB complexes was a spontaneous process, with negative values for  $\Delta G^\circ$ . The affinity was moderate (below  $500 M^{-1}$ , under our experimental conditions), as could be expected from the solubility studies. Even though the corresponding low wiseman “*c*” parameters, the degree of uncertainty was moderate and thus validated our experimental approach. Furthermore, both systems exhibit favorable inclusion enthalpy, which was partially compensated by an unfavorable inclusion entropy. This type of thermodynamic profile is often observed for CD inclusion compounds [29] and is generally attributed to the simultaneous contributions of hydrophobic forces and direct interactions between the host and the guest. Although the inclusion enthalpy and entropy at 288 K were very comparable in both systems, they tended to diverge with increasing temperature as a result of the difference in inclusion heat capacity ( $-304 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$  for  $\gamma$ CD and  $-25 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$  for RAMEB). This might indicate that the relative contributions of hydrophobic forces vs. interaction forces differ for these systems, with a stronger contribution from water reorganization [29] for  $\gamma$ CD.

It should be noted that some mass spectrometry and UV-Vis experiments were also carried out in addition to gain deeper information. It is well-known that ESI ionization is a soft ionization method used to investigate inclusion complexes stability [10]. With  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD, HP $\gamma$ CD and RAMEB, mass spectrometry experiments exhibited very low intensities of *m/z* corresponding to the complex compared to the *m/z* (carvedilol + H)<sup>+</sup> or (CD + Na)<sup>+</sup>. As illustration on Figure S13, the complex with RAMEB was more abundant

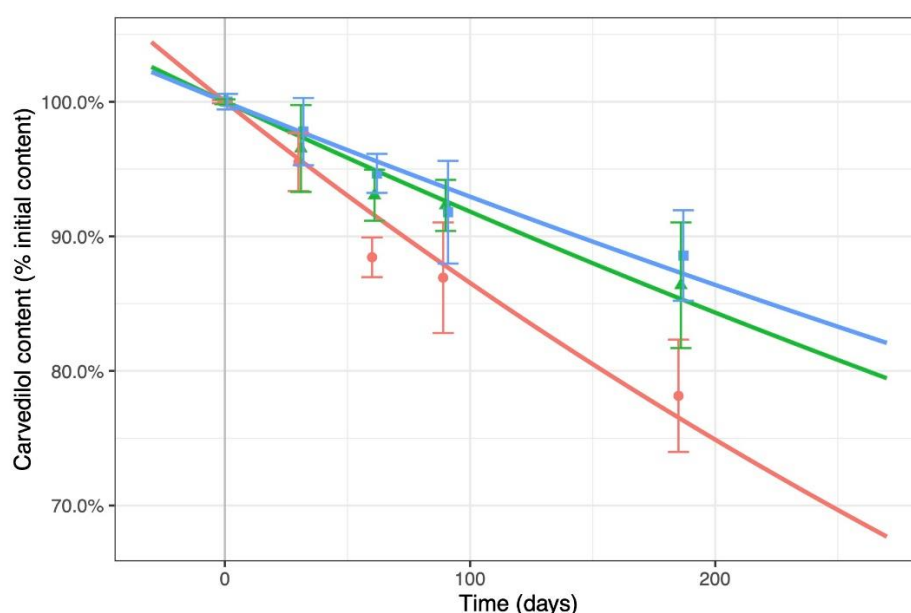
than that involving  $\gamma$ CD consistent with association constant values determined by ITC experiments.

In addition, UV spectra of carvedilol did not show any variation of  $\lambda$  in absence of CDs or in presence of 10 equivalents of  $\gamma$ CD or RAMEB in 13 mM HCl (Figure S14). Only small decrease of absorbance is observed at 240 nm in presence of large excess of RAMEB. These results are similar with those described by Savic-Gajic et al. [12].

### 3.4. Photostability Studies

The photochemical stability of 5 mg/mL (12.3 mM) carvedilol was investigated in the presence or absence of 5 eq of  $\gamma$ CD or RAMEB in aqueous HCl solution. In water, carvedilol is reported to be stable under neutral or acidic (HCl 1.0 N) conditions but sensible to basic (NaOH 1.0 N) or oxidative ( $\text{H}_2\text{O}_2$  7.5% *v/v*) conditions [30].

After six months in an ICH climatic chamber, the carvedilol content in acetonitrile,  $\gamma$ CD and RAMEB solutions had fallen by 21.8%, 13.6% and 11.4% (relative to T0) in acetonitrile,  $\gamma$ CD and RAMEB solutions, respectively (Figure 12).



**Figure 12.** Mean and standard deviation (dots) values and single values (crosses) for the relative carvedilol content measured during photostability studies at  $25 \pm 2$  °C in aqueous acidic solutions (13 mM HCl) with acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (control, —), 61.5 mM  $\gamma$ CD (—) or 61.5 mM RAMEB (—). The corresponding first-order kinetic model (solid line) is depicted on each plot. A small shift has been added to error bars to avoid their overlapping.

We found that CDs slowed the degradation of light-exposed vials of aqueous acidic carvedilol solutions. The first-order kinetic constants were  $144.6 \times 10^{-6} \text{ days}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ),  $85.2 \times 10^{-6} \text{ days}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ) and  $73.1 \times 10^{-6} \text{ days}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ) for acetonitrile,  $\gamma$ CD, RAMEB solutions, respectively).

It has been reported that CDs can protect drugs from photo-oxidation and that the hydroxyl substituents' electron-donating tendency may dampen this protective effect [12,31]. In contrast, it has been shown that the free hydroxyls of CDs can hydrolyze guest molecules in the cavity [32]. The results of our six-month ICH-standard study at the target concentration (5 mg/mL) supported these findings; RAMEB was more protective than  $\gamma$ CD, which in turn was more protective than an acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  mixture. Studies of the degradation mechanisms inhibited by CDs are now warranted and occurring.



#### 4. Conclusions

Our present results show that it is possible to achieve a carvedilol concentration of 5 mg/mL (12.3 mM) in the presence of 5 eq of  $\gamma$ CD or RAMEB in an aqueous medium with an acceptable acid pH (pH ~3.5). In both cases, carvedilol formed a 1:1 inclusion complex. The complex with RAMEB appears to be stronger ( $K = 317 \text{ M}^{-1}$  at 298 K) than that with  $\gamma$ CD ( $K = 225 \text{ M}^{-1}$  at 298 K). The complexation of carvedilol by RAMEB significantly increased the drug's photochemical stability in aqueous solution. These results might constitute a first step towards the development of a novel oral formulation of carvedilol.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13111746/s1>, Figure S1: Calibration curve obtained at 240 nm in UPLC–UV and used for carvedilol's quantification in solubility studies. Nine points were used, in triplicate, led to an  $r^2$  greater than 99 %; Figure S2: Comparison of carvedilol (1 mM)  $^1\text{H}$  NMR spectra (600 MHz, 298 K) recorded in 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  and  $\text{D}_2\text{O}$  with 13 mM HCl; Figure S3: Comparison of equimolar mixture of carvedilol (1 mM) and DIMEB  $^1\text{H}$  NMR spectra (600 MHz, 298 K), recorded in 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  and in  $\text{D}_2\text{O}$  with 13 mM HCl; Figure S4:  $^1\text{H}$  NMR spectrum (600 MHz, 298 K) of carvedilol (5 mM) in 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$ ; Figure S5: COSY experiments (600 MHz, 298 K) of carvedilol (5 mM) in 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$ ; Figure S6: A complete 2D ROESY NMR experiment (mixing time = 800 ms) with an equimolar mixture of carvedilol (2 mM) and  $\beta$ CD in 13 mM HCl in  $\text{D}_2\text{O}$ ; Figure S7: A complete 2D ROESY NMR experiment (mixing time = 800 ms) with an equimolar mixture of carvedilol (2 mM) and  $\gamma$ CD in 13 mM HCl in  $\text{D}_2\text{O}$ ; Figure S8: Stacking of partial  $^1\text{H}$  NMR spectra, corresponding to a Job plot for carvedilol/ $\beta$ CD (in 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$ ) and carvedilol/DIMEB (13 mM HCl in  $\text{D}_2\text{O}$ ) at different CD molar fractions; Figure S9: Experimental and theoretical ITC isotherms obtained for carvedilol/ $\gamma$ -CD and carvedilol/RAMEB systems at 288 K and 308 K in acetate buffer, according to protocol A (0.5 mM carvedilol in the cell and 5 mM CD in the syringe), B (buffer in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe) and C (0.5 mM carvedilol in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe); Figure S10: Experimental ITC thermograms obtained, before blank subtraction, for carvedilol/ $\gamma$ -CD (left) and carvedilol/RAMEB (right) systems at 288 K in acetate buffer, according to protocol A (0.5 mM carvedilol in the cell and 5 mM CD in the syringe, upper part), B (buffer in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, mid part) and C (0.5 mM carvedilol in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, lower part); Figure S11: Experimental ITC thermograms obtained, before blank subtraction, for carvedilol/ $\gamma$ -CD (left) and carvedilol/RAMEB (right) systems at 298 K in acetate buffer, according to protocol A (0.5 mM carvedilol in the cell and 5 mM CD in the syringe, upper part), B (buffer in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, mid part) and C (0.5 mM carvedilol in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, lower part); Figure S12: Experimental ITC thermograms obtained, before blank subtraction, for carvedilol/ $\gamma$ -CD (left) and carvedilol/RAMEB (right) systems at 308 K in acetate buffer, according to protocol A (0.5 mM carvedilol in the cell and 5 mM CD in the syringe, upper part), B (buffer in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, mid part) and C (0.5 mM carvedilol in the cell and 1 mM carvedilol + 5 mM CD in the syringe, lower part); Figure S13: Mass spectra (200 scans, 0.2 sec/scan) of an equimolar mixture of carvedilol (8  $\mu\text{M}$ ) in acetate buffer in presence of (a) RAMEB or (b)  $\gamma$ CD; Figure S14: UV spectra of carvedilol (0.05 mM) recorded in water with 13 mM HCl in absence of CDs or in presence of 0.5 mM  $\gamma$ CD or RAMEB. No longer absorbance was detected between 400 and 800 nm for the three sample analyzed; Table S1: Values of the vicinal coupling constant between H15b and H16 protons ( $^3J_{\text{H15b, H16}}$ ) measured in different ratio (carvedilol)/(CD) on  $^1\text{H}$  NMR spectra (600 MHz) obtained from 0.1 M acetate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\beta$ CD,  $\gamma$ CD) and 13 mM HCl in  $\text{D}_2\text{O}$  (DIMEB); Table S2: Relative intensities of dipolar correlations between protons of carvedilol and CDs, as observed in 2D ROESY experiments.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.D.-P. and F.M.; methodology, F.D.-P., F.M., S.R. and D.M.; software, S.R., D.L., T.M. and F.M.; validation, F.D.-P., F.M., D.L. and D.M.; formal analysis, S.R., F.D.-P., T.M. and F.M.; investigation, S.R., D.L., F.D.-P., D.M., T.M. and F.M.; data curation, S.R. and D.L.; writing—original draft preparation, F.D.-P.; writing—review and editing, F.D.-P., D.L., S.R., F.M. and D.M.; supervision, F.D.-P. and F.M.; funding acquisition, F.D.-P., F.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.



**Funding:** This research and the PhD grant (S. Rigaud) were funded by the “Conseil Régional des Hauts de France” and “Université de Picardie Jules Verne”. The article processing charge was supported by the “Centre Hospitalier Universitaire d’Amiens-Picardie”.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

**Acknowledgments:** Wacker Chimie AG is kindly acknowledged for the generous gift of  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, HP $\beta$ CD and RAMEB. Serge Pilard and Dominique Cailleu are acknowledged for mass spectrometry and NMR analyses respectively and technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Alabed, S.; Sabouni, A.; Al Dakhoul, S.; Bdaiwi, Y. Beta-blockers for congestive heart failure in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *7*, CD007037. [CrossRef]
2. European medicines Agency. Inventory of Paediatric Therapeutic Needs—Cardiovascular Diseases. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/inventory-paediatric-medicines-cardiovascular-therapeutic-area\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/inventory-paediatric-medicines-cardiovascular-therapeutic-area_en.pdf) (accessed on 29 April 2021).
3. Beattie, K.; Phadke, G.; Novakovic, J. Carvedilol. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2013**, *38*, 113–157. [CrossRef]
4. Hamed, R.; Awadallah, A.; Sunoqrot, S.; Tarawneh, O.; Nazzal, S.; AlBaraghthi, T.; Al Sayyad, J.; Abbas, A. pH-Dependent Solubility and Dissolution Behavior of Carvedilol—Case Example of a Weakly Basic BCS Class II Drug. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2016**, *17*, 418–426. [CrossRef]
5. Mistry, P.; Batchelor, H. Evidence of acceptability of oral paediatric medicines: A review. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 361–376. [CrossRef]
6. Salimi, A.; Zadeh, B.S.M.; Hemati, A.A.; Birgani, S.A. Design and Evaluation of Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) Of Carvedilol to Improve the Oral Absorption. *Jundishapur, J. Nat. Pharm. Prod.* **2014**, *9*, e16125. [CrossRef] [PubMed]
7. Zhang, Y.; Zhi, Z.; Li, X.; Gao, J.; Song, Y. Carboxylated mesoporous carbon microparticles as new approach to improve the oral bioavailability of poorly water-soluble carvedilol. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 403–411. [CrossRef] [PubMed]
8. Planinšek, O.; Kovačič, B.; Vrečer, F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int. J. Pharm.* **2011**, *406*, 41–48. [CrossRef] [PubMed]
9. Mathiron, D.; Lori, R.; Pilard, S.; Soundara Rajan, T.; Landy, D.; Mazzon, E.; Rollin, P.; Djedaïni-Pilard, F. A Combined Approach of NMR and Mass Spectrometry Techniques Applied to the  $\alpha$ -Cyclodextrin/Moringin Complex for a Novel Bioactive Formulation. *Molecules* **2018**, *23*, 1714. [CrossRef] [PubMed]
10. Oliva, E.; Mathiron, D.; Bertaut, E.; Landy, D.; Cailleu, D.; Pilard, S.; Clément, C.; Courot, E.; Bonnet, V.; Djedaïni-Pilard, F. Physico-chemical studies of resveratrol, methyl-jasmonate and cyclodextrin interactions: An approach to resveratrol bioproduction optimization. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 1528–1538. [CrossRef]
11. Loftsson, T. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 63–67. [CrossRef]
12. Savic-Gajic, I.; Savic, I.M.; Nikolic, V.D.; Nikolic, L.B.; Popsavin, M.M.; Kapor, A.J. Study of the solubility, photostability and structure of inclusion complexes of carvedilol with  $\beta$ -cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2016**, *86*, 7–17. [CrossRef]
13. Sharma, A.; Jain, C.P. Carvedilol- $\beta$ -cyclodextrin Systems: Preparation, Characterization and in vitro Evaluation. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* **2013**, *12*, 51–58. [CrossRef]
14. Yuvaraja, K.; Das, S.K.; Khanam, J. Process optimization and characterization of carvedilol solid dispersion with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and tartaric acid. *Korean J. Chem. Eng.* **2015**, *32*, 132–140. [CrossRef]
15. Jessie, S.P.; Rachmat, M.; Visi, A.L. Improvement of carvedilol dissolution rate through formation of inclusion complex with B-cyclodextrin. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 228–233.
16. Pokharkar, V.; Khanna, A.; Venkatpurwar, V.; Dhar, S.; Mandpe, L. Ternary complexation of carvedilol,  $\beta$ -cyclodextrin and citric acid for mouth-dissolving tablet formulation. *Acta Pharm.* **2009**, *59*, 121–132. [CrossRef]
17. Shewale, B.D.; Sapkal, N.P.; Raut, N.A.; Gaikwad, N.J.; Fursule, R.A. Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on solubility of carvedilol. *Indian J. Pharm. Sci.* **2008**, *70*, 255–257. [CrossRef]
18. Loftsson, T.; Vogensen, S.B.; Desbos, C.; Jansook, P. Carvedilol: Solubilization and cyclodextrin complexation: A technical note. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2008**, *9*, 425–430. [CrossRef]
19. Djedaïni-Pilard, F.; Nevers, M.-C.; Weisse, S.; Grassi, J.; Perly, B.; Créminon, C. A sensitive and specific enzyme immunoassay for the detection of methyl ether derivatives of cyclomaltoheptaose. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2091–2099. [CrossRef]

20. Sajan, P.G.; Rohith, T.; Santosh, P.; Mantelingu, K.; Rangappa, K.S.; Kumara, M.N. Rapid, Highly efficient and stability indicating RP-UPLC method for the quantitative determination of potential impurities of carvedilol active pharmaceutical ingredient. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 214–220.
21. Job, P. Formation and stability complexes in solution. *Ann. Chim.* **1928**, *9*, 113–203.
22. Bertaut, E.; Landy, D. Improving ITC studies of cyclodextrin inclusion compounds by global analysis of conventional and non-conventional experiments. *Beilstein, J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2630–2641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 14 October 2021).
24. Enrico, R.; Lajos, S.; Jozsef, S. Drug/cyclodextrin/hydroxy acid multicomponent systems. Properties and pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1–8. [[CrossRef](#)]
25. Fine-Shamir, N.; Beig, A.; Zur, M.; Lindley, D.; Miller, J.M.; Dahan, A. Toward Successful Cyclodextrin Based Solubility-Enabling Formulations for Oral Delivery of Lipophilic Drugs: Solubility-Permeability Trade-Off, Biorelevant Dissolution, and the Unstirred Water Layer. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 2138–2146. [[CrossRef](#)]
26. Food and Drug Administration. US FDA/CFSAN—Approximate pH of Foods and Food Products. Available online: [https://www.webpal.org/SAFE/aaarecovery/2\\_food\\_storage/Processing/lacf-phs.htm](https://www.webpal.org/SAFE/aaarecovery/2_food_storage/Processing/lacf-phs.htm) (accessed on 14 October 2021).
27. Marçon, F.; Mathiron, D.; Pilard, S.; Lemaire-Hurtel, A.-S.; Dubaele, J.-M.; Djedaini-Pilard, F. Development and formulation of a 0.2% oral solution of midazolam containing gamma-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **2009**, *379*, 244–250. [[CrossRef](#)]
28. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J.; Lin, L.-N. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Anal. Biochem.* **1988**, *179*, 131–137. [[CrossRef](#)]
29. Schönbeck, C.; Holm, R. Exploring the Origins of Enthalpy-Entropy Compensation by Calorimetric Studies of Cyclodextrin Complexes. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 6686–6693. [[CrossRef](#)]
30. Lanzanova, F.A.; Argenta, D.; Arend, M.Z.; Junior, L.B.; Cardoso, S.G. LC and LC-MS Evaluation of Stress Degradation Behavior of Carvedilol. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, *32*, 526–543. [[CrossRef](#)]
31. Popielec, A.; Loftsson, T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. *Int. J. Pharm.* **2017**, *531*, 532–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wouessidjewe, D.; Crassous, A.; Duchêne, D.; Coleman, A.; Rysanek, N.; Tsoucaris, G.; Perly, B.; Djedaini, F. Inclusion of spironolactone in maltoheptaose: A guest affected by the hospitality of the host. *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, 313–322. [[CrossRef](#)]



## Annexe 2

*Oliva, E.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Monflier, E.; Sevin, E.; Bricout, H.; Tilloy, S.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Bonnet, V.; Pilard, S.; Djedaini-Pilard, F. New Lipidyl-Cyclodextrins Obtained by Ring Opening of Methyl Oleate Epoxide Using Ball Milling. Biomolecules* **2020**, *10*, 339, doi:10.3390/biom10020339.



Article

# New Lipidyl-Cyclodextrins Obtained by Ring Opening of Methyl Oleate Epoxide Using Ball Milling

Estefania Oliva <sup>1</sup>, David Mathiron <sup>2</sup> , Sébastien Rigaud <sup>2</sup>, Eric Monflier <sup>3</sup> , Emmanuel Sevin <sup>4</sup>, Hervé Bricout <sup>3</sup>, Sébastien Tilloy <sup>3</sup> , Fabien Gosselet <sup>4</sup> , Laurence Fenart <sup>4</sup>, Véronique Bonnet <sup>1</sup> , Serge Pilard <sup>2</sup>  and Florence Djedaini-Pilard <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> LG2A UMR CNRS 7378, Université de Picardie Jules Verne, 80039 Amiens CEDEX, France; estefania.oliva@etud.u-picardie.fr (E.O.); veronique.bonnet@u-picardie.fr (V.B.)

<sup>2</sup> Plateforme Analytique, Université de Picardie Jules Verne, 80039 Amiens CEDEX, France; david.mathiron@u-picardie.fr (D.M.); sebastien.rigaud@etud.u-picardie.fr (S.R.); serge.pilard@u-picardie.fr (S.P.)

<sup>3</sup> Univ. Artois, CNRS, Centrale Lille, Univ. Lille, UMR 8181–UCCS–Unité de Catalyse et Chimie du Solide, F-62300 Lens, France; eric.monflier@univ-artois.fr (E.M.); herve.bricout@univ-artois.fr (H.B.); sebastien.tilloy@univ-artois.fr (S.T.)

<sup>4</sup> LBHE EA 2465, Université d'Artois, 62307 Lens CEDEX, France; emmanuel.sevin@univ-artois.fr (E.S.); fabien.gosselet@univ-artois.fr (F.G.); laurence.tilloy@univ-artois.fr (L.F.)

\* Correspondence: florence.pilard@u-picardie.fr; Tel.: +33-322-827-562

Received: 22 January 2020; Accepted: 15 February 2020; Published: 20 February 2020



**Abstract:** Bearing grafts based on fatty esters derivatives, lipidyl-cyclodextrins (L-CDs) are compounds able to form water-soluble nano-objects. In this context, bicationary biobased lipidic-cyclodextrins of low DS were easily synthesized from a fatty ester epoxide by means of alternative methods (ball-milling conditions, use of enzymes). The ring opening reaction of methyl oleate epoxide needs ball-milling and is highly specific of cyclodextrins in solventless conditions. L-CDs are thus composed of complex mixtures that were deciphered by an extensive structural analysis using mainly mass spectrometry and NMR spectroscopy. In addition, as part of their potential use as vectors of active drugs, these products were submitted to an integrity study on in vitro model of the blood-brain-barrier (BBB) and the intestinal epithelium. No toxicity has been observed, suggesting that applications for the vectorization of active ingredients can be expected.

**Keywords:** host-guest chemistry; cyclodextrin; sustainability; ball milling; mass spectrometry

## 1. Introduction

Because of their cyclic structure, cyclodextrins (CDs) are able to accommodate hydrophobic molecules in their cavity, resulting in inclusion complexes. This property is at the origin of their many applications in various fields such as the pharmaceutical industry, cosmetics, hygiene, food processing, and chemistry, through catalysis and chromatographic techniques [1,2]. In addition, chemical modifications of their hydroxyl groups cause changes in their physico-chemical properties (solubility, self-assembly capacity or inclusion properties), thus increasing their fields of application. Moreover, it is well documented that amphiphilic CDs, carrying lipophilic groups, may have self-organizing properties as well as complexing properties with the invited molecules, improving their vectorization [3]. For several years, we have synthesized monosubstituted cyclodextrins-bearing hydrophobic anchors such as cholesterol [4], phospholipidyl [5], or glycerolipidyl [6] that are inserted into lipid membranes [7]. These properties are directly related to the type of cyclodextrin and lipidic moieties and also to the substitution degree (DS). Nevertheless, despite their potential interest in the vectorization of active ingredients, the synthesis of these amphiphilic CDs is both tricky and expensive, limiting any

application. To illustrate, phospholipidyl and glycerolipidyl cyclodextrin derivatives [5,6] have been obtained in no less than seven steps of synthesis and two steps of purification with overall yields between 5% and 10%.

In this context, we have developed an easy pathway for lipidyl-cyclodextrins (L-CDs) synthesis with controlled DS. The self-assembly capacities of these L-CDs have been also evaluated in order to consider applications in the vectorization of active ingredients. The synthesized molecules are bicatenary L-CDs of low DS. The lipid part is derived from methyl oleate, a fatty acid methyl ester (FAME) easily accessible from triolein triglyceride, a major component of very high oleic sunflower oil (VHOSO). The grafting has been done by ring opening reaction of the methyl oleate epoxide by the CDs. The different strategies envisaged to carry out the opening reaction of the epoxide obtained by CDs is described. Indeed, activation modes such as ultrasound [8,9], microwaves [10,11], or mechanochemistry [12] are considered as useful green tools for the chemical modification of cyclodextrins. Cravotto et al. reported some works where ball milling is used to obtain well-known CD derivatives but under green and solventless conditions and with better yields [13,14]. Very few examples of more specific regioselectivity induced by mechanochemistry are reported. Manuel et al. described a very efficient method for obtaining mono-2-tosyl- $\beta$ -CD and mono-(2,3-manno-epoxide)- $\beta$ -CD [15]. Formation of inclusion complex in solid state between CD and TSI<sub>m</sub> is suggested to explain CD substitution at the secondary hydroxyl group. Here we focus on the results obtained (yields, DS) with the selected and optimized method using ball-milling conditions on the opening reaction of methyl oleate epoxide by cyclodextrins.

Single-step synthesis routes, overcoming protection and deprotection steps and allowing quantities of products to be reached at gram scale, are favored in order to facilitate the potential applications. However, the absence of protection and deprotection steps should lead to complex mixtures of diversely substituted CDs. Since the composition of these mixtures has an influence on the self-organizing capacity of the products, it is important to characterize it. This is why the implementation of an accurate characterization is fundamental and a real challenge in our work. It is well-known that complex CDs derivatives mixtures lead to broad and unresolved <sup>1</sup>H-NMR signals [16] preventing the attribution of their inextricable spectra. In this context, NMR is of only limited help and mass spectrometry is considered as the most appropriate technique. Indeed, electrospray ionization (ESI) either in direct introduction [17] or coupled with liquid chromatography (LC/ESI-MS) [18] and matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) [16] are frequently used in that context. To go deeper in the structural analysis of cyclic oligosaccharides tandem mass spectrometry (MS/MS) [19] and more recently ion mobility spectrometry (IMS) [20] are described. In this study, in addition to classical NMR and mass spectrometry experiments, we focus on an original approach based on ion mobility measurements for a better structural characterization of L-CDs isomers.

Finally, we used two recognized in vitro models of human intestinal and blood-brain barriers to evaluate the toxicity of different concentrations of L-CDs. No toxicological or deleterious effects have been observed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Native  $\beta$ -CD and RAMEB were obtained from Wacker Chemicals. Native  $\alpha$ -CD and  $\gamma$ -CD, HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD, methyl oleate (Methyl-*cis*-9-octadecenoate, 99% purity) and immobilized lipase (lipase acrylic resin from *Candida antarctica*,  $\geq 5000$  U/g) were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). Other chemicals were purchased from Sigma and Acros. Deuterated solvents were purchased from Eurisotop.

## 2.2. Flash Chromatography

A flash chromatography apparatus (Reveleris iES Flash System) provided by Grace has been used for the purification of CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME. The separation was carried out using a Grace Reveleris C18 40 µm, 40 g column. A gradient of H<sub>2</sub>O/MeOH (from 80:20 to 0:100 (v/v)) in 15 min was applied to allow removal of the remaining native β-CD and obtaining the desired product. The detection of the compound is carried out with an evaporative light scattering detector.

## 2.3. Ball Milling

Syntheses of CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME were carried out in a SPEX Mixer Mill 8000M vibration ball mill. For this, we used a 65 mL screw-capped stainless steel jar containing 12 stainless steel balls of diameter between 4.0 and 12.7 mm (3 balls of 12.7 mm, 5 of 6.4 mm, and 4 of 4.0 mm). The vessel was shaken at a frequency of about 18 Hz, describing a “∞” for the duration of the reaction (5 cycles of 1 h).

## 2.4. Mass Spectrometry Analysis

Electrospray high-resolution mass spectrometry experiments (ESI-HRMS) was performed on a SYNAPT G2-Si-Q-TOF hybrid quadrupole time-of-flight instrument (Waters, Manchester, UK), hyphenated with an UHPLC system (ACQUITY UPLC H-Class) and a traveling wave ion mobility (TWIM) cell. The ESI source was operated in the positive ionization mode using a capillary voltage of +3 kV and the following conditions: cone voltage, 120 V; source offset, 20 V; source temperature, 120 °C; desolvation gas temperature, 450 °C; desolvation gas flow, 800 L/h; and cone gas flow, 50 L/h. Nitrogen (>99.5%) was employed as the desolvation gas. For negative ionization mode a capillary voltage of −2.5 kV was used. Mass calibration was carried out using a sodium formate solution (10 mM NaOH in isopropanol/water/formic acid 49.9:49.9:0.2, v/v/v) and the lock mass correction was applied for accurate mass measurements using protonated and deprotonated molecules ([M + H]<sup>+</sup> at *m/z* 556.2771 in ESI<sup>+</sup> and [M − H]<sup>−</sup> at *m/z* 554.2615 in ESI<sup>−</sup>) formed from a Leu-enkephalin solution (1 ng/µL in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/formic acid 50:49.9:0.1, v/v/v). The scan range was *m/z* 50–2500 at 0.25 s/scan. The TOF was operated in the resolution mode, providing an average resolving power of 25,000 (FWHM). For MS/MS, spectra were recorded using the trap cell, with a collision energy set to 95 eV under Argon (99.9999%) as the collision gas. All spectra were recorded in the continuum mode. Data acquisition was performed with MassLynx software (V4.1, Waters).

Direct introduction and UHPLC conditions: Samples were prepared in MeOH at a concentration of 1 mg/mL and 1 µL was injected. Automated flow injections (FIA) were performed using MeOH as the mobile phase with a flow rate of 0.4 mL/min. For UHPLC separations an ACQUITY UPLC BEH C8 (100 × 2.1 mm, 1.8 µm) column from Waters, maintained at 40 °C, was used. The elution was performed using a 0.4 mL/min mobile phase gradient of water (A) and methanol (B), programmed as follow (A:B): 60:40 (t = 0 min), 20:80 (t = 10 min), 20:80 (t = 11 min), 0:100 (t = 12 min), 0:100 (t = 15 min), 60:40 (t = 16 min), 60:40 (t = 20 min).

Ion mobility: Ion mobility separation has been carried out by activating TWIM cell operating under nitrogen (>99.5%) with wave height (WH), wave velocity (WV), and gas flow values at 40 V, 550 m/s, and 90 mL/min, respectively. The mass of β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME DS = 1 ([M + Na]<sup>+</sup> *m/z* 1469.6254) was previously selected by the quadrupole to reduce noise and for more specificity. External collision cross section (CCS) calibration was performed using a polyalanine solution (50 µM in water/acetonitrile/formic acid 49.95:49.95:0.1, v/v/v). The arrival time (AT) of each DS = 1 isomer was extracted with Driftscope software (V2.8, Waters). Molecules were simulated by Chem3D (V15.1, PerkinElmer) and CCS values were predicted through IMoS software (V1.09c, <https://www.imospedia.com>).

## 2.5. NMR Analysis

The NMR experiments were carried out on 2 Bruker AVANCE spectrometers (400 and 600 MHz). They were therefore performed respectively at 400 MHz for <sup>1</sup>H and 101 MHz for <sup>13</sup>C, or 600 MHz for



$^1\text{H}$  and 151 MHz for  $^{13}\text{C}$ . The deuterated solvents used were pyridine, chloroform, water, or methanol. The chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in ppm relative to the residual signal of the non-deuterated solvent as internal reference. The spectra were recorded at 298 K. The length of the  $90^\circ$  pulse was approximately 7  $\mu\text{s}$ . 1D NMR data spectra were collected using 16K data points. 2D experiments were run using 1K data points and 512 time increments. The phase sensitive (TTPI) sequence was used and processing resulted in a 1 K  $\times$  1 K (real-real) matrix. Details of the experimental conditions are given in the figure captions. For diffusion coefficient measurements, 2D  $^1\text{H}$  DOSY NMR experiments were carried out using the Bruker sequence ledbpgp2s.

## 2.6. Synthesis and Product Characterization

### 2.6.1. Methyl Oleate Epoxide

Preparation of epoxidized methyl oleate was carried out by reacting methyl oleate with 0.4 eq. formic acid and hydrogen peroxide (35%w aq., 6 eq.) from 0 to 40  $^\circ\text{C}$  for 16 h. After basic work-up, epoxide was obtained with 98% yield (yellow oil) [21].  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.96–2.82 (m, 2H,  $\text{H}_9$  and  $\text{H}_{10}$ ), 2.31–2.27 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ ), 1.71–1.55 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.55–0.96 (m, 24H,  $\text{CH}_2$ ), 0.87 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 174.4 (C=O), 57.4, 57.3 (C-9 and C-10), 51.6 (C- $\text{OCH}_3$ ), 34.2 ( $\text{CH}_2$  ( $\text{CH}_2\text{OCO}$ )), 32.0–22.8 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 14.2 ( $\text{CH}_3$ ). MS (ESI):  $m/z$  335.2578 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ).

### 2.6.2. $\text{CD}(\text{C}_9)_2\text{OOMe}$

General procedure: All the CDs were lyophilized before use. Methyl oleate epoxide (275 mg, 0.88 mmol, 0.5 eq) and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4.7  $\mu\text{L}$ , 0.088 mmol, 0.05 eq) were vortexed and added to the lyophilized CD (1 eq, 1.76 mmol). The reaction was carried out for 1 h in a ball mill. Then, a mixture of the methyl oleate epoxide (275 mg, 0.88 mmol, 0.5 eq) and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4.7  $\mu\text{L}$ , 0.088 mmol, 0.05 eq) was added to the reaction mixture. The reaction continued for 1 h again. This addition was repeated three times; so that 1 eq of CD reacted with a total of 2.5 eq of epoxide and 0.25 eq of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  for a total duration of 5 h. The solid was recovered with 20 mL of DMF. The product was then concentrated in a rotary evaporator and poured dropwise into the cyclohexane with stirring to precipitate it. Centrifugation was carried out and the final product was obtained after purification by reverse phase flash chromatography (40  $\mu\text{m}$  C18 column, 40 g) with a  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  gradient (from 80:20 to 0:100 ( $v/v$ )) for 15 min.

- $\beta\text{-CD}(\text{C}_9)_2\text{OOMe}$ , **1**: Yield: 55%.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$  (ppm): 5.69–5.60 ( $\text{H}_1$ ), 4.85–3.55 ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ), 3.63 ( $-\text{OCH}_3$ ), 2.30–1.01 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 0.84 ( $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$  (ppm): 174.4 (C=O), 104.3 ( $\text{C}_1$ ), 85.2–83.0 ( $\text{C}_4$ ), 75.3–72.7 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ), 62.4–61.6 ( $\text{C}_6$ ), 51.7 ( $-\text{OCH}_3$ ), 34.5–23.0 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 14.6 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (ESI):  $m/z$  DS1: 1469.6233 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{61}\text{H}_{106}\text{O}_{38}\text{Na}$  requires 1469.6260)),  $m/z$  DS2: 1781.8888 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{80}\text{H}_{142}\text{O}_{41}\text{Na}$  requires 1781.8924)) SI Figure S1.
- $\alpha\text{-CD}(\text{C}_9)_2\text{OOMe}$ , **2**: Yield: 28%.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$  (ppm): 5.77–5.38 ( $\text{H}_1$ ), 5.01–3.49 ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ), 2.66–1.06 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 0.84 ( $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$  (ppm): 174.3 (C=O), 104.5–103.5 ( $\text{C}_1$ ), 86.1–82.4 ( $\text{C}_4$ ), 76.4–70.0 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ), 62.4–60.8 ( $\text{C}_6$ ), 51.6 ( $-\text{OCH}_3$ ), 35.1–22.7 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 14.6 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (ESI):  $m/z$  DS1: 1307.5717 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{55}\text{H}_{96}\text{O}_{33}\text{Na}$  requires 1307.5732)),  $m/z$  DS2: 1619.8401 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{74}\text{H}_{132}\text{O}_{36}\text{Na}$  requires 1619.8396)) SI Figure S2.
- $\gamma\text{-CD}(\text{C}_9)_2\text{OOMe}$ , **3**: Yield: 33%.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$  (ppm): 5.98–5.45 ( $\text{H}_1$ ), 4.79–3.52 ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ), 3.63 ( $-\text{OCH}_3$ ), 2.50–1.06 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 0.81 ( $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$  (ppm): 174.2 (C=O), 103.6 ( $\text{C}_1$ ), 85.5–81.0 ( $\text{C}_4$ ), 75.6–71.3 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ), 63.2–60.9 ( $\text{C}_6$ ), 51.6 ( $-\text{OCH}_3$ ), 35.0–22.6 ( $\text{CH}_2$  (alkyl chains)), 14.6 ( $\text{CH}_3$ ). HRMS (ESI):  $m/z$  DS1: 1631.6769 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{67}\text{H}_{116}\text{O}_{43}\text{Na}$  requires 1631.6788)),  $m/z$  DS2: 1943.9395 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ( $\text{C}_{86}\text{H}_{152}\text{O}_{46}\text{Na}$  requires 1943.9452)) SI Figure S3.

- HP- $\alpha$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOMe, **4**: Yield: 33%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 6.42–5.24 (H<sub>1</sub>), 4.92–3.55 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 3.63 (-OCH<sub>3</sub>), 2.43–1.46 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 1.50–1.03 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 0.84 (CH<sub>3</sub> (alkyl chains)). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 174.3 (C=O), 105.0–100.5 (C<sub>1</sub>), 86.1–77.4 (C<sub>4</sub>), 76.0–66.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 63.0–60.7 (C<sub>6</sub>), 51.6 (-OCH<sub>3</sub>), 34.8–22.9 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 21.0–19.9 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z* DS1: 1597.7808 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>70</sub>H<sub>126</sub>O<sub>38</sub>Na requires 1597.7825)), *m/z* DS2: 1852.0050 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>86</sub>H<sub>156</sub>O<sub>40</sub>Na requires 1852.0071)) SI Figure S4.
- HP- $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOMe, **5**: Yield: 35%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 6.22–5.35 (H<sub>1</sub>), 4.80–3.55 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 3.62 (-OCH<sub>3</sub>), 2.50–1.46 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 1.50–1.10 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 0.83 (CH<sub>3</sub> (alkyl chains)). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 174.3 (C=O), 105.0–100.0 (C<sub>1</sub>), 85.4–78.0 (C<sub>4</sub>), 75.7–66.2 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 62.4–61.3 (C<sub>6</sub>), 51.6 (-OCH<sub>3</sub>), 35.0–23.1 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 21.1–19.9 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z* DS1: 1875.9177 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>82</sub>H<sub>148</sub>O<sub>45</sub>Na requires 1875.9190)), *m/z* DS2: 2188.1821 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>101</sub>H<sub>184</sub>O<sub>48</sub>Na requires 2188.1855)), *m/z* DS3: 2500.4465 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>120</sub>H<sub>220</sub>O<sub>51</sub>Na requires 2500.4519)). SI Figure S5.
- HP- $\gamma$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOMe, **6**: Yield: 44%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 6.49–5.31 (H<sub>1</sub>), 4.70–3.49 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 3.63 (-OCH<sub>3</sub>), 2.50–1.46 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 1.44–1.01 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 0.82 (CH<sub>3</sub> (alkyl chains)). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 174.3 (C=O), 104.6–98.9 (C<sub>1</sub>), 86.0–78.4 (C<sub>4</sub>), 75.8–65.6 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 63.0–60.2 (C<sub>6</sub>), 51.7 (-OCH<sub>3</sub>), 34.9–22.7 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 20.9–19.6 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z* DS1: 1979.9336 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>85</sub>H<sub>152</sub>O<sub>49</sub>Na requires 1979.9300)), *m/z* DS2: 2292.1956 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>104</sub>H<sub>188</sub>O<sub>52</sub>Na requires 2292.1964)), *m/z* DS3: 2604.4609 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>123</sub>H<sub>224</sub>O<sub>55</sub>Na requires 2604.4629)) SI Figure S6.

### 2.6.3. CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH

General procedure: Immobilized lipase from *Candida Antarctica* was added to a suspension of CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOMe (0.4 mmol, 1 eq) in water (90 mL). The reaction took place in a rotary evaporator at 90 mbar and 23 °C. The duration of the reaction depends on the starting material. The product was isolated by simple filtration of the immobilized lipase followed by the lyophilization to obtain the derivative CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH.

- $\alpha$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH, **7**: Yield: 78%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 5.77–5.38 (H<sub>1</sub>), 5.01–3.49 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 2.66–1.06 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 0.84 (CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 176.7 (C=O), 104.7–103.1 (C<sub>1</sub>), 85.7–81.9 (C<sub>4</sub>), 76.3–69.4 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 62.7–60.8 (C<sub>6</sub>), 35.9–22.9 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z*: 1293.5549 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>54</sub>H<sub>94</sub>O<sub>33</sub>Na requires 1293.5575)) SI Figure S7.
- $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH, **8**: Yield: 69%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 5.67(H<sub>1</sub>), 4.97–3.49 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 2.56–1.01 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 0.81 (CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 176.5 (C=O), 104.3 (C<sub>1</sub>), 85.4–82.7 (C<sub>4</sub>), 75.5–72.2 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 62.5–61.2 (C<sub>6</sub>), 35.4–22.9 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z*: 1455.6115 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>60</sub>H<sub>104</sub>O<sub>38</sub>Na requires 1455.6103)) SI Figure S8.
- $\gamma$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH, **9**: Yield: 89%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 6.03–5.20 (H<sub>1</sub>), 5.10–3.47 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 2.67–1.00 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 0.84 (CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 176.6 (C=O), 105.2–94.6 (C<sub>1</sub>), 85.2–78.2 (C<sub>4</sub>), 76.7–68.6 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 64.9–60.2 (C<sub>6</sub>), 36.0–22.4 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z*: 1617.6648 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>66</sub>H<sub>114</sub>O<sub>43</sub>Na requires 1617.6632)) SI Figure S9.
- HP- $\alpha$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH, **10**: Yield: 82%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 5.72–5.31 (H<sub>1</sub>), 4.89–3.31 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 2.78–1.47 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 1.50–1.00 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 0.84 (CH<sub>3</sub> (alkyl chains)). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm): 176.7 (C=O), 105.2–100.0 (C<sub>1</sub>), 87.3–76.8 (C<sub>4</sub>), 76.6–65.1 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 63.8–60.4 (C<sub>6</sub>), 36.6–22.4 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)),

- 21.5–18.8 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z*: 1525.7257 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>66</sub>H<sub>118</sub>O<sub>37</sub>Na requires 1525.7250)) SI Figure S10.
- HP-β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH, **11**: Yield: 84%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ (ppm): 6.00–5.35 (H<sub>1</sub>), 5.09–3.09 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 2.96–1.57 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 1.56–1.00 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 0.84 (CH<sub>3</sub> (alkyl chains)). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ (ppm): 176.6 (C=O), 105.2–100.0 (C<sub>1</sub>), 85.6–77.5 (C<sub>4</sub>), 75.7–65.7 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 63.1–60.2 (C<sub>6</sub>), 36.2–22.6 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 21.3–19.8 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z*: 1861.9044 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>81</sub>H<sub>146</sub>O<sub>45</sub>Na requires 1861.9034)) SI Figure S11.
  - HP-γ-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH, **12**: Yield: 89%. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ (ppm): 5.99–5.27 (H<sub>1</sub>), 4.80–3.24 (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 2.60–1.47 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 1.47–1.02 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 0.83 (CH<sub>3</sub> (alkyl chains)). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ (ppm): 176.5 (C=O), 104.4–98.8 (C<sub>1</sub>), 85.9–77.6 (C<sub>4</sub>), 76.2–65.7 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 62.9–60.4 (C<sub>6</sub>), 35.7–22.8 (CH<sub>2</sub> (alkyl chains)), 20.9–19.6 (CH<sub>3</sub> (hydroxypropyl groups)), 14.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z*: 1965.9083 ([M + Na]<sup>+</sup> (C<sub>84</sub>H<sub>150</sub>O<sub>49</sub>Na requires 1965.9143)) SI Figure S12.

### 2.7. In Vitro Models of Intestinal and Blood-Brain Barriers

For the human in vitro Blood-Brain Barrier (BBB) model, it required the collection of human umbilical cord blood. Infants' parents signed an informed consent form, in compliance with the French legislation. The protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321). All experiments were carried out in accordance with the approved protocol. The human in vitro BBB model isolated and purified the hematopoietic stem cells from umbilical cord blood [22]. These cells are then differentiated into endothelial cells as previously described. After the differentiation step, cells are seeded on matrigel-coated transwell inserts (0.4 μm) in the presence of brain pericytes at the bottom of the wells [23]. Endothelial cell medium (ECM, Sciencell) was changed every other day. After 6 days of co-culture, endothelial cells display the major features of the BBB reported in vivo and are then named brain-like endothelial cells (BLECs).

The intestinal barrier model cultivated Caco-2 cells on a filter as we previously published [24]. Briefly,  $0.4 \times 10^5$  Caco-2 cells, at passage 026, were seeded on 25 cm<sup>2</sup> plastic flask and changed every second day with complete medium containing Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high glucose (4500 mg/L) with L-glutamine (584 mg/L) supplemented by 10% of fetal calf/bovine serum 1% of non-essential amino acids without L-glutamine and 1% of penicillin and streptomycin solution. Cells were then trypsinized after 3 days of incubation while they cover 80–90% of the flask and seeded at a density of  $5 \times 10^5$  in 75 cm<sup>2</sup> flasks in complete medium. After 5 to 6 days, Caco2 cells reach high cells density and are then passaged into transwell inserts (0.4 μm). Cells were seeded at 225,000 cells/cm<sup>2</sup> and cultivated for 21–25 days in complete medium. Media was renewed every second day.

### 2.8. Permeability Assessment

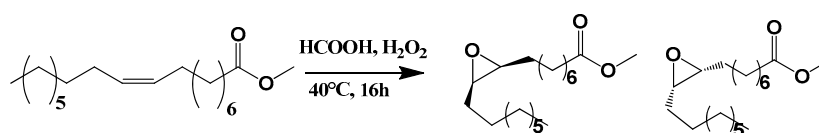
Permeability of small integrity marker, <sup>14</sup>C-sucrose, across the monolayer of cells was measured in presence of 5, 10, 20, 25, 30, 40, and 50 μM of cyclodextrin or 10% DMSO used as positive control of biological barrier disruptions. Filters containing cells were placed in wells containing Ringer-Hepes solution (RH) (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM HEPES, pH: 7.4). After filters transfer, RH containing 1500 Bq/mL of <sup>14</sup>C-sucrose was added to the upper compartment. An aliquot of 500 μL from the lower compartment at each time point and an aliquot of 20 μL from the initial solution of <sup>14</sup>C-Sucrose was used for quantification (Tricarb liquid scintillation counter, Perkinelmer). After one-hour incubation, the permeability of <sup>14</sup>C-sucrose was measured and expressed in Papp (apparent permeability for the intestinal barrier model) and Pe (permeability for the BBB model). The apparent permeability coefficient (*Papp* in cm/s) was determined according to the equation:  $Papp = J/A \times C_0$ . Where, *J* is the rate of appearance of compound in the apical (acceptor) compartment (in mol/s), *C*<sub>0</sub> is the initial concentration of compound in the basolateral (donor) compartment (in mol/cm<sup>3</sup>), *A* is the surface area of the filter (in cm<sup>2</sup>). For the BLEC model,

endothelial permeability coefficient ( $Pe$ ) was calculated as described previously [25]. In this calculation method, both filter without cell permeability ( $PS_f = \text{insert filter} + \text{matrigel coating}$ ) and filter plus cell permeability ( $PS_t = \text{filter} + \text{collagen} + \text{BLECs}$ ) were taken into account, according to the formula:  $1/PS_e = 1/PS_t + 1/PS_f$  where  $PS$  is the permeability  $\times$  surface area product (in microliters per minute) obtained by dividing the volume cleared from the donor to the receiver compartment (in  $\mu\text{L}$ ) by the duration of the experiment (i.e., 60 min).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Synthesis

The main goal of this work is to synthesize new bicyclic cyclodextrins from substitution of native and modified cyclodextrins by fatty acid derivatives. In this way, we focused on the ring opening of the methyl oleate epoxide by the hydroxyl group of different cyclodextrins. The epoxidation reaction of pure methyl oleate (Methyl-cis-9-octadecenoate) was carried out according to the previously described conventional method using hydrogen peroxide and formic acid [21]. This resulted in methyl oleate epoxide with a yield of 98% (Scheme 1).



**Scheme 1.** Epoxidation reaction of methyl oleate.

Epoxidation has been demonstrated by a  $^1\text{H}$  NMR analysis. Indeed, characteristic signals of the protons of the alkene group (5.38–5.28 ppm) disappeared, and the signals between 2.96 and 2.82 ppm, corresponding to the protons of the epoxide group were observed (SI, Figure S13). By electro spray ionization mass spectrometry in the positive ion mode ( $\text{ESI}^+\text{-MS}$ ), the formation of epoxide was also confirmed. Indeed, the  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ion of the starting olefin at  $m/z$  319.26 was replaced by the one of the methyl oleate epoxide at  $m/z$  335.2578 (+16 Da). Notice that the use of cis olefin leads to only cis epoxide derivatives, which is in agreement with the literature data [21].

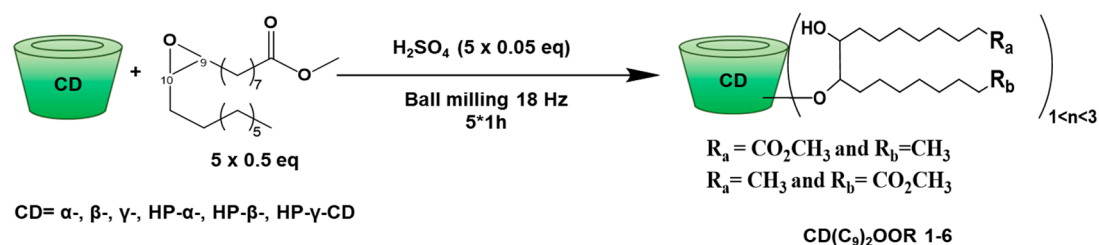
In order to study the opening reaction of methyl oleate epoxide by CDs, we highlight some aspects to consider. On the one hand, very few examples in the literature have described the opening of epoxides by cyclodextrins. We can mention the etherification of  $\beta$ -CD with propylene oxide in the presence of NaOH to obtain the HP- $\beta$ -CD derivative [26]. Reactions of  $\beta$ -CD with ethylene oxide, epichlorohydrin, or 1,4-butanediol diglycidyl ether in basic medium leading to water-soluble polymers have also been reported [27–29], and  $\beta$ -amino-alcohol derivatives of  $\beta$ -CDs were synthesized by reaction of amino  $\beta$ -CD and various epoxides [30]. It should be noted that most of the examples in the literature concerned reactions with highly reactive and low molecular weight epoxides and did not lead to the production of amphiphilic CDs. To date, the opening reaction of epoxides of unsaturated fatty acids by CDs has not been described. In contrast, some studies dealing with the opening reaction of fatty epoxides by mono or disaccharides have been reported. For instance, Queneau et al. [31,32] studied the production of hydroxyethers of sucrose, trehalose, and isomalt in basic medium with 1,2-epoxidodecane. Albarrán-Preza et al. [33] have also carried out the reaction between epoxidized linseed oil and xylitol in the presence of  $\text{ZnCl}_2$ , in *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP). On the other hand, in our case, the epoxide group is located in the middle of a fatty chain, which may imply a steric hindrance. In addition, this product also has an ester group, which could react preferentially through transesterification depending on the conditions used.

The opening reaction of methyl oleate epoxide by CDs was first studied in solution in a basic medium. In the same way as Manta et al. [29], we used aqueous NaOH solution (0.6 M) for the reaction between  $\beta$ -CD and excess of fatty ester epoxide. After 24 h at room temperature or even 48 h at 100 °C, the expected product was not detected and the epoxide was hydrolyzed to give the corresponding diol

and polymerization products identified by ESI<sup>+</sup>-MS. The use of Et<sub>3</sub>N or NaH as base in anhydrous DMF also failed. It should be noted that the same reactions conducted with 6<sup>l</sup>-amino-6<sup>l</sup>-deoxy-β-CD (β-CDNH<sub>2</sub>) were unsuccessful too. Tests were then performed with Lewis acids, such as ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, and BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O as well as Brønsted acids, such as para-toluenesulfonic acid (APTS) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. All the reactions conducted in anhydrous DMF, at room temperature or 80 °C, during 24 or 48 h, led to the hydrolysis of the epoxide group followed by the polymerization of the methyl oleate epoxide. It should be noted that the microwave conditions (300 W, 80 °C) also failed to lead to the formation of L-CDs from epoxide (from 0.5 to 2.5 eq.) and 1 eq. of β-CD lyophilized catalyzed by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (from 0.05 to 0.25 eq.) in anhydrous DMF. Even after 75 min, we did not see the formation of the expected product.

Finally, we attempted the ring opening of epoxide using ball milling, a mecnosynthesis technique widely used in green chemistry [12,13]. Very recently, Cravotto et al. [14] described ring opening of low-boiling epoxides by CDs under high-energy ball milling conditions and in the presence of NaOH, leading to well-known HP-β-CD, HP-γ-CD and epichlorhydrin cross-linked CD-polymers. We tried to initiate the opening reaction of methyl oleate epoxide by β-CD with various bases and acids in the absence of solvent. For the various tests performed, the β-CD was previously lyophilized, the oleate epoxide/CD ratio was 0.5 to 2.5 and the base or acid amount was 0.1 to 0.5 eq. relative to the β-CD. Initially, we tested the reaction with triethylamine and KOH as strong mineral base. As with the result obtained in solution, the expected product was not observed nor the polymerized by-products and hydrolyzed epoxide. However, the same reaction performed with APTS led to expected lipidyl-β-CD with a weak yield of 10%, as confirmed by the ESI<sup>+</sup>-MS analysis showing a signal corresponding to the [M + Na]<sup>+</sup> ion of the desired product at *m/z* 1469.62 (SI, Figure S14).

New attempts in the presence of a stronger acid such as H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> have been successfully made. To summarize, the optimized experimental conditions are the following: 0.5 eq. of methyl oleate epoxide and 0.05 eq. of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> are mixed previously for 10 min and then added to 1 eq. of β-CD freeze-dried with a 1-h grinding cycle (Scheme 2).



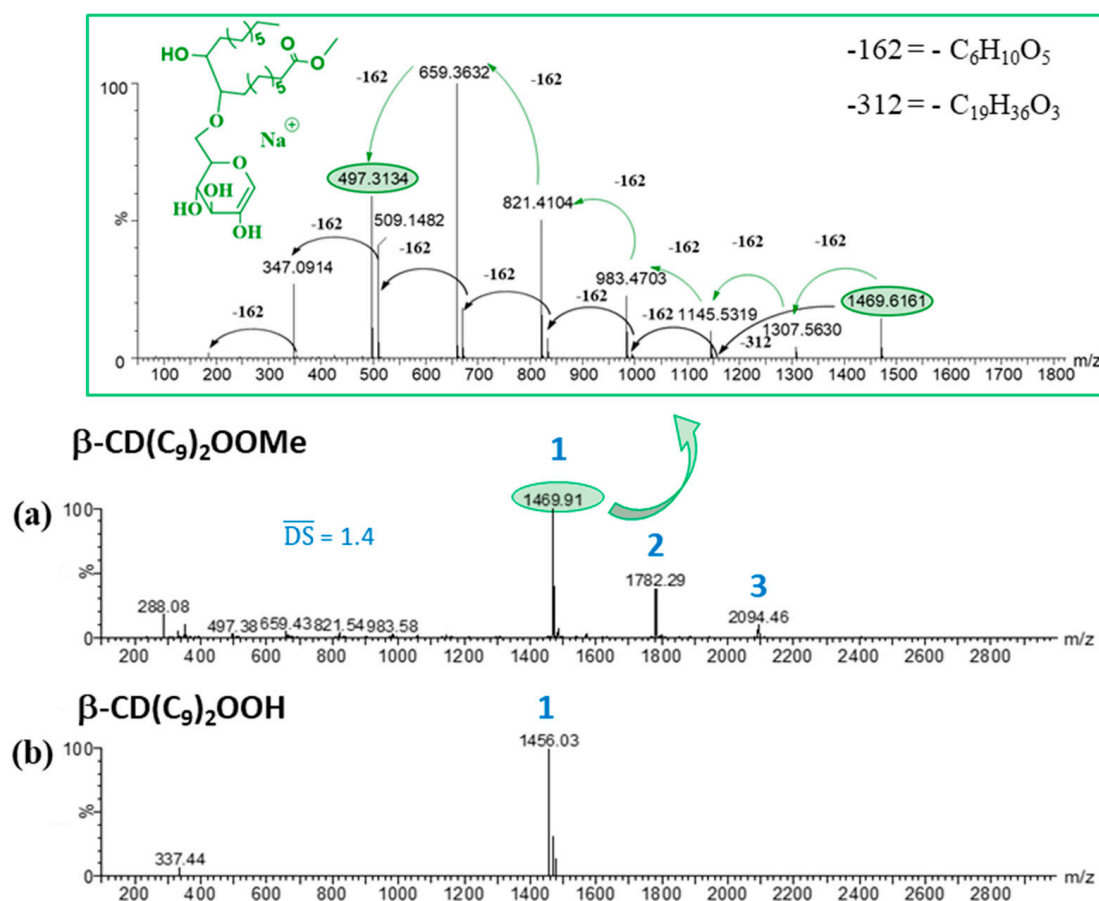
**Scheme 2.** Opening reaction of methyl oleate epoxide by CDs using ball milling.

The process is repeated for five cycles to avoid the formation of a sticky paste harmful for reactivity [34–36], leading to a final oleate epoxide/CD ratio of 2.5 in the presence of 0.25 eq. of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It should be noted that the completion of a sixth one-hour cycle did not result in an improvement in performance.

The reaction mixture retained its powder state and the resulting β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 1 exhibited between 1 and 3 substituents as displayed on Scheme 2. This crude reaction mixture was analyzed by ESI<sup>+</sup>-MS (SI, Figure S14) revealing the expected grafted derivatives of DS = 1, 2, and 3 and also free β-CD, the starting epoxide and its polymerized co-products. According to MS data, we were able to determine the average degree of substitution  $\overline{\text{DS}}$  of our L-CDs mixture using the respective intensity of each species. This result allows the calculation of an average molar mass (MWa) and to access the reaction yield. The  $\overline{\text{DS}}$  calculated from ESI<sup>+</sup>-MS spectrum was 1.4 and the yield achieved was 55% after treatment allowing an efficient elimination of the starting materials without modification of the grafting distribution profile (Figure 1, Table 1). In addition, for β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 1, the effective grafting of 1, 2, or 3 methyl oleate chains was demonstrated by MS/MS experiments on their respective [M + Na]<sup>+</sup> ions at *m/z* 1469.63, 1781.89, and 2094.16. For illustration (Figure 1), the MS/MS spectrum



obtained for the mono-grafted species highlighted two fragmentation pathways. On the one hand, six successive losses of glucopyranose unit ( $-162$  Da) were observed [19] leading to the characteristic fragment ion at  $m/z$  497.31, which was attributed to a sodiated mono grafted dehydro glucose unit. On the other hand, a loss of 312 Da corresponding to the methyl oleate chain occurred first and was then followed by six successive losses of 162 Da. This result is a proof of the effective methyl oleate epoxide opening by the  $\beta$ -CD. The MS/MS spectra of DS = 2 and 3 are in accordance with the grafting of 2 and 3 lipidyl chains without, as for DS = 1, any assumption of the regioselectivity (SI, Figure S15).



**Figure 1.** Electro spray ionization mass spectrometry (ESI<sup>+</sup>-MS) spectra of  $\beta\text{-CD}(\text{C}_9)_2\text{OOME}$  **1** (a) and  $\beta\text{-CD}(\text{C}_9)_2\text{OOH}$  **8** (b). For **1** the MS/MS spectrum of the mono grafted species ( $m/z$  1469.63) is shown. The average DS value was calculated using the following equation:  $\overline{\text{DS}} = \sum_i \text{DS}_i \times I_i / \sum_i I_i$

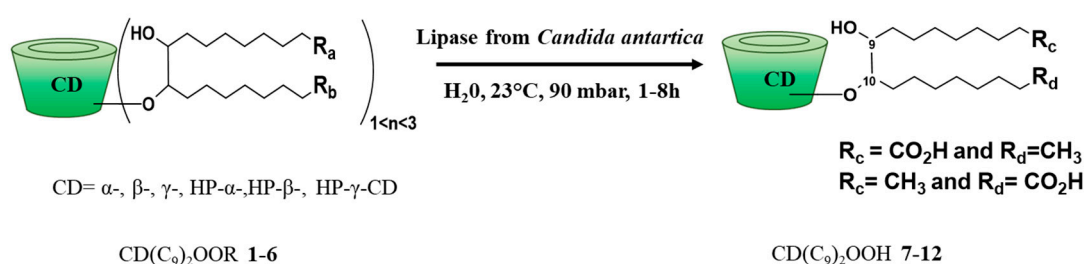
In order to obtain a family of  $\text{CD}(\text{C}_9)_2\text{OOME}$ , the ball milling protocol optimized for the native  $\beta$ -CD was transposed to the main derivatives of commercial  $\beta$ -CD: RAMEB and HP- $\beta$ -CD, previously lyophilized. With RAMEB, the expected reaction did not occur while HP- $\beta$ -CD gave the desired product **5** with 35% yield and an average DS of 1.3 (SI, Figure S16). This difference in reactivity can be explained, on the one hand, by the presence of hydroxyl groups of the hydroxypropyl substituents of HP- $\beta$ -CD as reactive, or even more accessible, than the hydroxyl groups of the glucoses composing the  $\beta$ -CD. On the other hand, in the case of RAMEB, the substitution of hydroxyl groups by methyl groups reduces the accessibility of those remaining, making this CD less reactive compared to native  $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD. We successfully transposed this optimized reaction and purification conditions to the native  $\alpha$ -CD and  $\gamma$ -CD as well as the HP- $\alpha$ -CD and HP- $\gamma$ -CD derivatives to obtain the L-CDs family. All the results obtained are presented in Table 1.

**Table 1.** CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME derivatives 1–6 obtained by ball milling (the experimental conditions are depicted Scheme 2).

CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME	$\overline{DS}$ (ESI) <sup>+</sup>	$\overline{DS}$ (ESI) <sup>-</sup>	MW <sub>a</sub> g.mol <sup>-1</sup>	Yield %
β-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME 1	1.4	1.3	1577.3	55%
α-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME 2	1.3	1.2	1378.2	28%
γ-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME 3	1.3	1.2	1712.5	33%
HP-α-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME 4	1.2	1.1	1571.7	33%
HP-β-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME 5	1.3	1.3	1892.5	35%
HP-γ-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOME 6	1.2	1.2	2031.9	44%

The  $\overline{DS}$  calculated from ESI<sup>-</sup>-MS are also presented, and are in agreement with the  $\overline{DS}$  obtained with ESI<sup>+</sup>-MS. Thus, we obtained six bicyclic compounds that differ by the nature of the CD used but with homogeneous average  $\overline{DS}$  between 1.1 and 1.4, according to the positive or negative ionization mode of the ESI-MS analyses. The yields obtained range from 28 to 55% after purification, which remains satisfactory for modified CDs obtained in a single step. It should be noted that better results are observed with the β-CD, probably because of a greater affinity between this CD and the oleate epoxide. This, combined with reasonable reaction times (5 × 1 h) and with the absence of solvent, allowed the compounds to be obtained on a gram scale in the laboratory. This easy access as well as effective purification conditions allow an evaluation of their properties. In order to better understand the reaction, methyl α-D-glucopyranoside, considered as a unit constituting CDs, has been used as the raw material. However, in the same experimental conditions, we obtained a pasty and sticky medium that inhibited the reaction. The addition of SiO<sub>2</sub> as a milling aid [37] did not lead to the opening reaction of methyl oleate epoxide despite several tests. These results seem to be in agreement with an interaction of the fatty chain with the CDs in solid phase, promoting the opening of the epoxide by the latter.

Finally, the enzymatic hydrolysis on the terminal ester of the CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME fatty chain was carried out with immobilized lipase from *Candida antarctica* to produce the corresponding CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH (7–12) with very good yield at 100 mg scale (Scheme 3, Table 2). The products were isolated by simple filtration of the immobilized lipase followed by freeze-drying to obtain the derivative CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH.

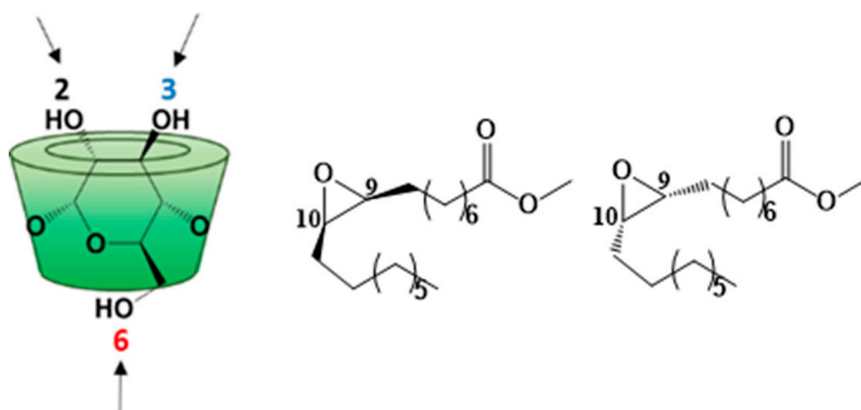
**Scheme 3.** Enzymatic hydrolysis reaction.**Table 2.** CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH derivatives 7–12 obtained by enzymatic hydrolysis (the experimental conditions are depicted on Scheme 3).

CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH	Time (h)	MW <sub>a</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	Yield
α-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH 7	4.5	1271.0	78%
β-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH 8	8	1433.0	69%
γ-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH 9	1.5	1595.0	89%
HP-α-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH 10	2	1499.5	82%
HP-β-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH 11	2	1736.3	84%
HP-γ-CD(C <sub>9</sub> ) <sub>2</sub> OOH 12	1	1887.3	89%

As an illustration, the total conversion of  $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME by the enzymatic hydrolysis reaction was evidenced by its ESI<sup>+</sup>-MS spectrum (Figure 1). Only the compound of DS = 1 was recovered. In addition, <sup>13</sup>C NMR analysis of  $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH **8** allowed us to detect the disappearance of methyl ester signals (51.7 ppm methyl signal and 174.4 ppm terminal ester carbonyl signal) and the presence of 176.5 ppm acid group carbonyl signal (SI, Figure S17). The enzymatic hydrolysis reaction was faster for some derivatives, such as  $\gamma$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME **3** and HP-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME **4–6**. As for  $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH **8**, all CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH derivatives had only one grafted substituent probably because of the experimental isolation conditions since the final filtration in water favored the most hydrophilic compounds.

### 3.2. Characterization

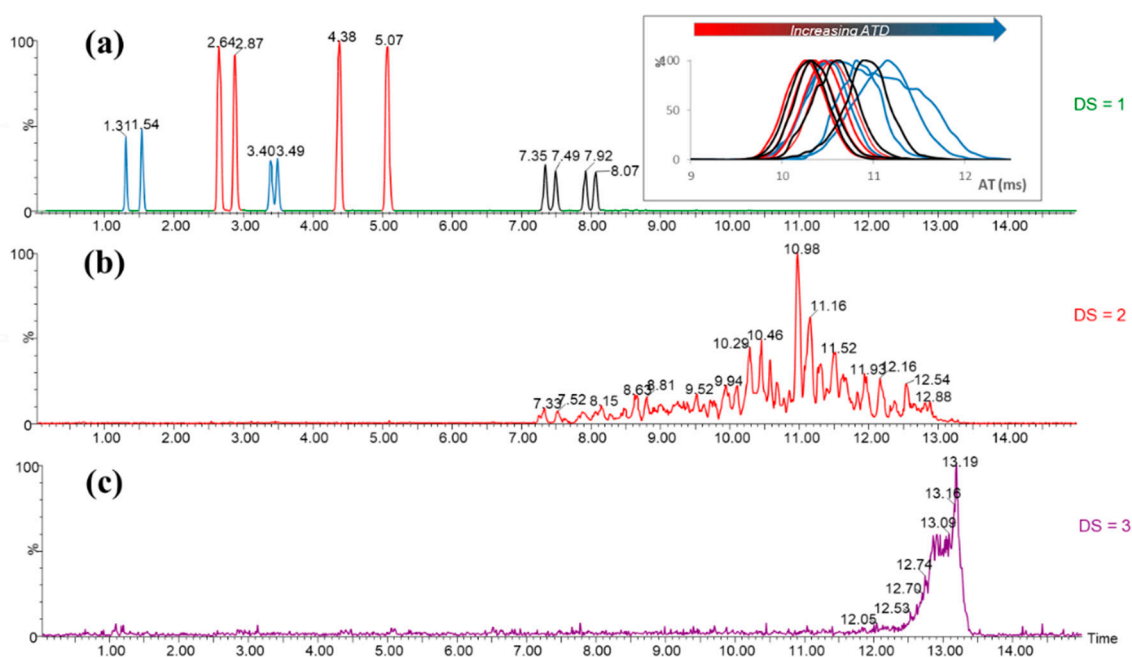
The methylated L-CD derivatives **1–6** are made up of CDs carrying between 1 to 3 fatty chains (Figure 1), each of these components may have several isomers. The objective of this part is to carry out a further characterization of these complex mixtures in order to highlight the presence of isomers because of a potential regioselectivity and/or stereoselectivity of the epoxide opening reaction. Indeed, this reaction could involve the different hydroxyl groups of the CDs (2, 3, and 6) as well as the carbon C<sub>9</sub> and C<sub>10</sub> of the epoxide (Scheme 4).



**Scheme 4.** Structures of cyclodextrins (CDs) and methyl oleate epoxide.

To illustrate the structural characterization of these compounds, we focused on the  $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME derivative **1** as an example to describe our multi-technique approach. First, 1D and 2D NMR experiments were implemented. However, the <sup>1</sup>H NMR spectra proved to be extremely complicated because of a significant overlap in the frequencies of the proton signals because of the loss of symmetry of the CD cavity and its variable substitution rate. Similarly, <sup>13</sup>C NMR spectra have many carbon signals whose chemical shifts are too similar, making it difficult to fully attribute them (SI, Figure S18). Only 2D experiments (COSY, HSQC, and HMBC) allowed a partial assignment (SI, Figure S19). This mixture was then analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS) using a C<sub>8</sub> column for the separation. The extracted ion chromatograms (EICs) corresponding to [M + Na]<sup>+</sup> ions of DS = 1 (*m/z* 1469.63), DS = 2 (*m/z* 1781.89), and DS = 3 (*m/z* 2094.16) species are depicted in Figure 2. In the case of DS = 1, the 12 chromatographic peaks can be explained by the 12 isomers that can be formed during the epoxide opening reaction. They correspond to the respective contribution of the three OH groups of  $\beta$ -CD, the two carbon of epoxide ring and the two configurations available for this ring (Scheme 4 and SI, Figure S20). For DS = 2 and DS = 3 (Figure 2b,c), the significant increase in the number of possible isomers has led to more complex chromatograms with a separation reaching a limit with a broad peak observed for DS = 3.

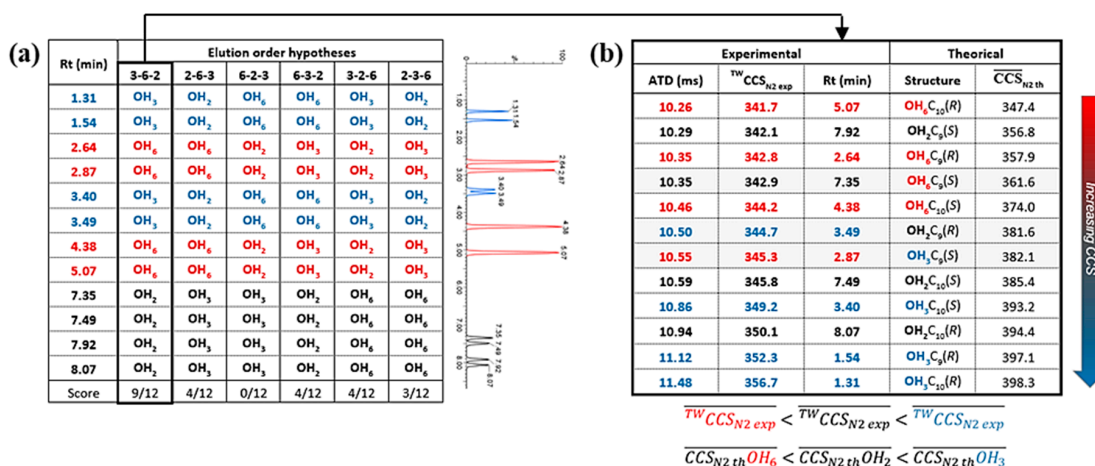




**Figure 2.**  $[M + Na]^+$  extracted ion chromatograms (EICs) of **1**: DS = 1  $m/z$  1469.63 (a), DS = 2  $m/z$  1781.89 (b), and DS = 3  $m/z$  2094.16 (c). For DS = 1, the arrival time distributions (ATDs) of the 12 isomers obtained using a travelling wave mobility cell (TWIMS) are presented.

In order to distinguish the 12 isomers of **1** DS = 1, a MS/MS acquisition was performed on each chromatographic peak. All the 12 precursor ions ( $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  1469.63) gave fragments with the same  $m/z$ . However, the comparison of their relative intensities has made it possible to form three groups which were assumed to be regioisomer groups (blue, red and black, Figure 2a and SI, Figure S21) without the possibility of OH position assignment. Thus MS/MS constitutes the first experiment discriminating isomers. The next step was to study the benefit of ion mobility (IMS, ion mobility spectrometry) to complete the structural characterization. IMS is an analytical technique that separates ions in the gas phase according to their size, shape, and charge. This technique hyphenated with a mass spectrometer (IMS-MS) allows the separation of isobaric compounds depending on their structure. Indeed, the arrival time distribution (ATD) of each ion crossing the mobility cell can be correlated to its collision cross section (CCS,  $\Omega$  in  $\text{\AA}^2$ ) which is an intrinsic physicochemical characteristic corresponding to the surface of interaction between the ion and the gas molecules ( $N_2$ ) filling the mobility cell [38]. First, the ATD of each isomer was recorded. The ion mobility spectrum [39] revealed a partial separation of the different isomers with the blue group being the most delayed (Figure 2a). The experimental CCS ( $^{TW}CCS_{N_2 \text{ exp}}$ ) of each species was deduced from the arrival time distributions (ATDs) by external calibration. Second, 3D structures of DS = 1 isomers were simulated with minimal internal energy and their theoretical CCS ( $CCS_{N_2 \text{ th}}$ ) were predicted according to three methods: approximation projection (PA), exact hard spheres scattering (EHSS), and trajectory method with Lennard-Jones parameters (TMLJ) [40]. The comparison of their  $CCS_{N_2 \text{ th}}$  increasing ranking with the  $^{TW}CCS_{N_2 \text{ exp}}$  made it possible to propose a regioisomer assignment according to the CD hydroxyl position involved in the reaction. Based on the results obtained on the one hand by LC/MS (elution of 12 isomers, Figure 2a) and on the other hand by MS/MS (3 distinct groups of 4 isomers each, Figure 2a and Figure S21), a set of six different hypotheses of elution order was obtained corresponding to the six columns of Figure 3a. For each column, we proposed a correlation between the predicted assignment of OH<sub>2</sub>, OH<sub>3</sub>, and OH<sub>6</sub> and the experimental vs. theoretical CCS ( $^{TW}CCS_{N_2 \text{ exp}}$  vs.  $CCS_{N_2 \text{ th}}$ ), which led to a score (equivalent to the number of positive matches). The best correlation (9/12) was obtained for the elution order 3-6-2 (Figure 3b) and corresponds to the following hypothesis: OH<sub>3</sub> (blue group), OH<sub>6</sub> (red group), and

OH<sub>2</sub> (black group). The assignment of the most intense peaks (red) to OH<sub>6</sub> position is in agreement with a greater reactivity of primary OH in our conditions. Moreover, the IMS attribution of the OH<sub>2</sub> position, the only glucopyranose hydroxyl group oriented toward the inside of the CD cavity, seems to be in agreement with its MS/MS profile which was found to be very different from those of the other OH positions (SI, Figure S21). In particular, lower relative intensities of the fragment ions at  $m/z < 600$  have been observed for the OH<sub>2</sub> (black group), indicating a probable higher stability of the L-CD structure in this case. This innovative approach seems to be a promising tool to elucidate complex isomer mixtures such as cyclodextrin derivatives.



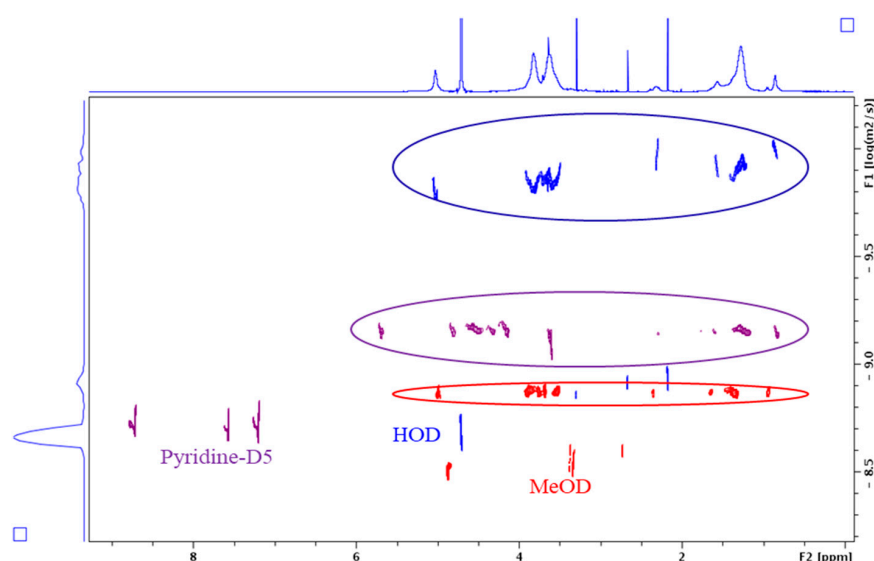
**Figure 3.** (a) Assignment hypotheses of the  $\beta$ -CD hydroxyl groups (OH<sub>2</sub>, OH<sub>3</sub>, and OH<sub>6</sub>) involved in the epoxide opening reaction according to LC/MS elution and MS/MS groups. (b) Comparison of the increasing ranking of  $CCS_{N2\ th}$  with those of  $^{TW}CCS_{N2\ exp}$  in the case of assignment hypothesis (3-6-2). The highlighted grey lines correspond to the three negative matches between expected OH assignment hypothesis and CCS prediction, leading to a score of 9/12.

Similarly, L-CDs synthesized from  $\alpha$ -CD and  $\gamma$ -CD were analyzed by LC/MS and the presence of 12 isomers for DS = 1 species was also observed (SI, Figure S22). It should be pointed out that after enzymatic hydrolysis, the saponified DS = 1 compounds kept the same number of isomers than the esterified ones (SI, Figure S23).

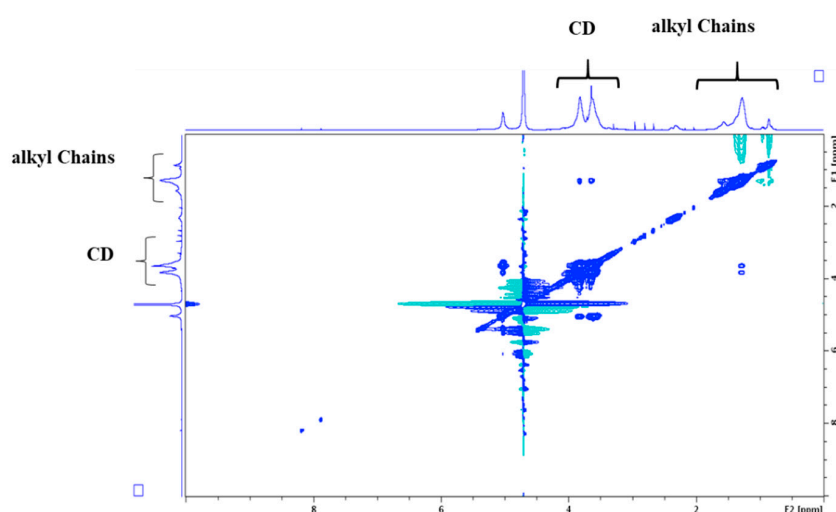
### 3.3. Self-Organization Properties

Samples of **1** were analyzed by DOSY in different solvents, deuterium oxide, MeOD, and pyridine-d<sub>5</sub> (Figure 4). This two-dimensional NMR experiment can discriminate molecules or objects according to their diffusion coefficient D directly linked to the translational motion of molecules in solution and whose value depends on the size of the object [41]. The bigger the molecule or object is, smaller the D value will be. It should be noted that the D value of **1** varies with the solvent, and water gives the lowest value with  $D = 1.65 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , compared to  $D = 7.23 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  and  $1.34 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  in pyridine-d<sub>5</sub> and MeOD, respectively. This could suggest a potential phenomenon of aggregation of  $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOMe **1** in aqueous medium.

In order to study the dipolar interactions between protons of the CD cavity and those of the fatty chains, a T-ROESY NMR experiment was performed on  $\beta$ -CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOMe **1** in D<sub>2</sub>O (Figure 5) [42]. Strong cross-correlation peaks between alkyl protons and protons of CD moiety have been observed revealing interactions of the grafted chains with the CD cavity. Two types of interactions can explain this result: an intramolecular interaction between a fatty chain and the cavity of its own CD (self-inclusion) or an intermolecular interaction between a chain and the cavity of another CD. The latter is more compatible with the observed self-aggregation phenomenon.



**Figure 4.** Overlapping DOSY maps obtained for **1** in D<sub>2</sub>O (blue spots), pyridine-D<sub>5</sub> (purple spots), and MeOD (red spots) (12 mM, 600 MHz, 298 K).



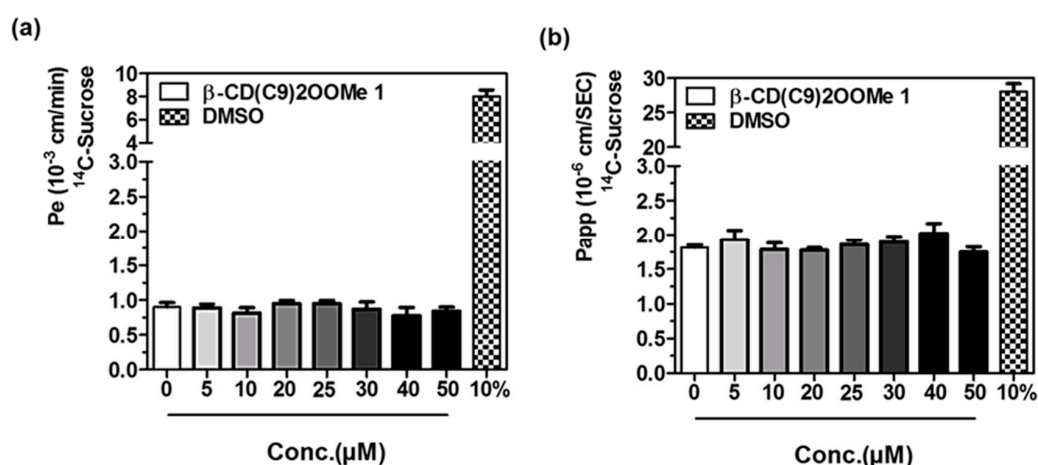
**Figure 5.** Partial contour plot of a T-ROESY experiment (spin lock: 300 ms, 22 dB) performed at 600 MHz on **1** at 12 mM in D<sub>2</sub>O.

In addition, the self-assembling properties of **1** were evaluated by DLS in D<sub>2</sub>O. For this purpose, nanoparticles were prepared according to a method based on the hydration of a lipid film [43]. In summary, **1** was solubilized in methanol, then the solvent was evaporated under nitrogen stream to obtain a film, dried under vacuum. The water was added, and the sample was sonicated. DLS analysis of a 25  $\mu$ M solution of **1** confirmed the presence of nanoparticles with an average hydrodynamic diameter of 145 nm (PDI = 11%). Its CAC value was also estimated between 5 and 8  $\mu$ M by the DLS using a series of samples with concentrations ranging from 0.5  $\mu$ M to 20  $\mu$ M while its solubility in water is assessed at 12 mM.

### 3.4. Preliminary Studies for L-CD Vectorization Potential Use of In Vitro Blood-Brain and Intestinal Barriers Models

As part of their use as vectors of active ingredients, selected lipidyl cyclodextrins effect on barrier integrity was then assessed using the two human in vitro models of physiological barriers, i.e., intestinal

and blood-brain barriers were widely used to investigate molecules and xenobiotics toxicities and permeabilities [24,44,45]. Permeability of small integrity marker,  $^{14}\text{C}$ -sucrose, across the monolayer of cells was measured in the presence of 5, 10, 20, 25, 30, 40, and 50  $\mu\text{M}$  of cyclodextrin or 10% DMSO used as positive control of biological barrier disruptions. As shown in Figure 6, permeabilities of  $^{14}\text{C}$ -sucrose are not increased by the different tested concentrations of L-CD **1** suggesting that this molecule does not show any deleterious effect on these barriers. Indeed, in the tested conditions,  $\beta\text{-CD}(\text{C}_9)_2\text{OOME 1}$  does not alter the integrity of the BBB ( $\text{Pe} < 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min}$ ) or the intestinal barrier ( $\text{Papp} < 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ). Note that the same studies performed on the  $\gamma\text{-CD}$  analog **3** also demonstrated the absence of toxicity (Figure S24). Interestingly, these results open access to deeper biological research to evaluate their vectorization potential.



**Figure 6.**  $^{14}\text{C}$ -Sucrose permeability (Pe) and apparent permeability (Papp) assessment in two in vitro models treated with different concentrations of **1**. DMSO 10% was used as the positive control of biological barrier disruptions. Bars represent the mean of six filters + standard error of the mean. (a) represents the Pe of  $^{14}\text{C}$ -Sucrose in the brain-like endothelial cells (BLECs) model and (b) represents the Papp of  $^{14}\text{C}$ -sucrose in the intestinal Caco-2 model.

#### 4. Conclusions

New L-CDs derivatives were synthesized using a fatty ester epoxide by means of alternative methods (solvent-free techniques, use of enzymes). The ring opening of methyl oleate epoxide using ball milling led to easy preparation of bicatenary amphiphilic CDs of low DS. Furthermore, enzymatic hydrolysis of the terminal ester gave the corresponding carboxylic acid analogs with very good yields and allowing a modulation of the hydrophilicity of the compounds. In our conditions, the coupled reactions were carried out on the main free CDs ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs) or on the hydroxypropylated analogues. We are planning to evaluate other derivatives in subsequent studies as well. Despite the low and controlled DS, the final products were obtained in the form of complex mixtures requiring an extensive structural analysis using mainly mass spectrometry and NMR spectroscopy. The powerful IMS-MS technique has been demonstrated in this work to be an effective tool for a better understanding of complex isomer mixtures. Indeed, it was possible to accurately assign the CD hydroxyl position (2, 3, 6) involved in the epoxide opening reaction which was not directly possible only based on the relative intensity differences observed on the MS / MS spectra. These preliminary IMS-MS data also opened access to additional structural information concerning the regioselectivity and stereoselectivity of the epoxide carbon atoms ( $\text{C}_9$ ,  $\text{C}_{10}$ ). In order to validate this approach, further investigations are currently underway.

The self-assembling properties of **1** were evaluated in the  $\text{D}_2\text{O}$  showing the presence of stable nanoparticles related to a low CAC value. In addition, as part of their use as vectors of active ingredients, these products were submitted to an integrity study on an in vitro model of the blood-brain-barrier (i.e.,

the BLEC model) and the intestinal epithelium (Caco-2 model). No toxicity has been demonstrated, suggesting that applications for the vectorization of active ingredients or drugs can be expected.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/10/2/339/s1>. Figure S1: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b) and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 1. Figure S2: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of α-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 2. Figure S3: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of γ-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 3. Figure S4: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of HP-α-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 4. Figure S5: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of HP-β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 5. Figure S6: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of HP-γ-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 6. Figure S7: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of α-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH 7. Figure S8: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH 8. Figure S9: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of γ-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH 9. Figure S10: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of HP-α-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH 10. Figure S11: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of HP-β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH 11. Figure S12: ESI<sup>+</sup>-HRMS (a), <sup>1</sup>H NMR (b), and <sup>13</sup>C NMR spectra (c) of HP-γ-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOH 12. Figure S13: <sup>1</sup>H NMR spectra of methyl oleate (a) and of epoxidated methyl oleate (b). Figure S14: ESI<sup>+</sup>-MS spectrum of the ball milling reaction medium of the methyl oleate epoxide opening with the β-CD assisted by APTS. Figure S15: ESI<sup>+</sup>-MS/MS spectra of the [M + Na]<sup>+</sup> ions of DS = 2 (a) and DS = 3 (b) species of β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 1 obtained from ball milling. Figure S16: ESI<sup>+</sup>-MS spectrum of the of HP-β-CD(C<sub>9</sub>)<sub>2</sub>OOME 5 obtained from ball milling, showing mono (green), di (red), and tri (blue) grafted species. Figure S17: <sup>13</sup>C NMR spectra of 8 (a) and of 1 (b). Figure S18: <sup>13</sup>C NMR spectra of methyl oleate epoxide (a), 1 (b), and native β-CD (c). Figure S19: 2D NMR spectra of 1: HSQC (a), COSY (b), and HMBC (c) (600 MHz, pyridine-D<sub>5</sub>, 298 K). Figure S20: Opening reaction of epoxide by free cyclodextrin. Figure S21: ESI<sup>+</sup>-MS/MS (95 eV) spectra of the twelve DS = 1 isomers ([M + Na]<sup>+</sup> m/z 1469.63) of 1 allowing the distinction of three groups of regioisomers. Figure S22: [M – H]<sup>−</sup> reconstituted ion chromatograms of 2. Figure S23: [M – H]<sup>−</sup> reconstituted ion chromatograms of 7. Figure S24: 14C-Sucrose permeability (Pe) and apparent permeability (Papp) assessment in two in vitro models treated with different concentrations of 3.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.M., S.T., S.P., V.B., L.F., and F.D.-P.; methodology, E.O., D.M., S.R., H.B., and E.S.; software, S.R. and H.B.; validation, D.M., E.M., H.B., F.G., V.B., S.P., and F.D.-P.; formal analysis, E.O., S.R., E.S.; investigation, E.O., D.M., E.M., S.T., H.B., S.P., V.B., L.F., and F.D.-P.; resources, E.S., F.G., D.M., and V.B.; data curation, D.M., S.P., F.G., V.B., H.B., and F.D.-P.; writing—original draft preparation, E.O., D.M., S.R., H.B., S.T., F.G., L.F., S.P., and F.D.-P.; writing—review and editing, H.B., S.T., D.M., V.B., S.P., and F.D.-P.; visualization, E.O., S.R., H.B., and F.D.-P.; supervision, E.M., S.T., F.G., F.L., S.P., and F.D.-P.; project administration, S.T. and F.D.-P.; funding acquisition, F.D.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by SAS PIVERT, within the frame of the French Institute for the Energy Transition (Institut pour la Transition Énergétique (ITE) P.I.V.E.R.T. ([www.institut-pivert.com](http://www.institut-pivert.com)) selected as an Investment for the Future (“Investissements d’Avenir”). This work was supported, as part of the Investments for the Future, by the French Government under the reference ANR-001. The article processing charge was supported by “Université de Picardie Jules Verne”.

**Acknowledgments:** Aurélien Furlan is acknowledged for DLS analysis and technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- Brewster, M.E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 645–666.
- Choisnard, L.; Gèze, A.; Putaux, J.L.; Wong, Y.S.; Wouessidjewe, D. Nanoparticles of β-Cyclodextrin Esters Obtained by Self-Assembling of Biotransesterified β-Cyclodextrins. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 515–520.
- Bonnet, V.; Gervaise, C.; Djedaïni-Pilard, F.; Furlan, A.; Sarazin, C. Cyclodextrin nanoassemblies: A promising tool for drug delivery. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1120–1126. [[CrossRef](#)]
- Moutard, S.; Perly, B.; Godé, P.; Demailly, G.; Djedaïni-Pilard, F. Novel glycolipids based on cyclodextrins. *J. Incl. Phenom.* **2002**, *44*, 317–322.
- Gervaise, C.; Bonnet, V.; Wattraint, O.; Aubry, F.; Sarazin, C.; Jaffrès, P.A.; Djedaïni-Pilard, F. Synthesis of lipophosphoramidyl-cyclodextrins and their supramolecular properties. *Biochimie* **2012**, *94*, 66–74.
- Roux, M.; Bonnet, V.; Djedaïni-Pilard, F. Ordering of Saturated and Unsaturated Lipid Membranes near Their Phase Transitions Induced by an Amphiphilic Cyclodextrin and Cholesterol. *Langmuir* **2019**, *35*, 14376–14387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cravotto, G.; Nano, G.M.; Palmisano, G. A Sonochemical Protocol for the Synthesis of a Sonochemical Protocol for the Synthesis of Permodified. *Synthesis* **2001**, *20*, 37–41.



9. Trotta, F.; Martina, K.; Robaldo, B.; Barge, A.; Cravotto, G. Recent advances in the synthesis of cyclodextrin derivatives under microwaves and power ultrasound. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 3–7.
10. Martina, K.; Cravotto, G.; Caporaso, M.; Rinaldi, L.; Villalonga-Barber, C.; Ermondi, G. Efficient microwave-assisted synthetic protocols and in silico behaviour prediction of per-substituted  $\beta$ -cyclodextrins. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5521–5527.
11. Kotková, Z.; Kotek, J.; Jirák, D.; Jendelová, P.; Herynek, V.; Berková, Z.; Hermann, P.; Lukeš, I. Cyclodextrin-Based Bimodal Fluorescence/MRI Contrast Agents: An Efficient Approach to Cellular Imaging. *Chemistry* **2010**, *16*, 10094–10102.
12. Cravotto, G.; Caporaso, M.; Jicsinszky, L.; Martina, K. Enabling technologies and green processes in cyclodextrin chemistry. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 278–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jicsinszky, L.; Caporaso, M.; Martina, K.; Gaudino, E.C.; Cravotto, G. Efficient mechanochemical synthesis of regioselective persubstituted cyclodextrins. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2364–2371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Jicsinszky, L.; Calsolaro, F.; Martina, K.; Buccioli, F.; Manzoli, M.; Cravotto, G. Reaction of oxiranes with cyclodextrins under high-energy ball-milling conditions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 1448–1459. [[CrossRef](#)]
15. Manuel, S.; Doumert, B.; Saitzek, S.; Ponchel, A.; Delevoye, L.; Monflier, E.; Hapiot, F. Selective Secondary Face Modification of Cyclodextrins by Mechanochemistry. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6259–6266. [[CrossRef](#)]
16. Peptu, C.; Balan-Porcarasu, M.; Šišková, A.; Škultéty, L.; Mosnáček, J. Cyclodextrins tethered with oligolactides—Green synthesis and structural assessment. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 779–792. [[CrossRef](#)]
17. Moutard, S.; Djedaïni-Pilard, F.; Meudal, S.; Luijten, W.; Perly, B.; Pilard, S. Structural identification of new glycolipids based on cyclodextrin using high-resolution positive and negative electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2535–2540. [[CrossRef](#)]
18. Kieken, F.; West, C.; Keddadouche, K.; Elfakir, C.; Choïnard, L.; Gèze, A.; Wouessidjewe, D. Characterisation of complex amphiphilic cyclodextrin mixtures by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 385–391. [[CrossRef](#)]
19. Chizhov, A.O.; Tsvetkov, Y.E.; Nifantiev, N.E. Gas-Phase Fragmentation of Cyclic Oligosaccharides in Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* **2019**, *24*, 2226. [[CrossRef](#)]
20. Mu, Y.; Schulz, B.L.; Ferro, V. Applications of Ion Mobility-Mass Spectrometry in Carbohydrate Chemistry and Glycobiology. *Molecules* **2018**, *23*, 2557. [[CrossRef](#)]
21. Epoune Lingome, C.; Gadenne, B.; Alfos, C.; Queneau, Y.; Moebs-Sanchez, S. Ring opening of epoxidized methyl or ethyl oleate by alkyl glycosides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2017**, *1600413*, 1600413. [[CrossRef](#)]
22. Pedroso, D.C.S.; Tellechea, A.; Moura, L.; Fidalgo-Carvalho, I.; Duarte, J.; Carvalho, E.; Ferreira, L. Improved Survival, Vascular Differentiation and Wound Healing Potential of Stem Cells Co-Cultured with Endothelial Cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16114. [[CrossRef](#)]
23. Cecchelli, R.; Aday, S.; Sevin, E.; Almeida, C.; Culot, M.; Dehouck, L.; Coisne, C.; Engelhardt, B.; Dehouck, M.P.; Ferreira, L. A Stable and Reproducible Human Blood-Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sevin, E.; Dehouck, L.; Fabulas-da Costa, A.; Cecchelli, R.; Dehouck, M.P.; Lundquist, S.; Culot, M. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2013**, *68*, 334–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dehouck, M.P.; Jolliet-Riant, P.; Brée, F.; Fruchart, J.C.; Cecchelli, R.; Tillement, J.P. Drug transfer across the blood-brain barrier: Correlation between in vitro and in vivo models. *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 1790–1797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pitha, J.; Trinadha Rao, C.; Lindberg, B.; Seffers, P. Distribution of substituents in 2-hydroxypropyl ethers of cyclomaltoheptaose. *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 429–435. [[CrossRef](#)]
27. Topchieva, I.N.; Mischnick, P.; Ku, G.; Polyakov, V.A.; Elezkaya, S.V.; Bystryzky, G.I.; Karezin, K.I. Novel Derivatives of Cyclodextrins, Modified with Poly (ethylene Oxide) and Their Complexation Properties. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Renard, E.; Deratani, A.; Volet, G.; Sebillé, B. Preparation and characterization of water soluble high molecular weight  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Eur. Polym. J.* **1997**, *33*, 49–57. [[CrossRef](#)]

29. Manta, C.; Peralta-Altier, G.; Gioia, L.; Méndez, M.F.; Seoane, G.; Ovsejevi, K. Synthesis of a thiol- $\beta$ -cyclodextrin, a potential agent for controlling enzymatic browning in fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11603–11609. [[CrossRef](#)]
30. Martina, K.; Caporaso, M.; Tagliapietra, S.; Heropoulos, G.; Rosati, O.; Cravotto, G. Synthesis of water-soluble multidentate aminoalcohol  $\beta$ -cyclodextrin derivatives via epoxide opening. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2677–2682. [[CrossRef](#)]
31. Pierre, R.; Adam, I.; Fitremann, J.; Jérôme, F.; Bouchu, A.; Courtois, G.; Barrault, J.; Queneau, Y. Catalytic etherification of sucrose with 1,2-epoxydodecane: Investigation of homogeneous and heterogeneous catalysts. *C. R. Chim.* **2004**, *7*, 151–160. [[CrossRef](#)]
32. Villandier, N.; Adam, I.; Jérôme, F.; Barrault, J.; Pierre, R.; Bouchu, A.; Fitremann, J.; Queneau, Y. Selective synthesis of amphiphilic hydroxyalkylethers of disaccharides over solid basic catalysts. Influence of the superficial hydrophilic-lipophilic balance of the catalyst. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2006**, *259*, 67–77. [[CrossRef](#)]
33. Albarrán-Preza, E.; Corona-Becerril, D.; Viguera-Santiago, E.; Hernández-López, S. Sweet polymers: Synthesis and characterization of xylitol-based epoxidized linseed oil resins. *Eur. Polym. J.* **2016**, *75*, 539–551.
34. Ranu, B.; Stolle, A. Ball Milling Towards Green Synthesis: Applications, Projects, Challenges. *RSC Green Chem. Ser.* **2014**. [[CrossRef](#)]
35. Rodríguez, B.; Bruckmann, A.; Bolm, C. A highly efficient asymmetric organocatalytic aldol reaction in a ball mill. *Chem. A Eur. J.* **2007**, *13*, 4710–4722.
36. Gérard, E.M.C.; Sahin, H.; Encinas, A.; Bräse, S. Systematic study of a solvent-free mechanochemically induced domino oxa-Michael-aldol reaction in a ball mill. *Synlett* **2008**, *17*, 2702–2704.
37. Lingome, C.E.; Pourceau, G.; Gobert-Deveaux, V.; Wadouachi, A. Efficient synthesis of glycosylamines in solventless conditions promoted by mechanical milling. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 36350–36356. [[CrossRef](#)]
38. Lanucara, F.; Holman, S.W.; Gray, C.J.; Evers, C.E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 281–294. [[CrossRef](#)]
39. Gabelica, V.; Shvartsburg, A.A.; Afonso, C.; Barran, P.; Benesch, J.L.P.; Bleiholder, C.; Bowers, M.T.; Bilbao, A.; Bush, M.F.; Campbell, J.L.; et al. Recommendations for reporting ion mobility Mass Spectrometry measurements. *Mass Spectrom. Rev.* **2019**, *38*, 291–320. [[CrossRef](#)]
40. Reading, E.; Munoz-Muriedas, J.; Roberts, A.D.; Dear, G.J.; Robinson, C.V.; Beaumont, C. Elucidation of Drug Metabolite Structural Isomers Using Molecular Modeling Coupled with Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 2273–2280. [[CrossRef](#)]
41. Mathiron, D.; Lori, R.; Pilard, S.; Soundara Rajan, T.; Landy, D.; Mazzon, E.; Rollin, P.; Djedaïni-Pilard, F. A Combined Approach of NMR and Mass Spectrometry Techniques Applied to the  $\alpha$ -Cyclodextrin/Moringin Complex for a Novel Bioactive Formulation. *Molecules* **2018**, *23*, 1714. [[CrossRef](#)]
42. Oliva, E.; Mathiron, D.; Bertaut, E.; Landy, D.; Cailleu, D.; Pilard, S.; Clément, C.; Courot, E.; Bonnet, V.; Djedaïni-Pilard, F. Physico-chemical studies of resveratrol, methyl-jasmonate and cyclodextrin interactions: An approach to resveratrol bioproduction optimization. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 1528–1538. [[CrossRef](#)]
43. Furlan, A.L.; Buchoux, S.; Miao, Y.; Banchet, V.; Létévé, M.; Lambertyn, V.; Michel, J.; Sarazin, C.; Bonnet, V. Nanoparticles based on lipidyl- $\beta$ -cyclodextrins: Synthesis, characterization, and experimental and computational biophysical studies for encapsulation of atazanavir. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 20171–20179. [[CrossRef](#)]
44. Ravid, O.; Elhaik Goldman, S.; Macheto, D.; Bresler, Y.; De Oliveira, R.I.; Liraz-Zaltsman, S.; Gosselet, F.; Dehouck, L.; Beeri, M.S.; Cooper, I. Blood-Brain Barrier Cellular Responses Toward Organophosphates: Natural Compensatory Processes and Exogenous Interventions to Rescue Barrier Properties. *Front. Cell Neurosci.* **2018**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jähne, E.A.; Eigenmann, D.E.; Sampath, C.; Butterweck, V.; Culot, M.; Cecchelli, R.; Gosselet, F.; Walter, F.R.; Deli, M.A.; Smieško, M.; et al. Pharmacokinetics and In Vitro Blood-Brain Barrier Screening of the Plant-Derived Alkaloid Tryptanthrin. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1021–1030.



## Annexe 3

*Rigaud, S.; Dosso, A.; Lesur, D.; Cailleu, D.; Mathiron, D.; Pilard, S.; Cézard, C.; Djedaini-Pilard, F. Mass Spectrometry, Ion Mobility Separation and Molecular Modelling: a powerful combination for the Structural Characterization of Substituted Cyclodextrins Mixtures. International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 13352, <https://doi.org/10.3390/ijms232113352>.







Article

# Mass Spectrometry, Ion Mobility Separation and Molecular Modelling: A Powerful Combination for the Structural Characterisation of Substituted Cyclodextrins Mixtures

Sébastien Rigaud <sup>1</sup>, Abdouramane Dosso <sup>1,†</sup>, David Lesur <sup>1</sup>, Dominique Cailleu <sup>2</sup>, David Mathiron <sup>2</sup>, Serge Pilard <sup>2</sup>, Christine Cézard <sup>1</sup> and Florence Djedaini-Pilard <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Glycochimie des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Institut de Chimie de Picardie, FR CNRS 3085, F-80039 Amiens, France

<sup>2</sup> Plateforme-Analytique, Institut de Chimie de Picardie, FR CNRS 3085, Université de Picardie Jules Verne, F-80039 Amiens, France

\* Correspondence: florence.pilard@u-picardie.fr

† Present address: URB ABI, AgroParisTech, 3 rue des Rouges Terres, F-51110 Pomacle, France.

**Abstract:** When working on the synthesis of substituted cyclodextrins (CDs), the main challenge remains the analysis of the reaction media content. Our objective in this study was to fully characterise a complex isomers mixture of Lipidyl- $\beta$ CDs (Lip $\beta$ CD) obtained with a degree of substitution 1 (DS = 1) from a one-step synthesis pathway. The benefit of tandem mass spectrometry (MS/MS) and ion mobility separation hyphenated with mass spectrometry (IM-MS) was investigated. The MS/MS fragment ion's relative intensities were analysed by principal component analysis (PCA) to discriminate isomers. The arrival time distribution (ATD) of each isomer was recorded using a travelling wave ion mobility (TWIM) cell allowing the determination of their respective experimental collision cross section ( $CCS_{exp}$ ). The comparison with the predicted theoretical CCS ( $CCS_{th}$ ) obtained from theoretical calculations propose a regioisomer assignment according to the  $\beta$ CD hydroxyl position (2, 3, or 6) involved in the reaction. These results were validated by extensive NMR structural analyses of pure isomers combined with molecular dynamics simulations. This innovative approach seems to be a promising tool to elucidate complex isomer mixtures such as substituted cyclodextrin derivatives.

**Keywords:** cyclodextrin isomers; MS/MS; IM-MS; NMR; molecular dynamics



**Citation:** Rigaud, S.; Dosso, A.; Lesur, D.; Cailleu, D.; Mathiron, D.; Pilard, S.; Cézard, C.; Djedaini-Pilard, F. Mass Spectrometry, Ion Mobility Separation and Molecular Modelling: A Powerful Combination for the Structural Characterisation of Substituted Cyclodextrins Mixtures. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13352. <https://doi.org/10.3390/ijms232113352>

Academic Editors: Antonino Mazzaglia, Lajos Szente and Francesco Trotta

Received: 30 September 2022

Accepted: 26 October 2022

Published: 1 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

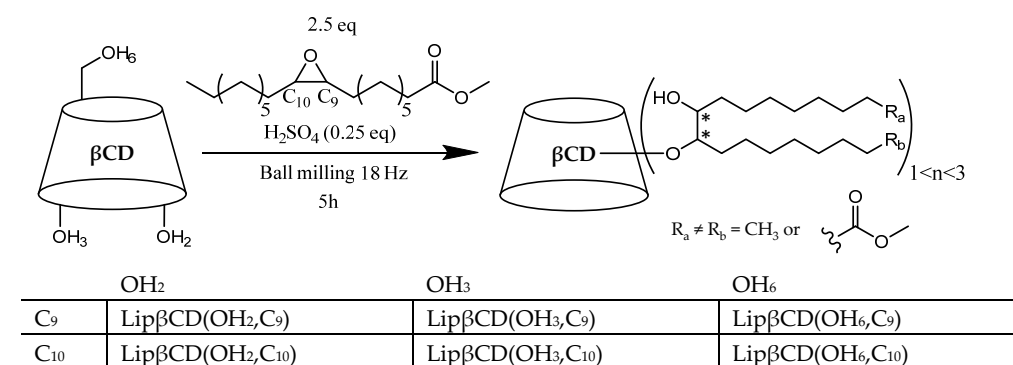
## 1. Introduction

Discovered 130 years ago, cyclodextrins (CDs), cyclic oligosaccharides produced by enzymatic degradation of starch, are the most popular macrocyclic molecules. Their inclusion properties associated with their biocompatibility and aqueous solubility have provided them an important impact in many applications fields such as the cosmetic, hygiene, food processing, chemical and pharmaceutical industries or agriculture [1,2]. To improve or to switch their properties, chemical modifications of their different hydroxyl groups were extensively described [3–5]. To obtain modified cyclodextrins, two main strategies are available: the first is a regioselective synthesis leading to pure and well-defined cyclodextrin derivatives. Many examples are reported, such as hetero-difunctionalised  $\beta$ -cyclodextrin derivatives [6] or cyclodextrin-based functional glyconanomaterials [7]. Recently, we have proposed an optimised and convergent chemical synthesis of lipophosphoramidyl permethylated  $\beta$ CDs (Lipidyl- $\beta$ CDs) with various chain lengths [8]. These amphiphilic cyclodextrin derivatives were used successfully to prepare mixed vesicles, but their synthesis requires eight steps and two steps of purification. Probably, the most remarkable example, though it is not so easy to achieve, is the elegant multi-steps synthesis of regioselective multi-hetero-functionalization of CDs described by Sollogoub et al. [9]. This strategy allowed the first synthesis of precisely hetero-functionalised  $\beta$ CDs but required 21 steps with 0.6% overall yield starting from native  $\beta$ CD. This synthesis route is

too time-consuming and expensive, and it remains a challenging task that commonly leads to only a low-milligram level of the high-purity compound.

On the other hand, the second synthetic strategy is radically different: few or even one-step and no purification of the different isomers exhibiting various Degrees of Substitution (DS). It seems to be more direct, cheaper and faster. Most of the commercial modified cyclodextrins are obtained with this strategy, such as sulfobutyl-ether  $\beta$ CD (SBE $\beta$ CD), randomised methylated  $\beta$ CD (RAMEB) or hydroxypropylated  $\beta$ CD (HP $\beta$ CD). Many modified CDs are also described in the literature, overcoming protection and deprotection steps but leading to complex mixtures of diversely substituted CDs [10–12]. For their characterisation, some works focused on the development of liquid chromatography methods to separate mixtures of methylated [13,14] or sulphoalkyl-ether [15,16] derivatives but never access precisely to the structures of the numerous isomers of the same DS. Thus, efficient and rapid characterisation without purification of CD mixtures still remains a challenge since the properties and applications of such compounds are directly linked to the composition of the mixtures obtained.

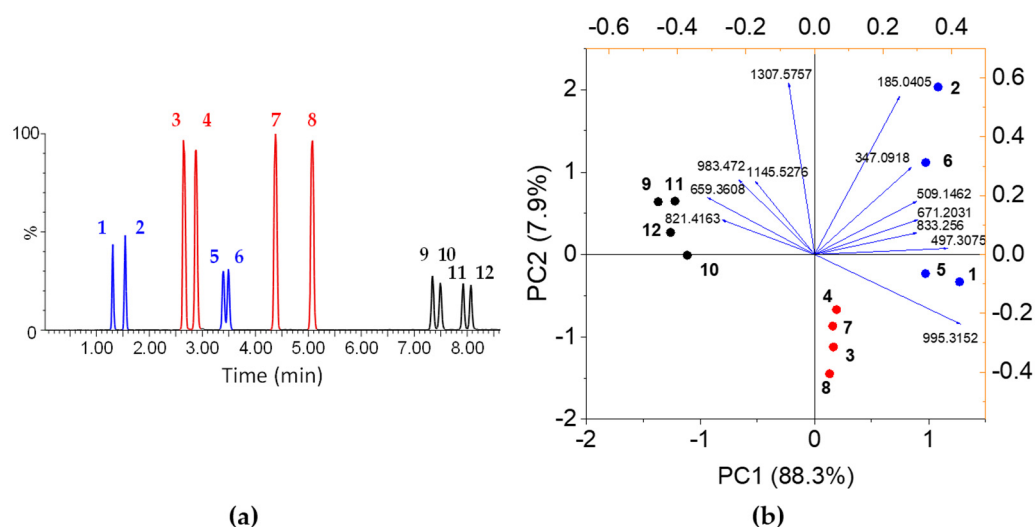
The main goal of this work is to describe and validate an analytical protocol for the characterisation of modified cyclodextrins directly from the crude reaction media. This study is the first attempt to develop a fast and efficient method of complex isomers mixture assignment that will avoid extensive purification and analysis of individual isomers. To set up our analytical workflow, we chose to investigate the DS = 1 isomers mixture obtained from the synthesis of bicatenary biobased lipidyl-cyclodextrins (Lip $\beta$ CD), easily achieved with “one-pot synthesis” from a fatty ester epoxide (Scheme 1) [17]. Following a UHPLC-HRMS (Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled to High-Resolution Mass Spectrometry) analysis, 12 isomers of DS = 1 were observed corresponding to the contribution of the three hydroxyls (OH<sub>2</sub>, OH<sub>3</sub> and OH<sub>6</sub>) of the  $\beta$ CD which can be involved in the reaction, the two positions of epoxide ring opening (C<sub>9</sub> and C<sub>10</sub>) and the two configurations (R and S) available for this ring (Scheme 1, Figure 1a). It should be noted that these 12 isomers were labelled on the chromatogram according to their elution order. Thus, this reaction, neither regioselective nor stereoselective, was used as a model.



**Scheme 1.** Chemical structure of 12 Lip $\beta$ CD derivatives bearing single lipidyl chain (DS = 1), each isomer named in the table is under racemic form (RR and SS).

Our strategy for rapid differentiation of these 12 isomers is based on the respective contribution of MS/MS, ion mobility mass spectrometry (IM-MS) and theoretical calculations. In recent years, IM-MS has proven to be a very promising technique to resolve isobaric ions that are indistinguishable by MS and MS/MS alone [18–20]. Indeed, IM-MS can separate isobaric gas-phase ions based on their conformation and shape and can measure the experimental collision cross section ( $CCS_{exp}$ ) of ions to provide information on their intrinsic structures. Furthermore, molecular dynamics techniques were used to explore the conformational space to point out differences between the isomers leading to theoretical collision cross section ( $CCS_{th}$ ). The comparison between  $CCS_{exp}$  and  $CCS_{th}$  datasets allowed us to assign the different isomers to the chromatographic peaks without purification. Finally, the validation of our attribution required a detailed structural NMR

analysis which not only confirmed the results obtained by IM-MS but also provided a better understanding of the structure–activity relationships of the different isomers.



**Figure 1.** (a) Extracted ion chromatogram (EIC) of  $[\text{Lip}\beta\text{CD} + \text{Na}]^+$  ( $m/z$  1469.626) obtained from UHPLC-HRMS separation of the 12 LipβCD isomers of DS = 1. It should be noted the 12 isomers are labelled by their elution order: 1, 2, 3 . . . 12 (b) PCA based on MS/MS fragment ions common to all isomers and built with their intensity.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Analytical Workflow for a Rapid Profiling of Cyclodextrins Isomers Mixture

#### 2.1.1. MS/MS Fingerprints Combined with Chemometrics

The detection of the 12 LipβCD isomers of DS = 1 by UHPLC-HRMS separation is depicted in Figure 1a. Firstly, MS/MS acquisitions were performed on their respective  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ions ( $m/z$  1469.6260) using the same collision energy (95 eV). No characteristic fragment of the grafting position was observed in the MS/MS spectra of the 12 isomers. Nevertheless, significant differences in fragment intensities were observed between the isomers (Figures S1 and S2). These intensities were used to build the principal component analysis (PCA), a common multivariate method [21]. Briefly, the main objectives of this approach in analytical chemistry include data reduction, grouping and classification of observations to obtain the modelling of relationships that may exist between variables. This approach allows highlighting, in an unsupervised way, the differences and similarities between the samples, corresponding here to the 12 isomers.

As observed in Figure 1b, this PCA separates the 12 isomers into three groups (black, blue and red), and 88.3% of the variance is explained by this separation on the first component (PC1), confirming the trend of the UHPLC-HRMS chromatogram where three blocks of four peaks seem to be identified according to their polarities and intensities. Regarding the reaction possibilities, these groups could correspond to the three possible grafting positions ( $\text{OH}_2$ ,  $\text{OH}_3$  or  $\text{OH}_6$ ) on the βCD. The loadings (i.e., variables = fragments intensities) are also informative, as their placement is responsible for the sample's location on the PCA. The loadings corresponding to the fragment ions with the greatest excess mass (due to a large number of H atoms increasing the decimal part of the accurate mass), i.e., the fragments carrying the methyl oleate bicatenary chain, are more expressed in the black group than in the blue one. Conversely, the loadings corresponding to the fragments with the lowest mass excess, i.e., those that have lost the methyl oleate, are more expressed in the blue group than in the black one. According to PC1, the red group is located between the black and blue groups, indicating that carrying the methyl oleate bicatenary chain is not the differentiating criterion for this group. In contrast, the second component (PC2) separates the blue and black groups from the red one. The loadings here indicate that the fragments at  $m/z$  185.0426 ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}$ , a sodiated dehydrated glucose adduct) and  $m/z$  1307.5731

( $C_{55}H_{96}O_{33}Na$ , corresponding to the loss of one dehydrated glucose) seem to explain the difference of this red group compared to the other ones. Indeed, all the variable values in this group are in the middle of those of the black and blue groups, with the exception of these two variables whose values are lower than or equal to those of the other two groups (Figure S3). The involvement of only two variables in this differentiation, according to PC2 and the Pareto scaling, could provide the 7.9% of the variance explained by this component.

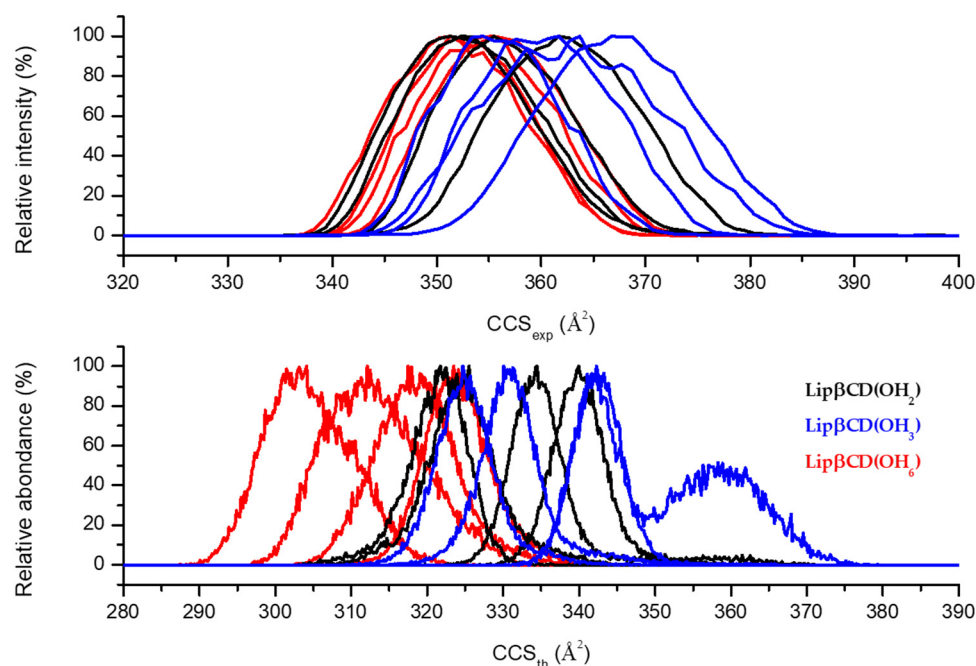
### 2.1.2. Determination of Experimental CCS by IM-MS

To further characterise the 12 Lip $\beta$ CD isomers, TWIMS-type ion mobility was used on a hybrid quadrupole/time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF) [22]. This separation technique is located behind the ionisation source, the quadrupole and before the time-of-flight mass analyser, enabling it to be coupled with UHPLC, MS/MS and HRMS. This technique allows the separation of ions by  $m/z$ , charge, shape and size [23]. Thanks to these last two parameters, IM-MS is widely used for the separation of isomers [24–26]. Its application in the field of carbohydrate research is steadily increasing for determining the connectivity and the configuration of saccharides [26–28]. However, for cyclodextrins, IM-MS is mainly described for the analysis of inclusion complexes and less often for their own characterisation [29–32]. As mentioned before, another fundamental aspect of ion mobility is that it gives access to the collision cross section (CCS) value, which, when compared to theoretical CCS values ( $CCS_{th}$ ) obtained via molecular modelling techniques, allows for the validation of hypothetical structures. The experimental CCS ( $CCS_{exp}$ ) values are obtained by recording the arrival time (commonly called drift time) distribution (ATD) of each ion that traverses the mobility cell. The arrival time data need to be calibrated first in order to access the  $CCS_{exp}$  with an accuracy of  $\pm 2\%$ . Moreover, it should be noted that the solvating effect could be important for the determination of  $CCS_{exp}$ , as already reported for macromolecules like proteins [33,34]. Consequently, we investigated whether or not chromatographic elution conditions could influence the ATD in terms of shape, full width at half maximum (FWHM) and area. These experiences allowed us to highlight that no significant differences in ATD were observed according to the composition of the chromatographic mobile phase and so did not affect the  $CCS_{exp}$  measurements (Figure S4).

In our case, a slight variation of the ATD of DS = 1 isomers was observed; this difference is also the same in terms of  $CCS_{exp}$  values (Figure 2, top panel). Thanks to the annotations made by MS/MS (black, blue and red groups of four isomers each), the differences in IM-MS between these groups are relevant. On the one hand, the  $CCS_{exp}$  of the blue group is higher and more dispersed. On the other hand, the  $CCS_{exp}$  of the red group is smaller and less dispersed. Due to the comparison of a high number of isomers, the prior formation of the groups is, therefore, a prerequisite that allows a more thorough analysis of ion mobility data.

### 2.1.3. Molecular Metadynamics and $CCS_{exp}$ Assignment of Isomers

To complement the experimental results and to help assignment, molecular dynamics (MD) studies have been undertaken on the 12 isomers in order to gain knowledge on their preferential conformation and to evaluate their theoretical collision cross-section  $CCS_{th}$  using the Impact software (for more information on how the  $CCS_{th}$  are computed, see reference [35] and references within). Without any knowledge of a stable or most probable conformation adopted by each isomer of Lip $\beta$ CD, we have decided to carry out a conformational search using metadynamics simulations in order to generate large representative ensembles of structures. Furthermore, it has been established that the radius of gyration can be used to evaluate the compactness of a structure [36] and thus can be used to measure differences in  $CCS_{th}$ . Hence, to explore a vast range of  $CCS_{th}$  for any given Lip $\beta$ CD, biased molecular dynamics simulations (i.e., metadynamics simulations) using the gyration tensor as a collective coordinate have been performed.



**Figure 2.** (Top): Experimental CCS ( $CCS_{exp}$ ) values distribution obtained from IM-MS experiments. (Bottom): Distribution of theoretical CCS ( $CCS_{th}$ ) values computed on an ensemble of minimal structures obtained from metadynamics simulations for the 12 isomers of Lip $\beta$ CD.

Once the free energy profile had been reconstructed, we selected structures located within  $0.1 \text{ \AA}$  of the global minimum, which resulted in ensembles of roughly 25,000 conformers for each of the 12 isomers. The results presented in the remainder of this study were obtained via analyses of these ensembles.  $CCS_{th}$  values were evaluated using the Trajectory Method (TJM) and the Projection Approximation (PA). The two methods lead to the same distribution of structures but differ in their absolute CCS values (inherent to the methods); see histograms in the supplementary material (Figure S5). In the remainder of the text, only TJM values will be presented, and histograms obtained for the 12 isomers are represented in Figure 2, bottom panel. A first remark is that although (by construction) all the conformers of a given ensemble present a radius of gyration located within a very narrow range ( $0.2 \text{ \AA}$ ), their CCS values are located in a much wider range. A second remark is that within any given  $\beta$ CD OH substitution position (2, 3 or 6), it is impossible to establish a ranking or draw any conclusion between the four configurations (see Scheme 1). According to the histograms represented in Figure 2 bottom panel, it is obvious that the isomers derived from grafting in position  $OH_6$  of the lipidyl moiety present the smallest  $CCS_{th}$  values, hence are more compact than the eight remaining isomers. The discrimination between isomers grafted on position  $OH_2$  and  $OH_3$  is not as obvious, but it seems that  $OH_3$  isomers present the larger  $CCS_{th}$  values of the series. Hence, the following tentative ranking can be established regarding the  $CCS_{th}$  values:  $OH_6 < OH_2 < OH_3$ . This classification will be used to assign the peaks obtained by IM-MS to the 12 isomers following different hypotheses. It has to be noted that the  $CCS_{th}$  and  $CCS_{exp}$  values are not directly comparable, as the actual experimental structures are unknown; hence, their coordinates are not available for the  $CCS_{th}$  calculation. While the absolute  $CCS_{th}$  values are not meaningful, the relative  $CCS_{th}$  values are.

Considering the three grafting positions of methyl oleate on  $\beta$ CD ( $OH_6$ ,  $OH_3$  and  $OH_2$ ), only six assignment hypotheses are possible (Table 1). The comparison of  $CCS_{exp}$  rankings with average  $CCS_{th}$  rankings (from largest to smallest) were performed for each hypothesis (for more detailed information, see SI Table S2).



**Table 1.** Score (%) obtained with the comparison of  $CCS_{exp}$  and  $\overline{CCS}_{th}$  for the assignment hypotheses of the grafted position on  $\beta$ CD. The blue, red and black colors correspond to the group of regioisomers defined by MS/MS experiments.

Group	Hypotheses					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Blue	OH <sub>3</sub>	OH <sub>3</sub>	OH <sub>2</sub>	OH <sub>2</sub>	OH <sub>6</sub>	OH <sub>6</sub>
Red	OH <sub>6</sub>	OH <sub>2</sub>	OH <sub>3</sub>	OH <sub>6</sub>	OH <sub>3</sub>	OH <sub>2</sub>
Black	OH <sub>2</sub>	OH <sub>6</sub>	OH <sub>6</sub>	OH <sub>3</sub>	OH <sub>2</sub>	OH <sub>3</sub>
Score	82%	69%	40%	47%	20%	15%

It should be noted that the regioisomer assignment proposed by molecular metadynamics calculations is in agreement with the measurements obtained by IM-MS and with the observations made by UHPLC-HRMS and MS/MS using chemometrics. On the one hand, the  $\beta$ CDs OH<sub>6</sub> is the most reactive position (57% final yield), and the assigned peaks with higher intensities correspond to this grafting position. On the other hand, MS/MS-based PCA showed a lower loss of methyl oleate upon fragmentation of the assigned OH<sub>2</sub> of the black group, which is consistent with the orientation of these alcohols towards the interior of the  $\beta$ CD cavity. This approach, using a UHPLC-IM-MS/MS analytical workflow, made it possible—in a single analysis—to assign the regioisomers of methyl oleate grafted  $\beta$ CD (DS = 1) without any purification step. In addition, the contribution of metadynamics allowed for obtaining large ensembles of structures, giving access to a distribution of  $CCS_{th}$  and confirming the experimental results.

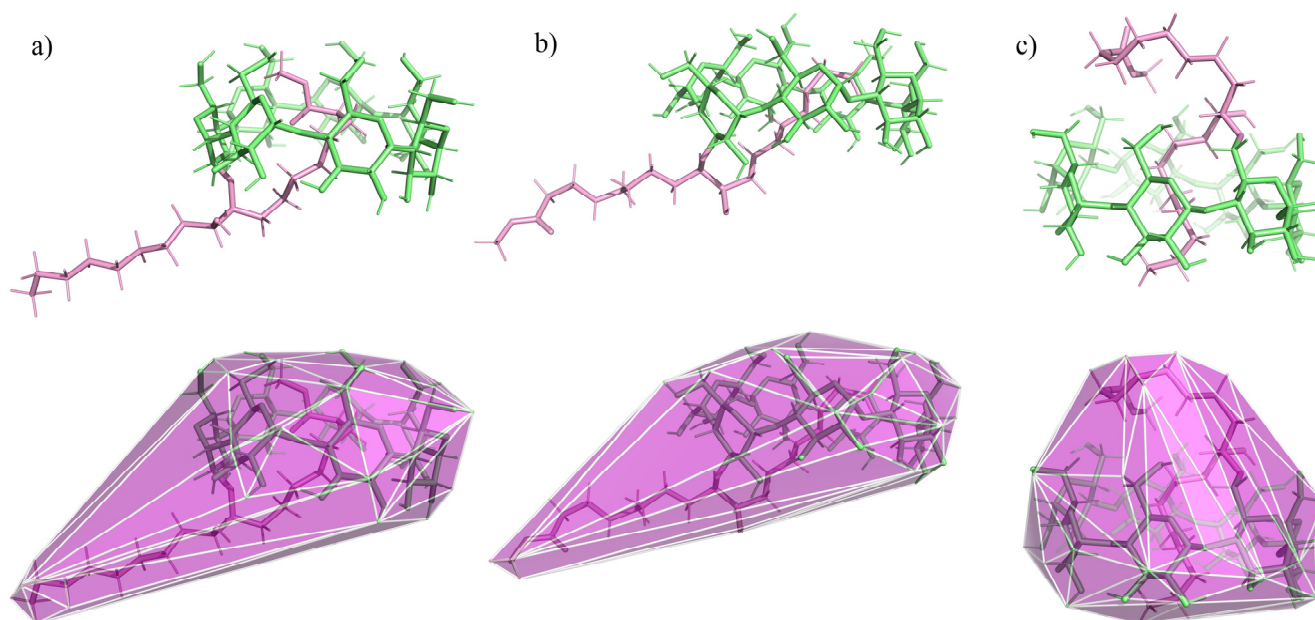
Moreover, this amount of data may also be interesting for the constitution of a conformational database of CD derivatives. This methodology seems promising because it is fast, allows the discrimination of regioisomers and provides intrinsic data ( $CCS_{th}$ ) and a large amount of theoretical information. Nevertheless, the experimental data ( $CCS_{exp}$ ) are quite close and need a validation step to verify this methodology. For this purpose, following an individual purification of the 12 isomers, our regioisomers assignment will be validated by molecular modelling and NMR studies. Comparing  $CCS_{exp}$  and  $\overline{CCS}_{th}$  values have led to an attribution of the grafting position for the 12 chromatographic peaks without discrepancies between the two methods (experimental measurements vs. theoretical calculations). However, to definitely validate this attribution, on the one hand, and to be able to differentiate one isomer among the twelve, on the other hand, further analyses to obtain 3D information on the structures have to be performed.

## 2.2. Validation of the Method

### 2.2.1. Molecular Metadynamics Studies

In order to gain a better understanding of the ranking established in the previous section and to validate it, further analyses to evaluate the shape and compactness of the different isomers have been undertaken such as a calculation of the geometrical surface and volume of the substituted-CD, on the one hand, and anisotropy of the radius of gyration, on the other hand. Moreover, the conformational space corresponding to the free energy well bottom was analysed, and representative structures of each isomer were obtained by clustering the sampled conformations into ten representative classes. The ~25,000 structures corresponding to the free energy well bottom, although featuring the same radius of gyration plus or minus 0.1 Å, adopt multiple conformations. Clustering analyses showed that the most representative structure for each of the twelve isomers is an auto-inclusion conformer: either the alkyl arm or the ester arm is present in the cavity, which is consistent with experimental results presented in the next section, see Figure 3 for a general representation of each substitution. As, by construction, it is easier for the two lipidyl chains grafted in position 6, Lip $\beta$ CD(OH<sub>6</sub>), to interact with the cavity, the histograms relative to these conformers in Figure 2 (bottom panel) are moderately stretched, corresponding to the different interactions possible for the second arm around

the CD scaffold. Histograms for Lip $\beta$ CDs grafted in position 2 or 3, Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>) and Lip $\beta$ CD(OH<sub>3</sub>), are narrower (except for one) but are located at higher CCS values. The most representative structures for a lower rim substitution show that one lipidyl chain is present in the cavity, while the second one is away, i.e., does not interact with it. As this latter does not fold around the CD scaffold, not only is the CCS higher, but also the possible number of conformations is lower compared to grafting in position 6.



**Figure 3.** Representative structures of Lip $\beta$ CD substituted in (a) position 2, Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>), (b) position 3 Lip $\beta$ CD(OH<sub>3</sub>) and (c) position 6, Lip $\beta$ CD(OH<sub>6</sub>).

Geometrical surfaces and volumes for the twelve different isomers can be found in Table 2. Again, without ambiguity, CDs grafted in position 6 present the smallest values, thus proving that their structures are the most compact of the whole series of isomers. The difference in values between Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>) and Lip $\beta$ CD(OH<sub>3</sub>) is slim, but structures corresponding to grafting in position 3 seem to be the largest. These trends totally agree with the ranking established with the CCS values. Table 2 also shows the average anisotropy or asphericity of the radius of gyration for the twelve isomer families, which lies between 0 (for spheres) and 1 (for rods). It has to be reminded that for each isomer, the selected structures show a nearly constant radius of gyration (variation of  $\pm 0.1$  Å). Structures corresponding to a grafting in position 6 are the more spherical, whereas structures corresponding to a grafting in position 3 are the more elliptical, validating again the previously established ranking.

**Table 2.** Average surfaces, volumes and average anisotropies of the radius of gyration tensor computed for the 12 families of Lip $\beta$ CD isomers. A value of zero corresponds to a sphere-like structure, and a value of one to a rod-like structure.

	Surface (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	Asphericity/Anisotropy
Lip $\beta$ CD (OH <sub>2</sub> , C <sub>9</sub> )	700.73 $\pm$ 28.10	1428.13 $\pm$ 95.33	0.370 $\pm$ 0.054
Lip $\beta$ CD (OH <sub>2</sub> , C <sub>10</sub> )	705.27 $\pm$ 38.98	1440.23 $\pm$ 109.34	0.366 $\pm$ 0.054
Lip $\beta$ CD (OH <sub>3</sub> , C <sub>9</sub> )	732.88 $\pm$ 42.19	1494.47 $\pm$ 136.29	0.411 $\pm$ 0.060
Lip $\beta$ CD (OH <sub>3</sub> , C <sub>10</sub> )	714.02 $\pm$ 36.32	1452.30 $\pm$ 107.88	0.400 $\pm$ 0.058
Lip $\beta$ CD (OH <sub>6</sub> , C <sub>9</sub> )	636.91 $\pm$ 30.81	1307.65 $\pm$ 85.63	0.268 $\pm$ 0.038
Lip $\beta$ CD (OH <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> )	664.86 $\pm$ 33.96	1372.59 $\pm$ 97.04	0.283 $\pm$ 0.041



This ranking is consistent with global cyclodextrin chemistry and sterical hindrance. Indeed, grafting in position 6 results in more flexible structures: compared to positions 2 and 3, position 6 offers an additional  $-\text{CH}_2-$  function resulting in more freedom and less hindrance for the grafted moiety, hence less deformation of the CD cavity to accommodate for the inclusion of one of the lipidyl chain through the upper and narrow rim, the second arm then being able to interact with the external scaffold of the CD. The  $\text{Lip}\beta\text{CD}(\text{OH}_6)$  structures are globally spherical and compact. Grafting in positions 2 and 3 is less readily compatible with self-inclusion (occurring at the lower and larger rim), and the CD cavity needs to adapt to welcome the lipidyl chain, while the second arm is extended and unable to interact with the CD scaffold. The  $\text{Lip}\beta\text{CD}(\text{OH}_{2,3})$  geometries are globally more stretched, resulting in more elliptical and deformed structures. The difference between positions 2 and 3 lies in the orientation of the  $-\text{OH}$  function:  $\text{OH}_2$  points “inward”, whereas  $\text{OH}_3$  points “outward”, leading to a lesser sterical hindrance upon self-inclusion of the lipidyl chain for the position 2, and a more important deformation of the cavity for CDs substituted at position 3.

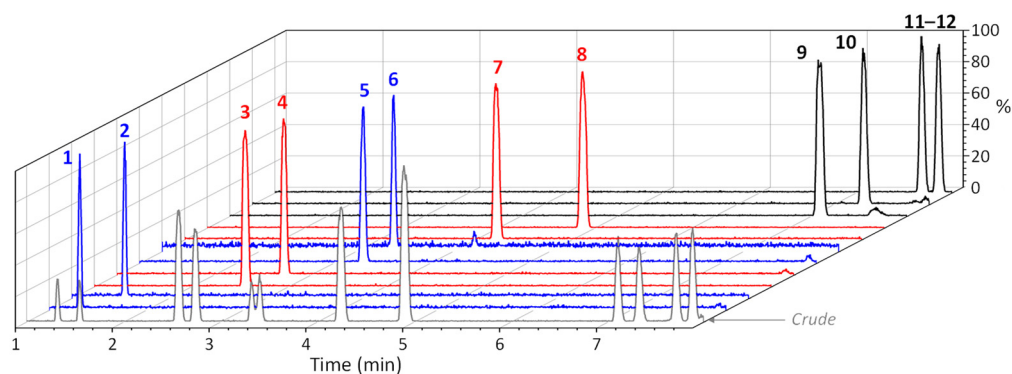
A molecular metadynamics study of the 12 isomers of  $\text{Lip}\beta\text{CD}$  concluded that for each of them, the most probable/stable structure in water corresponds to a structure where one lipidyl chain is inserted into the cavity. Depending on the grafting position of the lipidyl onto the CD, resulting structures show different compactness leading to different  $\text{CCS}_{\text{th}}$ . Histograms obtained through calculations are quite broad (Figure 2, bottom panel), discarding the presence of a unique conformer. Additionally, experimental arrival time distributions are also broad, indicating the presence of multiple structures with different mobilities and cross sections. In this context, calculations are in agreement with experimental results, and the combination of these two methods allowed for establishing without ambiguity the following rankings for  $\text{CCS}_{\text{th}}$ :  $\text{Lip}\beta\text{CD}(\text{OH}_6) < \text{Lip}\beta\text{CD}(\text{OH}_2) < \text{Lip}\beta\text{CD}(\text{OH}_3)$ . As is, the molecular modelling study presented in this work is unable to draw significant trends regarding the substitution position ( $\text{C}_9$  and  $\text{C}_{10}$ ) and the chirality (RR or SS) of the connecting carbon atoms. Additional analyses and classical MD simulations (i.e., without any bias) to account for the inclusion of the lipidyl chains accompanied by quantum ab initio calculations (geometry optimizations, energies, NMR chemical shifts, etc.) are mandatory to help the assignation of the different peaks obtained through LC-MS experiments. These studies will be the scope of a forthcoming article.

### 2.2.2. NMR Studies

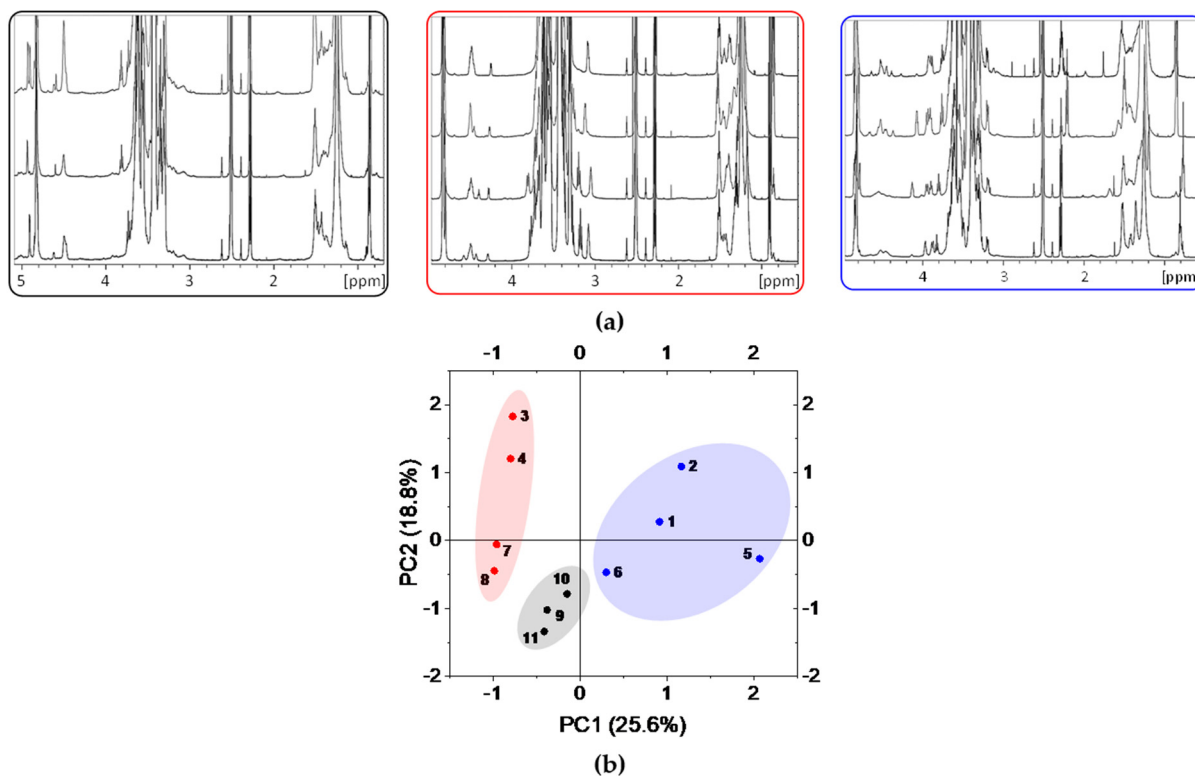
A preliminary step to NMR characterisation was the purification of the  $\text{DS} = 1$  isomers mixture, which was led with an auto-purification system after the transposition of the UHPLC conditions (Figure S6). Due to the larger dimensions of the column—and a loss of chromatographic resolution—10 out of 12 pure isomers were obtained. The collected fractions were analysed by UHPLC-HRMS to highlight the purity of each fraction. Isomers corresponding to peaks **1** to **10** were pure, whereas those corresponding to peaks **11–12** were obtained in a mixture (Figure 4).

A complete NMR characterisation was carried out in  $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$  (98/2,  $v/v$ ) on the 12 pure isomers involving NMR experiments such as COSY, TOCSY, HSQC or HMBC. For the sake of clarity, only the three most relevant points are described here. The first point is the comparison of the  $^1\text{H}$  NMR experiments performed on each isomer in the same experimental conditions, as displayed in Figure 5. As expected for modified cyclodextrin derivatives, the obtained  $^1\text{H}$  NMR spectra are very complex, and too many overlapping signals prevent any direct attribution. Nevertheless, some similarities in terms of chemical shifts can be observed, leading to the spectra's classification into three groups named blue, red and black (Figure 5a and Figure S7). Comparison of spectra of three compounds (**1**, **3**, **9**) from each different group clearly shows differences in terms of chemical shifts (see Figure S8). Another approach to explore the NMR chemical shift data was PCA methods using the variation of chemical shifts. The three same groups are observed in agreement with MS/MS study (Figure 5b). To go deeper and to try to assign each isomer, three compounds (one from each group) were selected: the compounds named **1**, **3** and **9**. The complete

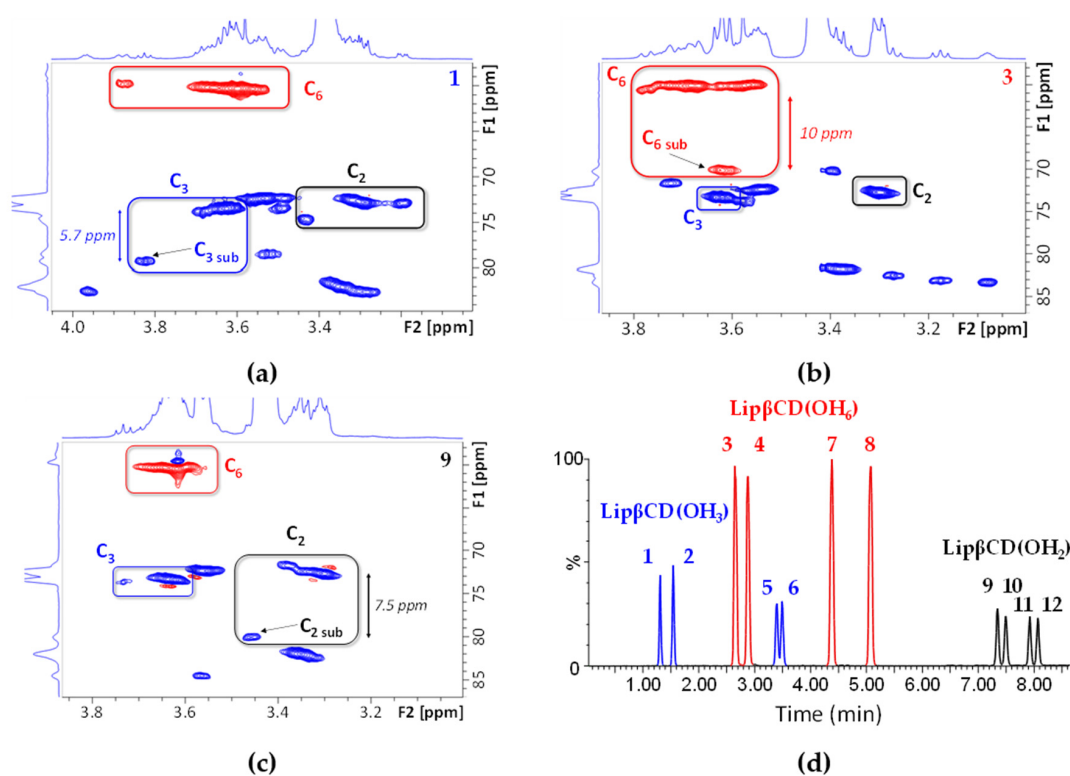
assignment of all carbon signals is achieved by coupling the COSY, TOCSY and HSQC experiments. HSQC experiment displayed in Figure 6 seems to be the most relevant NMR experiment to determine the grafting position on OH<sub>3</sub>, OH<sub>6</sub> or OH<sub>2</sub> of  $\beta$ CD for each isomer. The specific chemical shift of single carbon of CD is observed for each compound: C<sub>3</sub> for isomer 1 of the blue group, C<sub>6</sub> for isomer 3 of the red group and, finally, C<sub>2</sub> for isomer 9 of the black group. The important variations of the <sup>13</sup>C chemical shift observed in the three cases (5.7, 10 and 7.5 ppm, respectively) are in agreement with a substitution on OH<sub>3</sub>, OH<sub>6</sub> and OH<sub>2</sub> accordingly [6,8]. The same phenomenon is observed for the other compounds of the same group (2, 5 and 6 for the blue group, 4, 7 and 8 for red group and 10–12 for the black group) (See Figures S9–S11).



**Figure 4.** UHPLC-HRMS chromatograms (EIC  $m/z$  1469.6260) of the isomers mixture and of the 11 purified fractions obtained by preparative chromatography. It should be noted the 12 isomers are labelled by their elution order: 1, 2, 3 . . . 12.



**Figure 5.** (a) <sup>1</sup>H NMR spectra (600 MHz, DMSO/D<sub>2</sub>O 98/2 *v/v*, 298 K) of the purified isomers: blue group (from bottom to top: 1, 2, 5, 6), red group (3, 4, 7, 8) and black group (9, 10, 11–12). (b): PCA based on chemical shifts of <sup>1</sup>H spectra.

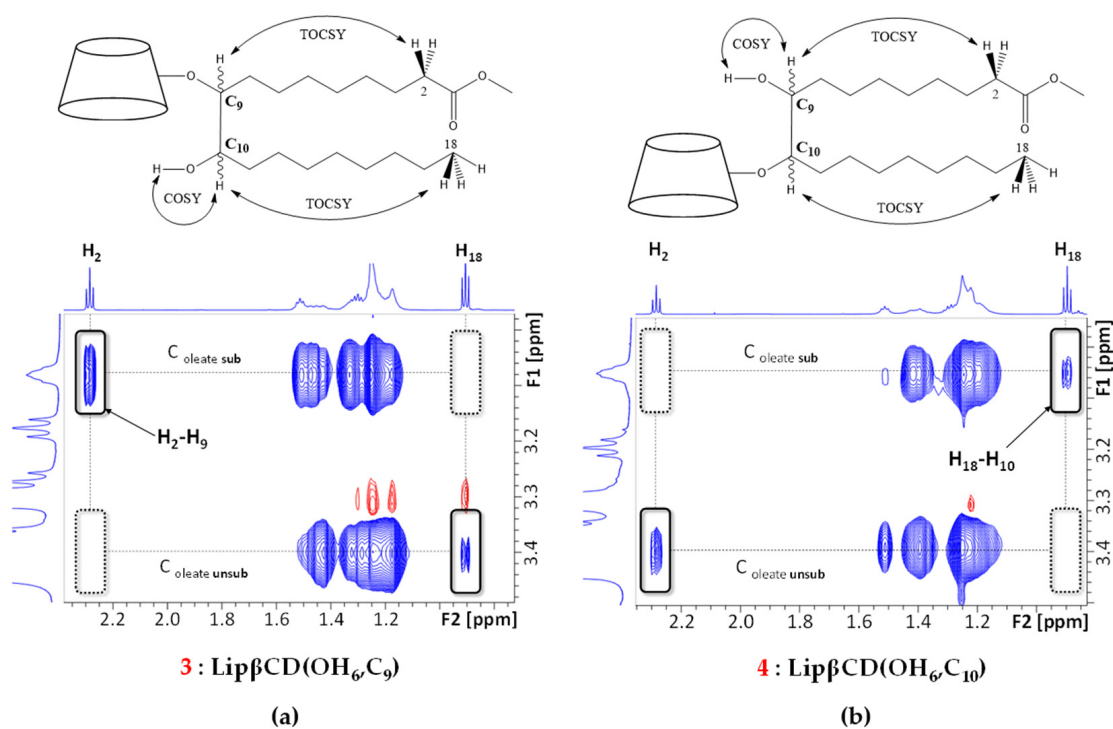


**Figure 6.** Partial contour plot of  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC experiments (600 MHz, DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$  98/2, *v/v*, 298 K) of isomers **1** (a), **3** (b) and **9** (c). (d) EIC of Lip $\beta$ CD marked with the regioisomers assignment based on HSQC experiments.

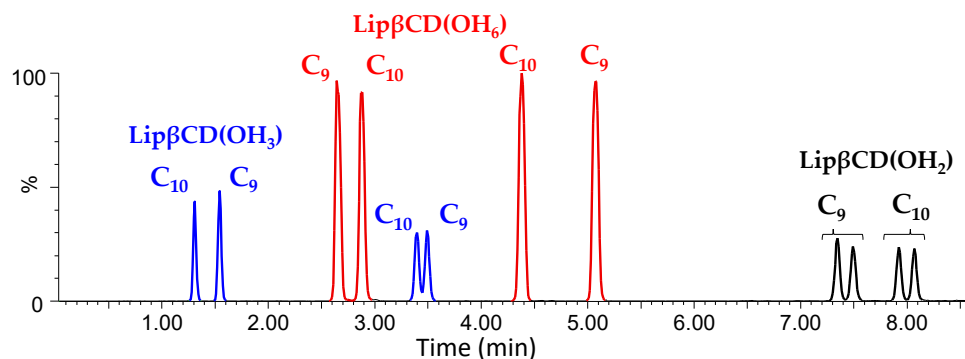
These results are the same as those obtained by the IM-MS hypothesis combined with molecular modelling. This latter approach performed on a mixture without purification was therefore validated by an NMR study carried out after purification. In addition, access to pure isomers allows the assigning of the grafted carbon ( $\text{C}_9$  and  $\text{C}_{10}$ ) on the lipidyl chain by NMR study. For that, two isomers of the same group were selected, the compounds **3** and **4** of the red group corresponding to Lip $\beta$ CD( $\text{OH}_6$ ).

TOCSY NMR experiments were performed on isomers **3** and **4** (Figure 7). Note two interesting cross peaks, obtained with a long mixing time ( $t_m$ ) as observed in Figure S12 and involving the  $\text{H}_2$  proton and the methyl 18, located on each lipidyl chain. For both isomers, we can observe a correlation between  $\text{H}_2$  and proton  $\text{H}_9$  and between methyl 18 and proton  $\text{H}_{10}$ . The discriminating element is the following: for isomer **3**, the free OH, obtained after the epoxide ring reaction and observed in pure DMSO (data not shown), is correlated with  $\text{H}_{10}$ , and in contrast, for isomer **4** with  $\text{H}_9$ . It is possible to conclude that isomer **3** is grafted by  $\beta$ CD in position 9 and isomer **4** in 10, indicating that **3** is Lip $\beta$ CD( $\text{OH}_6$ ,  $\text{C}_9$ ) and **4** is Lip $\beta$ CD( $\text{OH}_6$ ,  $\text{C}_{10}$ ). The same strategy was applied to all other isomers to obtain the following final assignment, as shown in Figure 8.

The study of ROESY experiments carried out on the 12 isomers in a DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$  (98/2, *v/v*) mixture shows numerous cross-peak correlations between the lipid parts and the cyclodextrin cavity, although DMSO is well known to have a strong affinity for the cavity of CDs and to inhibit complex formation (Figure S13). It should be noted that in all cases, interactions between any proton of the bicatenary lipidyl chain and inner protons of the cyclodextrin are observed. As most of the signals are overlapping, we focus on the interactions between methyl 18 of the lipidyl chain and protons located in the cavity as observed in Figure 9 for isomer **1**, named Lip $\beta$ CD( $\text{OH}_3$ ,  $\text{C}_{10}$ ). The assignment is achieved through HSQC experiences, and Figure 9 evidences spatial proximity between methyl 18 and  $\text{H}_3$  and  $\text{H}_5$  protons in agreement with the inclusion of this lipidyl chain inside the cavity.

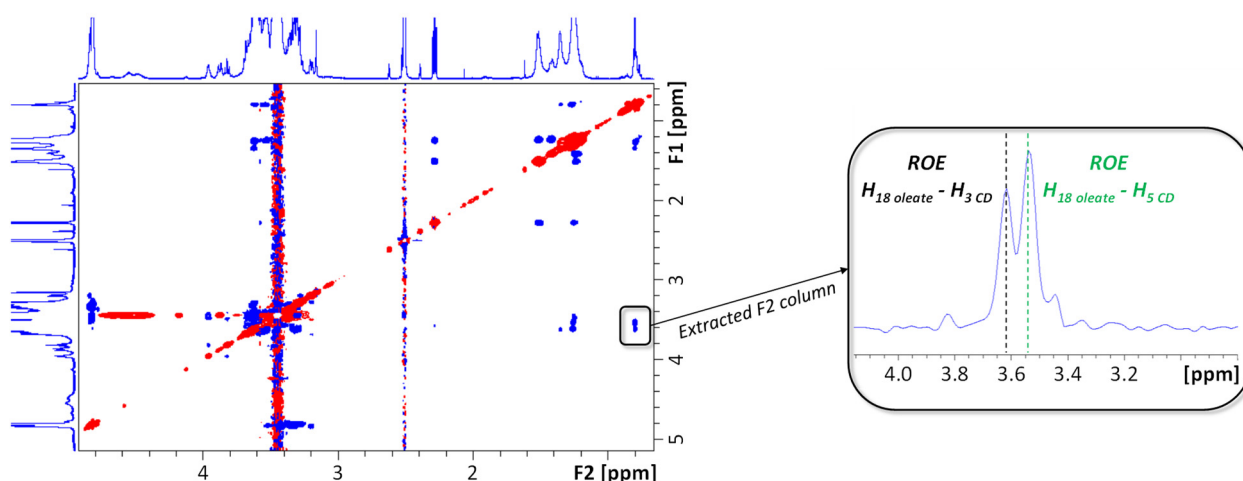


**Figure 7.** Partial contour plots of 2D TOCSY experiments (600 MHz, DMSO/D<sub>2</sub>O 98/2, *v/v*, 298 K,  $t_m = 160$  ms) of compounds 3 (a) and 4 (b). The strategy to determine the grafted position of the methyl oleate carbon is shown at the top of the contour plots.



**Figure 8.** Final assignment of the 12 chromatographic peaks obtained by UHPLC-HRMS, described by the grafted position on  $\beta$ CD (OH<sub>2</sub>, OH<sub>3</sub> and OH<sub>6</sub>) and on methyl oleate (C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>).

The same treatment is applied to the other isomers, and the obtained results are summarised in Figure S14. Once again, isomers belonging to one group provide similar results demonstrating that the grafting position on the CDs seems to be a driving force of the compound's three-dimensional structure. In the case of the Lip $\beta$ CD(OH<sub>2</sub>) group, methyl 18 exhibits weak interactions with CDs cavity in accordance with the corresponding lipidyl chain located outside the cavity (Figure 9). For Lip $\beta$ CD(OH<sub>3</sub>) and Lip $\beta$ CD(OH<sub>6</sub>) groups, two out of every four terminal methyl 18 are located inside the CD cavity (blue and red curves) but close to H<sub>5</sub> and H<sub>3</sub>, respectively (Figure S14b,c), suggesting that the resulting lipidyl chain is in the cavity in both cases. The presence of self-inclusion (intramolecular) rather than inclusion complex (intermolecular) phenomena is supported by the DOSY NMR experiments performed in DMSO at different concentrations. The diffusion coefficient  $D$  values do not vary significantly (from 1.18 to  $1.24 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>) when the concentration of the sample in DMSO is increased by a factor of 10 (Figure S15).



**Figure 9.** ROESY NMR experiment (600 MHz, DMSO/D<sub>2</sub>O 98/2, *v/v*, 298 K,  $t_m = 800$  ms) of isomer **1**. The extracted columns containing dipolar correlations with H<sub>18oleate</sub> (methyl,  $\delta = 0.8$  ppm) are inserted and show cross-peak correlations with H<sub>3CD</sub> and H<sub>5CD</sub>, highlighted by black and green dotted lines, respectively.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemicals

The Lipidyl cyclodextrins Lip $\beta$ CD were obtained by an in-home synthesis described in our previous work [17].  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD, Cavamax W7 Pharma) was supplied by Wacker Chemie AG (Munich, Germany). Deuterated water and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich. The water used was MilliQ grade. All solvents used were analytical grade.

#### 3.2. UHPLC, HRMS, MS/MS and IM-MS

Analyses were performed with a UPLC H-Class chromatographic system in line with a Synapt-G2-Si hybrid Q-TOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with an ESI source ionisation and a travelling wave ion mobility cell (TWIM).

UHPLC conditions: Samples were prepared in MeOH at a concentration of 1 mg·mL<sup>-1</sup> ( $\approx 50$   $\mu$ M), and 1  $\mu$ L was injected. For UHPLC separations, an ACQUITY UPLC BEH C8 (100 mm, 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m) column maintained at 40 °C was used. The elution was performed using a 0.4 mL·min<sup>-1</sup> mobile phase gradient of water (A) and methanol (B), programmed as follows (A:B): 60:40 ( $t = 0$  min), 20:80 ( $t = 10$  min), 20:80 ( $t = 11$  min), 0:100 ( $t = 12$  min), 0:100 ( $t = 15$  min), 60:40 ( $t = 16$  min), 60:40 ( $t = 20$  min).

The ESI source was operated in the positive ionisation mode using a capillary voltage of +3 kV and the following conditions: cone voltage, 120 V; source offset, 20 V; source temperature, 120 °C; desolvation gas temperature, 450 °C; desolvation gas flow, 800 L·h<sup>-1</sup>; and cone gas flow, 50 L·h<sup>-1</sup>. Nitrogen (>99.5%) was employed as the desolvation gas. Mass calibration was carried out using a sodium formate solution (10 mM NaOH in isopropanol/water/formic acid 49.9:49.9:0.2, *v/v/v*), and the lock mass correction was applied for accurate mass measurements using a Leu-enkephalin solution ( $m/z$  556.2771). The scan range was  $m/z$  50–2000 at 0.20 s·scan<sup>-1</sup>. The TOF was operated in the resolution mode, providing an average resolving power of 25,000 (FWHM). For MS/MS, spectra were recorded using the trap cell, with collision energy set to 95 eV under Argon (99.9999%) as the collision gas. All spectra were recorded in the continuum mode.

Ion mobility: ion mobility separation has been carried out with a TWIM cell operating under nitrogen (>99.5%) with wave height (WH), wave velocity (WV), and gas flow values at 40 V, 550 m·s<sup>-1</sup> and 90 mL·min<sup>-1</sup>, respectively. The mass of DS = 1 ( $[M + Na]^+$   $m/z$  1469.6260) was previously selected by the quadrupole to reduce noise. The TWIM cell needs to be calibrated to obtain collision cross section (CCS) values from drift time [23]; calibration was performed using a MajorMix solution (Waters). Data acquisition was



performed with the MassLynx software (V4.2, Waters). The arrival time (AT) of each ion of interest (calibration ions and CDs ions) was extracted with the Driftscope software (V2.9, Waters), and apex was determined by a gaussian fit performed with the Origin software (v2019, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

Direct introduction conditions: the purified isomers (**1**, **4** and **10**) and natural CDs ( $\alpha$ CD,  $\beta$ CD and  $\gamma$ CD) were solubilised at 5  $\mu$ M in different solvents: H<sub>2</sub>O 100%, H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 *v/v* and MeOH 100%. Each sample (3 per CD) was analysed by flow injection analysis (FIA) using isocratic H<sub>2</sub>O 100%, H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50 *v/v* or MeOH 100% as the mobile phase with a flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. All mass spectrometer and ion mobility parameters were the same as for UHPLC analyses.

To control the calibration efficiency, natural CDs were analysed, and the  $\Delta$  CCS obtained ( $[M + Na]^+$ ) were below 2% in comparison with CCS obtained with DTIMS in the literature (Table S1) [37,38].

### 3.3. Computational Details

Initial geometries for the twelve isomers of lipidyl- $\beta$ CDs studied in this work were built using the LEaP program from the AmberTools16 distribution [39]. The fragments needed to build the native  $\beta$ CDs were taken from the R.E.DD.B. database [40] under project F-85, and the fragments needed to construct the lipidyl arm were parameterised and defined according to the general strategy we developed previously for substituted cyclodextrins [41]. All molecular dynamics simulations were carried out using the SANDER module from the AmberTools16 program suite [39]. The twelve Lip $\beta$ CD isomers were solvated in a truncated octahedral box with a buffer distance of 10.0 Å, which represents 1900 to 2500 molecules of water, depending on the shape of each isomer. The q4md-CD force field parameters [41] were used to model the  $\beta$ CD scaffold, and the AMBER99SB force field [42] was used for the lipidyl substituent. The parameters used for water were taken from the TIP3P model [43]. After minimization, the systems were brought to target temperature by ramping up the temperature over periods of 25 ps followed by a run of 200 ps to relax and equilibrate the system and short classical MD simulations of 5 ns were performed using the NPT ensemble at a pressure of 1 atm and a temperature of 300 K. Finally, metadynamics simulations [44] of 300 ns were then conducted; all biasing to molecular dynamics and definition of collective coordinates were carried out using the open-source, community-developed PLUMED library [45], version 2.4.2. [46]. Metadynamics placed potentials of the initial height of 0.3 kcal·mol<sup>-1</sup> and width of 0.1 Å for the radius of gyration every 100 steps applying a bias factor of 20. Throughout the simulations, the weak coupling algorithm [47] was used to regulate the temperature and pressure to 398 K and 1 atm, respectively. The temperature was maintained close to the intended value by weak coupling to an external temperature bath with a relaxation time of 2 ps and the pressure to an external pressure bath of 1 atm with a coupling constant of 2 ps. The SHAKE algorithm [48] was used to constrain C-H bonds, and a time step of 2 fs was used to integrate the equations of motion. Periodic boundary conditions were imposed during simulation. The distance cutoff of 9.0 Å was applied to non-bonded interactions, and the PME method [49] was used to compute long-range interactions. Configurations of the systems were stored at intervals of 1 ps. Analyses and clustering of the trajectories were performed using the Cpptraj module [50] available in the AmberTools distribution. The clustering analysis was powered by the hierarchical agglomerative approach using Lip $\beta$ CD RMS distances. The Qhull program [51] was used to evaluate the geometrical surface and the volume of the Lip $\beta$ CD structures, and CCS<sub>th</sub> values were calculated with the Impact software using the trajectory method and the projection approximation [35]. These CCS<sub>th</sub> values have been calculated on structures extracted from MD simulations in explicit water, hence presenting a solvated conformation. It has been shown in the literature that for comparisons with IM-MS work performed in vacuum, this strategy is valid because, during the evaporation phase, CDs should retain their native solution structure [52,53]. Furthermore, this assumption has been experimentally verified in this work (Figure S4). However, direct comparisons between

theoretical calculations of  $CCS_{th}$  and values obtained through IM-MS experiments are not advisable, as the theoretical structures lack the presence of the  $Na^+$  ion.

### 3.4. Purification Method

Isomers purification was performed with auto-purification system with a 1525 binary pump coupled with a single quadrupole mass spectrometer SQD2 (Waters-Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray ion source (ESI-MS). The separation was performed at room temperature on a Fuji SPS-300-5-C8T (250 mm, 25 mm, 5  $\mu$ m) column using a sample injection volume of 600  $\mu$ L (solution of isomers mixture at 50  $g \cdot L^{-1}$  in DMSO). The following mobile phase gradient at a flow rate of 23  $mL \cdot min^{-1}$  was used: (A)  $H_2O$ , (B) MeOH; (A:B): 70:30 ( $t = 0$  min), 30:70 ( $t = 20$  min), 30:70 ( $t = 30$  min), 0:100 ( $t = 30.1$  min), 0:100 ( $t = 40$  min), 70:30 ( $t = 40.10$  min), 70:30 ( $t = 50$  min). An in-line splitter was set at 1/1000 to reduce the flow toward the ESI-MS source. The ESI source was operated in the positive ionisation mode using a capillary voltage of +3 kV and the following conditions: cone voltage, 60 V; source temperature, 150  $^{\circ}C$ ; desolvation gas temperature, 350  $^{\circ}C$ ; desolvation gas flow, 650  $L \cdot h^{-1}$ ; and cone gas flow, 20  $L \cdot h^{-1}$ . Nitrogen (>99.5%) was employed as the desolvation gas. Both  $[M + Na]^+$  ( $m/z$  1470) and  $[M + 2Na]^{2+}$  ( $m/z$  746) were used to detect and auto-collect  $DS = 1$  isomers. Data acquisition and processing were performed with the MassLynx V4.1 software.

### 3.5. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analyses

NMR experiments were performed on an AVANCE III 600 MHz spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) equipped with a Z-gradient unit (for pulsed-field gradient spectroscopy) and a triple resonance probe (TXI, 5-mm tube). Spectra were acquired at 298 K with close temperature control. DMSO- $d_6$  was used as the solvent, with  $D_2O$  2% to exchange free H of CDs free alcohol groups. The system's pulsecal automation program was used to optimise the duration of the 90 $^{\circ}$  pulse. Residual  $^1H$  signal of deuterated solvent was used as the reference for calibration. One-dimensional NMR spectra were recorded at a resolution of 0.12 Hz (64 K data points).  $^1H$  spectra were obtained with the Bruker sequence zg30. TOCSY experiments were performed using the Bruker sequence mlevph, mixing time was set as 160 ms; F1 and F2 resolutions are 37.5 Hz and 4.7 Hz, respectively. COSY, relayed COSY and HSQC experiments were carried out using standard sequences of Bruker library. 2D ROESY  $^1H$  NMR experiments were carried out using the phase-sensitive roesyph.2 sequence; the mixing time was set to 800 ms, with resolutions of 2.3 Hz and 18.7 Hz for F2 and F1, respectively. The TopSpin software (Bruker) v3.8 was used for acquisition, and v4.0.7 was used for data treatment.

Some NMR experiments were realised on an AVANCE NEO 900 MHz to gain in resolution and sensitivity. DMSO- $d_6$  100% was used as solvent, allowing the observation of alcohol with good resolution. COSY and HSQC experiments were performed using the Bruker sequence cosygpqf and hsqcedetgpsisp (v2.4), respectively.

### 3.6. PCA Analyses

MS/MS data treatment: Followed shared ions fragment obtained by MS/MS ( $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  1469.6260) for the 12 isomers were used: 185.0405, 347.0918, 497.3075, 509.1462, 659.3608, 671.2031, 821.4163, 833.256, 983.472, 995.3152, 1145.5276, 1307.5757. Their intensity ( $I$ ) was pretreated as follows:  $I \rightarrow \log\left(\frac{I}{I_{parent}}\right)$ . PCA was realised with Pareto scaling to keep small variance's variations between variables.

NMR data:  $^1H$  NMR spectra (600 MHz, 128 scans,  $D1 = 18$  s, 298 K) were recorded with zg pulseprog (600 MHz, Bruker) with larger spectral window (SW = 14 ppm, O1P = 4.7 ppm) to optimise baseline. NMRProcFlow tool (v1.4.16) [54] was used to obtain homogenous baseline correction (global correction, noise windows: 11.5–9.0 ppm) on previously phased spectra. From these spectra, NMRprocflow automatically generates and integrates buckets of 0.04 ppm at the following defined windows: 4.95–4.72 ( $H_{1CD}$ ), 4.15–3.48 ( $H_3$ ,  $H_5$ ,  $H_{6CD}$ ;  $H_{9-10Oleate}$ ), 3.39–3.0 ( $H_2$ ,  $H_4$  CD;  $H_{9-10Oleate}$ ), 2.34–2.14 ( $H_{2Oleate}$ ), 1.6–1.05 (H of  $CH_{2Oleate}$ ),

0.95–0.72 ( $H_{18O_{\text{leate}}}$ ). For each spectrum, the integration values of buckets were normalised to the sum of the integrations to constitute the variables. PCA was performed with Unit-Variance (UV, standard distribution) scaling to keep same contribution of each window, i.e., to avoid strong contribution of methyl singlet.

PCA was realised with the Origin software (v2019, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

#### 4. Conclusions

A complex isomers mixture of Lipidyl- $\beta$ CDs (Lip $\beta$ CD) obtained with DS = 1 from a one-step synthesis pathway has been fully characterised without previous purification. An assignment of the regioisomers, according to the grafting positions of the lipidyl chain on the  $\beta$ CD hydroxyls, was achieved unambiguously based on a combination of IM-MS measurements and a theoretical approach. These results were validated by extensive NMR structural analyses of pure isomers combined with molecular metadynamics simulations. This innovative approach seems to be a promising tool to elucidate complex isomer mixtures such as substituted cyclodextrin derivatives. Moreover, conformational searches performed through metadynamics provided a large amount of structures, which, when confronted with NMR studies, will lead to the elucidation of many structure–function relationships such as solubility, inclusion or self-assembly properties. These studies will be the scope of a forthcoming article.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232113352/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.D.-P.; methodology, F.D.-P., S.R., S.P., C.C. and D.M.; software, S.R., C.C., D.L., A.D., D.C., D.M. and S.P.; validation, F.D.-P. and S.P.; formal analysis, S.R., F.D.-P., S.P., D.C., C.C., A.D. and D.M.; investigation, S.R., F.D.-P. and D.M.; data curation, S.R., S.P., D.C. and D.L.; writing—original draft preparation, F.D.-P.; writing—review and editing, F.D.-P., S.P., C.C., D.M. and S.R.; supervision, F.D.-P. and S.P.; funding acquisition, F.D.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research and the Ph.D. grant (S. Rigaud) were funded by the “Conseil Régional des Hauts de France” and “Université de Picardie Jules Verne”. This research was partially funded by SAS PIVERT, within the frame of the French Institute for the Energy Transition (Institut pour la Transition Énergétique (ITE) P.I.V.E.R.T.)

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

**Acknowledgments:** Wacker Chimie AG is kindly acknowledged for the generous gift of  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD. Financial support from the IR INFRANALYTICS FR2054 and Integrative Structural Biology EMR9002 for conducting the research is gratefully acknowledged. Xavier Trivelli and François-Xavier Cantrelle of the University of Lille are acknowledged for the NMR acquisitions on the 900 MHz spectrometer and their fruitful discussion. The calculations presented in this work were performed using HPC resources from the MATRICS computing platform of Université de Picardie Jules Verne.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Crini, G.C.; Fourmentin, S.; Lichtfouse, E. (Eds.) *The History of Cyclodextrins*; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2020; ISBN 9783030493080.
2. Crini, G. Review: A history of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975. [[CrossRef](#)]
3. Řezanka, M. Synthesis of substituted cyclodextrins. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17*, 49–63. [[CrossRef](#)]
4. Hu, Q.-D.; Tang, G.-P.; Chu, P.K. Cyclodextrin-based host-guest supramolecular nanoparticles for delivery: From design to applications. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2017–2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



5. Zhan, W.; Wei, T.; Yu, Q.; Chen, H. Fabrication of Supramolecular Bioactive Surfaces via  $\beta$ -Cyclodextrin-Based Host-Guest Interactions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 36585–36601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Letort, S.; Mathiron, D.; Grel, T.; Albaret, C.; Daulon, S.; Djedaïni-Pilard, F.; Gouhier, G.; Estour, F. The first 2(1B),3(1A)-heterodifunctionalized  $\beta$ -cyclodextrin derivatives as artificial enzymes. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2601–2604. [[CrossRef](#)]
7. Rivero-Barbarroja, G.; Benito, J.M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J.M. Cyclodextrin-Based Functional Glyconanomaterials. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2517. [[CrossRef](#)]
8. Nolay, F.; Sevin, E.; Létévé, M.; Bil, A.; Gosselet, F.; El Kirat, K.; Djedaini-Pilard, F.; Morandat, S.; Fenart, L.; Przybylski, C.; et al. First step to the improvement of the blood brain barrier passage of atazanavir encapsulated in sustainable bioorganic vesicles. *Int. J. Pharm.* **2020**, *587*, 119604. [[CrossRef](#)]
9. Liu, J.; Wang, B.; Przybylski, C.; Bistri-Aslanoff, O.; Ménand, M.; Zhang, Y.; Sollogoub, M. Programmed Synthesis of Hepta-Differentiated  $\beta$ -Cyclodextrin: 1 out of 117,655 Arrangements. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 12090–12096. [[CrossRef](#)]
10. Mazzaglia, A.; Di Natale, G.; Tosto, R.; Scala, A.; Sortino, G.; Piperno, A.; Casaletto, M.P.; Riminucci, A.; Giuffrida, M.L.; Mineo, P.G.; et al. KLVFF oligopeptide-decorated amphiphilic cyclodextrin nanomagnets for selective amyloid beta recognition and fishing. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *613*, 814–826. [[CrossRef](#)]
11. Piras, A.M.; Fabiano, A.; Chiellini, F.; Zambito, Y. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin quaternary ammonium chitosan conjugate: Nanoparticles vs macromolecular soluble complex. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2531–2541. [[CrossRef](#)]
12. Zagami, R.; Franco, D.; Pipkin, J.D.; Antle, V.; de Plano, L.; Patanè, S.; Guglielmino, S.; Monsù Scolaro, L.; Mazzaglia, A. Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin/5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphine nanoassemblies with sustained antimicrobial phototherapeutic action. *Int. J. Pharm.* **2020**, *585*, 119487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jacquet, R.; Favetta, P.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Characterization of a new methylated beta-cyclodextrin with a low degree of substitution by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and liquid chromatography using evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 106–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fougère, L.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Evaluation of a liquid chromatography method for quality control of methylated cyclodextrins. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1277*, 42–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. Characterization of sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrins mixtures by anion-exchange chromatography using evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **2000**, *897*, 185–193. [[CrossRef](#)]
16. Jaramillo, M.; Kirschner, D.L.; Dai, Z.; Green, T.K. Separation of sulfoalkylated cyclodextrins with hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1316*, 92–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Oliva, E.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Monflier, E.; Sevin, E.; Bricout, H.; Tilloy, S.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Bonnet, V.; et al. New Lipidyl-Cyclodextrins Obtained by Ring Opening of Methyl Oleate Epoxide Using Ball Milling. *Biomolecules* **2020**, *10*, 339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cuyckens, F.; Wassvik, C.; Mortishire-Smith, R.J.; Tresadern, G.; Campuzano, I.; Claereboudt, J. Product ion mobility as a promising tool for assignment of positional isomers of drug metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 3497–3503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Domalain, V.; Hubert-Roux, M.; Tognetti, V.; Joubert, L.; Lange, C.M.; Rouden, J.; Afonso, C. Enantiomeric differentiation of aromatic amino acids using traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3234–3239. [[CrossRef](#)]
20. Li, H.; Bendiak, B.; Siems, W.F.; Gang, D.R.; Hill, H.H. Ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric disaccharide precursor, product and cluster ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 2699–2709. [[CrossRef](#)]
21. Cordella, B.Y. PCA: The Basic Building Block of Chemometrics. In *Analytical Chemistry*; Krull, I.S., Ed.; InTech: London, UK, 2012; ISBN 978-953-51-0837-5.
22. Giles, K.; Pringle, S.D.; Worthington, K.R.; Little, D.; Wildgoose, J.L.; Bateman, R.H. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2401–2414. [[CrossRef](#)]
23. Lanucara, F.; Holman, S.W.; Gray, C.J.; Eyers, C.E. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 281–294. [[CrossRef](#)]
24. Juvonen, M.; Bakx, E.; Schols, H.; Tenkanen, M. Separation of isomeric cereal-derived arabinoxylan-oligosaccharides by collision induced dissociation-travelling wave ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (CID-TWIMS-MS/MS). *Food Chem.* **2022**, *366*, 130544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dear, G.J.; Munoz-Muriedas, J.; Beaumont, C.; Roberts, A.; Kirk, J.; Williams, J.P.; Campuzano, I. Sites of metabolic substitution: Investigating metabolite structures utilising ion mobility and molecular modelling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3157–3162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wu, Q.; Wang, J.-Y.; Han, D.-Q.; Yao, Z.-P. Recent advances in differentiation of isomers by ion mobility mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *124*, 115801. [[CrossRef](#)]
27. Mu, Y.; Schulz, B.L.; Ferro, V. Applications of Ion Mobility-Mass Spectrometry in Carbohydrate Chemistry and Glycobiology. *Molecules* **2018**, *23*, 2557. [[CrossRef](#)]
28. Hofmann, J.; Hahm, H.S.; Seeberger, P.H.; Pagel, K. Identification of carbohydrate anomers using ion mobility-mass spectrometry. *Nature* **2015**, *526*, 241–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rabus, J.M.; Pellegrinelli, R.P.; Khodr, A.H.A.; Bythell, B.J.; Rizzo, T.R.; Carrascosa, E. Unravelling the structures of sodiated  $\beta$ -cyclodextrin and its fragments. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 13714–13723. [[CrossRef](#)]

30. Chen, Y.; Zuo, Z.; Dai, X.; Xiao, P.; Fang, X.; Wang, X.; Wang, W.; Ding, C.-F. Gas-phase complexation of  $\alpha$ -/ $\beta$ -cyclodextrin with amino acids studied by ion mobility-mass spectrometry and molecular dynamics simulations. *Talanta* **2018**, *186*, 1–7. [[CrossRef](#)]
31. Mathiron, D.; Lori, R.; Pilard, S.; Soundara Rajan, T.; Landy, D.; Mazzon, E.; Rollin, P.; Djedaini-Pilard, F. A Combined Approach of NMR and Mass Spectrometry Techniques Applied to the  $\alpha$ -Cyclodextrin/Moringin Complex for a Novel Bioactive Formulation. *Molecules* **2018**, *23*, 1714. [[CrossRef](#)]
32. Lee, S.-S.; Lee, J.-U.; Oh, J.H.; Park, S.; Hong, Y.; Min, B.K.; Lee, H.H.L.; Kim, H.I.; Kong, X.; Lee, S.; et al. Chiral differentiation of d- and l-isoleucine using permethylated  $\beta$ -cyclodextrin: Infrared multiple photon dissociation spectroscopy, ion-mobility mass spectrometry, and DFT calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 30428–30436. [[CrossRef](#)]
33. Wyttenbach, T.; Bowers, M.T. Structural stability from solution to the gas phase: Native solution structure of ubiquitin survives analysis in a solvent-free ion mobility-mass spectrometry environment. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12266–12275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Seo, J.; Hoffmann, W.; Warnke, S.; Bowers, M.T.; Pagel, K.; von Helden, G. Retention of Native Protein Structures in the Absence of Solvent: A Coupled Ion Mobility and Spectroscopic Study. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 14173–14176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Marklund, E.G.; Degiacomi, M.T.; Robinson, C.V.; Baldwin, A.J.; Benesch, J.L.P. Collision cross sections for structural proteomics. *Structure* **2015**, *23*, 791–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lobanov, M.Y.; Bogatyreva, N.S.; Galzitskaya, O.V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Mol. Biol.* **2008**, *42*, 623–628. [[CrossRef](#)]
37. Mason, E.A.; Schamp, H.W. Mobility of gaseous ions in weak electric fields. *Ann. Phys.* **1958**, *4*, 233–270. [[CrossRef](#)]
38. Klein, C.; Cologna, S.M.; Kurulugama, R.T.; Blank, P.S.; Darland, E.; Mordehai, A.; Backlund, P.S.; Yergey, A.L. Cyclodextrin and malto-dextrose collision cross sections determined in a drift tube ion mobility mass spectrometer using nitrogen bath gas. *Analyst* **2018**, *143*, 4147–4154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Case, D.A.; Betz, R.M.; Cerutti, D.S.; Cheatham, T.E., III; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Giese, T.J.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; Homeyer, N.; et al. *AMBER 2016*; University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
40. Dupradeau, F.-Y.; Pigache, A.; Zaffran, T.; Savineau, C.; Lelong, R.; Grivel, N.; Lelong, D.; Rosanski, W.; Cieplak, P. The R.E.D. tools: Advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7821–7839. [[CrossRef](#)]
41. Cézard, C.; Trivelli, X.; Aubry, F.; Djedaini-Pilard, F.; Dupradeau, F.-Y. Molecular dynamics studies of native and substituted cyclodextrins in different media: 1. Charge derivation and force field performances. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 15103–15121. [[CrossRef](#)]
42. Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **2006**, *65*, 712–725. [[CrossRef](#)]
43. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935. [[CrossRef](#)]
44. Barducci, A.; Bussi, G.; Parrinello, M. Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 020603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bonomi, M.; Bussi, G.; Camilloni, C.; Tribello, G.A.; Banáš, P.; Barducci, A.; Bernetti, M.; Bolhuis, P.G.; Bottaro, S.; Branduardi, D.; et al. Promoting transparency and reproducibility in enhanced molecular simulations. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 670–673. [[CrossRef](#)]
46. Tribello, G.A.; Bonomi, M.; Branduardi, D.; Camilloni, C.; Bussi, G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Comput. Phys. Commun.* **2014**, *185*, 604–613. [[CrossRef](#)]
47. Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; DiNola, A.; Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690. [[CrossRef](#)]
48. Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341. [[CrossRef](#)]
49. Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577–8593. [[CrossRef](#)]
50. Roe, D.R.; Cheatham, T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095. [[CrossRef](#)]
51. Barber, C.B.; Dobkin, D.P.; Huhdanpaa, H. The quickhull algorithm for convex hulls. *ACM Trans. Math. Softw.* **1996**, *22*, 469–483. [[CrossRef](#)]
52. Servage, K.A.; Silveira, J.A.; Fort, K.L.; Russell, D.H. From solution to gas phase: The implications of intramolecular interactions on the evaporative dynamics of substance P during electrospray ionization. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4693–4698. [[CrossRef](#)]
53. Choi, H.; Oh, Y.-H.; Park, S.; Lee, S.-S.; Oh, H.B.; Lee, S. Unveiling host-guest-solvent interactions in solution by identifying highly unstable host-guest configurations in thermal non-equilibrium gas phase. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 8169. [[CrossRef](#)]
54. Jacob, D.; Deborde, C.; Lefebvre, M.; Maucourt, M.; Moing, A. NMRProcFlow: A graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics* **2017**, *13*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## **Annexe 4**

*Curriculum Vitae : Liste des publications et présentations orales présentées personnellement*



## Liste des publications

Rigaud, S.; Dosso, A.; Lesur, D.; Cailleu, D.; Mathiron, D.; Pilard, S.; Cézard, C.; Djedaini-Pilard, F. *Mass Spectrometry, Ion Mobility Separation and Molecular Modelling: A Powerful Combination for the Structural Characterisation of Substituted Cyclodextrins Mixtures. IJMS* **2022**, *23*, 13352, doi:10.3390/ijms232113352.

Rigaud, S.; Martinez, A.C.; Lombard, T.; Grugeon, S.; Tran-Van, P.; Pilard, S.; Laruelle, S. *Mass Spectrometry Analysis of NMC622/Graphite Li-Ion Cells Electrolyte Degradation Products after Storage and Cycling. J. Electrochem. Soc.* **2022**, *169*, 10502, doi:10.1149/1945-7111/ac44bb.

Kamal, R.M.; Abdull Razis, A.F.; Mohd Sukri, N.S.; Perimal, E.K.; Ahmad, H.; Patrick, R.; Djedaini-Pilard, F.; Mazzon, E.; Rigaud, S. *Beneficial Health Effects of Glucosinolates-Derived Isothiocyanates on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. Molecules* **2022**, *27*, 624, doi:10.3390/molecules27030624.

Martinez, A.C.; Rigaud, S.; Grugeon, S.; Tran-Van, P.; Armand, M.; Cailleu, D.; Pilard, S.; Laruelle, S. *Chemical reactivity of lithium difluorophosphate as electrolyte additive in LiNi<sub>0.6</sub>Co<sub>0.2</sub>Mn<sub>0.2</sub>O<sub>2</sub>/graphite cells. Electrochimica Acta* **2022**, *426*, 140765, doi:10.1016/j.electacta.2022.140765.

Bresson, S.; Lecuelle, A.; Bougrioua, F.; El Hadri, M.; Baeten, V.; Courty, M.; Pilard, S.; Rigaud, S.; Faivre, V. *Comparative structural and vibrational investigations between cocoa butter (CB) and cocoa butter equivalent (CBE) by ESI/MALDI-HRMS, XRD, DSC, MIR and Raman spectroscopy. Food Chem.* **2021**, *363*, 130319, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130319.

Rigaud, S.; Mathiron, D.; Moufawad, T.; Landy, D.; Djedaini-Pilard, F.; Marçon, F. *Cyclodextrin Complexation as a Way of Increasing the Aqueous Solubility and Stability of Carvedilol. Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1746, doi:10.3390/pharmaceutics13111746.

Oliva, E.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Monflier, E.; Sevin, E.; Bricout, H.; Tilloy, S.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Bonnet, V.; et al. *New Lipidyl-Cyclodextrins Obtained by Ring Opening of Methyl Oleate Epoxide Using Ball Milling. Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10020339.

Palaric, C.; Pilard, S.; Fontaine, J.-X.; Boccard, J.; Mathiron, D.; Rigaud, S.; Cailleu, D.; Mesnard, F.; Gut, Y.; Renaud, T.; et al. *Processing of NMR and MS metabolomics data using chemometrics methods: a global tool for fungi biotransformation reactions monitoring. Metabolomics* **2019**, *15*, 107, doi:10.1007/s11306-019-1567-5.

## Liste des communications orales présentées personnellement

Journées Cyclodextrines (JCD2022). *Contribution de la MS/MS et de la mobilité ionique pour la caractérisation de mélanges de cyclodextrines substituées. Lille, France, Octobre 2022.*

International Cyclodextrins Symposium (ICS). *Contribution of cyclodextrins for "European Pediatric needs": Carvedilol case study. Sicile, Italie, Juin 2022.*

Journées Françaises de Spectrométrie de Masse (JFSM). *Contribution of Ion Mobility Mass Spectrometry for the Analysis of Complex Isomers Mixtures: application to Lipidyl-Cyclodextrins. Webinaire, Juin 2021.*

Journées Jeunes Chercheurs Condorcet (J2C2). *Contribution of Ion Mobility Mass Spectrometry for the Analysis of Complex Isomers Mixtures: application to Lipidyl-Cyclodextrins. Webinaire, Janvier 2021.*







## Résumé

L'Agence Européenne des Médicaments a alerté sur le manque de développement de formulations appropriées aux jeunes patients, notamment sous forme de solutions liquides présentant une bonne acceptabilité lors d'une administration par voie orale. La formation de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines (CDs) étant connue pour augmenter la solubilité, la stabilité et l'acceptabilité par la diminution des goûts et odeurs des substances actives (SA), leur utilisation apparaît comme étant une solution appropriée. Dans ce contexte, l'apport des CDs au carvedilol, une SA de classe BCS II (Biopharmaceutics Classification System) reportée dans les European Pediatric Needs et utilisée pour le traitement des troubles cardiaques légers à modérés a été étudié. L'exploration de différents milieux et CDs a mené à l'obtention d'une solution aqueuse concentrée à 5 mg/mL de carvedilol, sous forme d'un complexe d'inclusion caractérisé par RMN et ITC. Cette concentration représente une solubilité environ 350 fois supérieure à la solubilité intrinsèque du carvedilol dans l'eau. Obtenue dans un milieu acceptable pour une administration par voie orale, cette concentration permet l'administration de faibles volumes comme recommandé chez les jeunes patients. Les CDs prometteuses ( $\gamma$ CD et RAMEB) ont également montré un effet protecteur sur la photodégradation du carvedilol. Au cours de cette étude, la RAMEB a systématiquement montré des effets plus prononcés, en terme d'amélioration de la solubilité et de la stabilité du carvedilol. Les mélanges de dérivés de CDs tels que la RAMEB ou l'HP $\beta$ CD ont souvent des propriétés plus intéressantes que leurs homologues naturels. Cependant, leurs voies de synthèse peu coûteuses et non-sélectives mènent à l'obtention de mélanges de différents degrés de substitution (DS), contenant de nombreux isomères. L'utilisation de ces mélanges avec des SAs rend la caractérisation des complexes et la compréhension des résultats difficile. Afin de combler ce manque de caractérisation, la seconde partie de ces travaux consiste en la mise en place d'une méthode d'analyse des mélanges de dérivés de CDs. Pour cela, un mélange de dérivés amphiphiles de la  $\beta$ CD obtenu en une étape de synthèse a été utilisé comme modèle. La chromatographie liquide couplée à la mobilité ionique et à la spectrométrie de masse (UHPLC-IMS-HRMS), combinées à des modèles théoriques, a permis une caractérisation des régioisomères de DS=1 sans étape de purification. La validation des résultats a été réalisée par RMN et modélisation, indiquant que ce couplage est prometteur pour l'analyse et la caractérisation des mélanges de CDs modifiées.

*Mots-Clefs : Cyclodextrines ; Complexe d'inclusion ; Résonance magnétique nucléaire ; Spectrométrie de masse ; Mélange d'isomères.*

## Abstract

The European Medicines Agency has highlighted the lack of pediatric development formulations that offer good acceptability during oral administration as liquid solutions. Inclusion complexes obtained from cyclodextrins (CDs) are known to increase solubility, stability and the acceptability by reducing the taste and odor of active principal ingredient (API). Their use appears to be an appropriate way to fill this lack of age-appropriate formulation. Therefore, the benefits of CDs to carvedilol were investigated. This API is classified as BCS II (Biopharmaceutics Classification System) and reported by the European Pediatric Needs for its use to treat mild to moderate congestive heart failures. The study of different media and CDs has led to a concentrated (5 mg/mL) aqueous solution of carvedilol, by the inclusion complexes formation characterized by NMR and ITC. This solubility is about 350 times greater than its intrinsic solubility in water. This concentration allows the use of low volumes for oral administration in an appropriate medium, as recommended in the pediatric field. The promising CDs ( $\gamma$ CD and RAMEB) also increased the carvedilol's photochemical stability in aqueous solution. In this study, RAMEB has invariably shown the higher positive effects in the improvement of solubility and stability of carvedilol. Mixtures of CD derivatives such as RAMEB or HP $\beta$ CD often exhibit more attractive properties than the natural CDs. However, their inexpensive and non-selective synthesis leads to mixtures of different degrees of substitution (DS) with numerous isomers. The use of these mixtures with APIs makes it challenging to characterize the inclusion complexes and to understand the results. In order to fill this characterization deficiency, the second part of this work consists in the development of a method for the analysis of CDs derivatives mixtures. For this purpose, a mixture of amphiphilic  $\beta$ CD derivatives obtained in a one-step reaction was used as a model. Liquid chromatography in line with ion mobility and mass spectrometry (UHPLC-IMS-HRMS), enhanced with theoretical models, has allowed the characterization of DS=1 regioisomers without a purification step. NMR and molecular modeling have validated these findings, suggesting a promising workflow for the analysis and characterization of modified CDs mixtures.

*Keywords: Cyclodextrins; Inclusion complex; Nuclear magnetic resonance; Mass spectrometry; Isomers mixture.*