

myosin assemblies. Proteins with one or two copies of the motif may bind to the myosin filaments and exert there their function. Studies are underway to clarify the relationship of the CaVP-IgCalvin complex with myosin filaments and with myosin-stabilizing proteins and how eventual interactions are regulated by the Ca²⁺ signal.

Studies in our laboratory were supported by the Swiss National Science Foundation.

Received: January 16, 1992

- [1] C.W. Heizmann, W. Hunziker, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 98.
- [2] R.H. Kretsinger, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1987**, *70*, 499.
- [3] N.C.J. Strynadka, M.N.G. James, *Current Opinion Struct. Biol.* **1991**, *1*, 905.
- [4] J.A. Cox, in 'Stimulus-response coupling: The role of intracellular calcium', Eds. J.R. Dedman and V.L. Smith, CRC Press, Boca Raton—Ann Arbor—Boston, 1990, pp. 67–72.
- [5] W. Wnuk, J.A. Cox, E.A. Stein, in 'Calcium and Cell Function', Ed. W.Y. Cheung, Academic Press, New York, 1981, Vol. 2, p. 243.
- [6] J.A. Cox, A. Bairoch, *Nature (London)* **1988**, *331*, 491.
- [7] J.A. Cox, *Biochem. J.* **1988**, *249*, 621.
- [8] W.J. Cook, S.E. Ealick, Y.S. Babu, J.A. Cox, S. Vijay-Kumar, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 652.
- [9] Y. Luan-Rilliet, I. Gerber, T. Takagi, J.A. Cox, submitted to *J. Biol. Chem.*
- [10] J.A. Cox, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13173.
- [11] J.A. Cox, Ph. Allard, O. Schaad, *Prot. Engineering* **1990**, *4*, 23.
- [12] T. Takagi, J.A. Cox, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 19721.
- [13] L. Valette-Talbi, C. Chaponnier, J.A. Cox, submitted to *J. Histochem. Cytochem.*
- [14] R.H. Kretsinger, C.E. Nockolds, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3313.
- [15] N.C.J. Strynadka, M.N.G. James, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 951.

Chimia 46 (1992) 161–163
© Schweiz. Chemiker-Verband; ISSN 0009–4293

Détermination de la composition d'une préparation médicinale frauduleuse par des méthodes chromatographiques couplées (GC/MS, GC-FTIR, HPLC-DAD). Le cas des pilules chinoises *Chuifong-Toukuwan*

Philippe Arrizabalaga*, Alois Kamatari et Jean-Claude Landry

Abstract. The hyphenated techniques in chromatography (GC/MS, GC-FTIR, HPLC-DAD) are available for the molecular analysis of organic compounds. A traditional herbal medicine claimed to have a natural composition is studied by these appropriate methods. The analysis of crude and derivatized extracts of the pills showed that they are constituted by a mixture of synthetic drugs (mefenamic acid, indomethacine, hydrochlorothiazid, and diazepam) and some herbal compounds.

Introduction

L'attrait pour les médications naturelles associées à celui pour l'exotisme des pharmacopées orientales ont favorisé la vente clandestine de médicaments frauduleux [1].

Parmi eux, les pilules chinoises *chuifong toukuwan* présentent, aux dires du fabricant, 'toutes les qualités requises pour soigner les maladies liées à l'effet du vent et de l'humidité tels que rhumatismes et arthrite'. Elles ne contiendraient que des extraits de plantes et ne présenteraient

aucun risque pour la santé dans le cas de traitements prolongés. Les pilules sont des sphères noires, luisantes, d'environ 10 mm de diamètre, pesant en moyenne 440 mg. Elles sont constituées d'une enveloppe noire contenant une poudre blanchâtre hétérogène composée de particules plus ou moins colorées et cristallisées.

Elles sont vendues par correspondance et échappent à tout contrôle. Elles sont déjà responsables de nombreux accidents hématologiques (agranulocytose) aux États Unis [1] où elles circulent illicitement depuis quelques années.

Différentes équipes ont montré, par chromatographie sur couche mince, par chromatographie liquide haute performance et par spectrométrie de masse, qu'elles contiennent une quantité non négligeable de molécules thérapeutiques de synthèse et que leur composition est variable [2–5].

Nous présentons, ici, les résultats obtenus par différentes techniques chromatographiques couplées de l'étude de ces pilules importées clandestinement en Suisse. Comme dans les travaux précédents, nous avons pu montrer la présence de produits de synthèse mais également et, pour la première fois, celle de composés naturels d'origine végétale dont l'activité thérapeutique avait été décrite dans la pharmacopée traditionnelle orientale.

Les analyses ont été effectuées sur des extraits de produit brut dans le MeOH et des extraits méthylestérifiés. Les solutions ainsi obtenues ont été étudiées dans des conditions chromatographiques identiques.

L'identification des constituants a été réalisée par spectrométrie de masse et pour certains par spectroscopie infrarouge. Ces deux méthodes, séparément très fiables, permettent une caractérisation indiscutable des composés organiques.

Partie expérimentales

Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS)

L'extrait brut est obtenu en traitant 1 pilule finement broyée par 15 ml de MeOH (3 x 5 ml) dans un bain à ultrasons pendant 30 min. La soln. est ensuite filtrée (*ISO-DISC N-254*, diamètre 25 µm, porosité 0,45 µm, *Supelco*) puis concentrée par évaporation sous vide. La dérivation est

*Correspondance: Dr. Ph. Arrizabalaga
Service de l'écotoxicologie cantonal
CP 78
CH-1211 Genève 8

myosin assemblies. Proteins with one or two copies of the motif may bind to the myosin filaments and exert there their function. Studies are underway to clarify the relationship of the CaVP-IgCalvin complex with myosin filaments and with myosin-stabilizing proteins and how eventual interactions are regulated by the Ca²⁺ signal.

Studies in our laboratory were supported by the Swiss National Science Foundation.

Received: January 16, 1992

- [1] C.W. Heizmann, W. Hunziker, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 98.
- [2] R.H. Kretsinger, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1987**, *70*, 499.
- [3] N.C.J. Strynadka, M.N.G. James, *Current Opinion Struct. Biol.* **1991**, *1*, 905.
- [4] J.A. Cox, in 'Stimulus-response coupling: The role of intracellular calcium', Eds. J.R. Dedman and V.L. Smith, CRC Press, Boca Raton—Ann Arbor—Boston, 1990, pp. 67–72.
- [5] W. Wnuk, J.A. Cox, E.A. Stein, in 'Calcium and Cell Function', Ed. W.Y. Cheung, Academic Press, New York, 1981, Vol. 2, p. 243.
- [6] J.A. Cox, A. Bairoch, *Nature (London)* **1988**, *331*, 491.
- [7] J.A. Cox, *Biochem. J.* **1988**, *249*, 621.
- [8] W.J. Cook, S.E. Ealick, Y.S. Babu, J.A. Cox, S. Vijay-Kumar, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 652.
- [9] Y. Luan-Rilliet, I. Gerber, T. Takagi, J.A. Cox, submitted to *J. Biol. Chem.*
- [10] J.A. Cox, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13173.
- [11] J.A. Cox, Ph. Allard, O. Schaad, *Prot. Engineering* **1990**, *4*, 23.
- [12] T. Takagi, J.A. Cox, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 19721.
- [13] L. Valette-Talbi, C. Chaponnier, J.A. Cox, submitted to *J. Histochem. Cytochem.*
- [14] R.H. Kretsinger, C.E. Nockolds, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3313.
- [15] N.C.J. Strynadka, M.N.G. James, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 951.

Chimia 46 (1992) 161–163
© Schweiz. Chemiker-Verband; ISSN 0009–4293

Détermination de la composition d'une préparation médicinale frauduleuse par des méthodes chromatographiques couplées (GC/MS, GC-FTIR, HPLC-DAD). Le cas des pilules chinoises *Chuifong-Toukuwan*

Philippe Arrizabalaga*, Alois Kamatari et Jean-Claude Landry

Abstract. The hyphenated techniques in chromatography (GC/MS, GC-FTIR, HPLC-DAD) are available for the molecular analysis of organic compounds. A traditional herbal medicine claimed to have a natural composition is studied by these appropriate methods. The analysis of crude and derivatized extracts of the pills showed that they are constituted by a mixture of synthetic drugs (mefenamic acid, indomethacine, hydrochlorothiazid, and diazepam) and some herbal compounds.

Introduction

L'attrait pour les médications naturelles associées à celui pour l'exotisme des pharmacopées orientales ont favorisé la vente clandestine de médicaments frauduleux [1].

Parmi eux, les pilules chinoises *chuifong toukuwan* présentent, aux dires du fabricant, 'toutes les qualités requises pour soigner les maladies liées à l'effet du vent et de l'humidité tels que rhumatismes et arthrite'. Elles ne contiendraient que des extraits de plantes et ne présenteraient

aucun risque pour la santé dans le cas de traitements prolongés. Les pilules sont des sphères noires, luisantes, d'environ 10 mm de diamètre, pesant en moyenne 440 mg. Elles sont constituées d'une enveloppe noire contenant une poudre blanchâtre hétérogène composée de particules plus ou moins colorées et cristallisées.

Elles sont vendues par correspondance et échappent à tout contrôle. Elles sont déjà responsables de nombreux accidents hématologiques (agranulocytose) aux États Unis [1] où elles circulent illicitement depuis quelques années.

Différentes équipes ont montré, par chromatographie sur couche mince, par chromatographie liquide haute performance et par spectrométrie de masse, qu'elles contiennent une quantité non négligeable de molécules thérapeutiques de synthèse et que leur composition est variable [2–5].

Nous présentons, ici, les résultats obtenus par différentes techniques chromatographiques couplées de l'étude de ces pilules importées clandestinement en Suisse. Comme dans les travaux précédents, nous avons pu montrer la présence de produits de synthèse mais également et, pour la première fois, celle de composés naturels d'origine végétale dont l'activité thérapeutique avait été décrite dans la pharmacopée traditionnelle orientale.

Les analyses ont été effectuées sur des extraits de produit brut dans le MeOH et des extraits méthylestérifiés. Les solutions ainsi obtenues ont été étudiées dans des conditions chromatographiques identiques.

L'identification des constituants a été réalisée par spectrométrie de masse et pour certains par spectroscopie infrarouge. Ces deux méthodes, séparément très fiables, permettent une caractérisation indiscutable des composés organiques.

Partie expérimentales

Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS)

L'extrait brut est obtenu en traitant 1 pilule finement broyée par 15 ml de MeOH (3 x 5 ml) dans un bain à ultrasons pendant 30 min. La soln. est ensuite filtrée (*ISO-DISC N-254*, diamètre 25 µm, porosité 0,45 µm, *Supelco*) puis concentrée par évaporation sous vide. La dérivatisation se

*Correspondance: Dr. Ph. Arrizabalaga
Service de l'écotoxicologie cantonal
CP 78
CH-1211 Genève 8

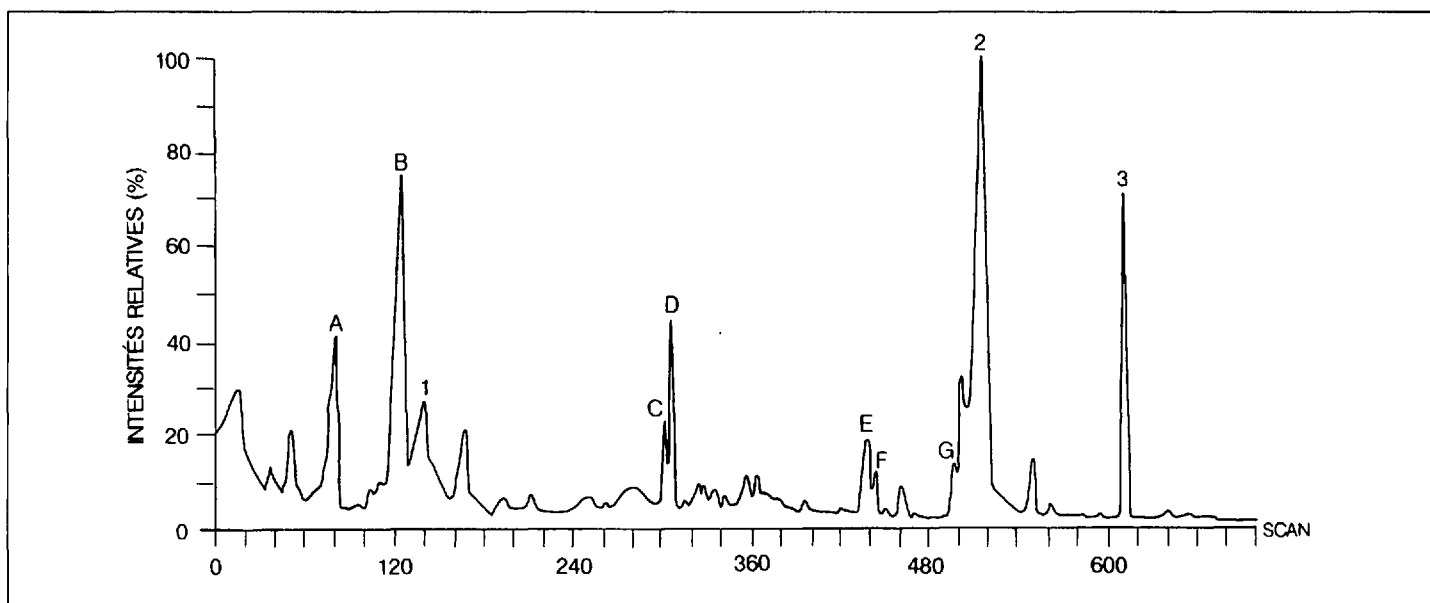


Figure. Chromatogramme (GC/MS) de l'extrait brut dans le méthanol: (1) 4-méthyl-5-thiazoleéthanol, (2) diazépam, (3) acide méfénamique; l'attribution des pics correspondant aux composés naturels est indiquée dans le tab. 1

fait par action de 1 ml de BF_3 à 10% dans le MeOH sur 0,5 ml d'extraction méthanolique. Le mélange obtenu est chauffé au bain-marie à 70° pendant ca. 10 min. Il est refroidi, extrait à l'heptane, séché (Na_2SO_4) puis concentré par évaporation. Chromatographe Hewlett-Packard 5890 équipé d'une colonne capillaire SPB-5, (30 m x 0,32 mm ID), (Supelco SA). Programme de temp.: 70° pendant 2 min suivi d'une augmentation de temp. jusqu'à 280° à raison de 4° par min, injecteur 250° . Spectromètre de masse VG 70 SQ équipé du système d'acquisition et de traitement de données VG Analytical 11250 J ainsi que d'une banque de spectres de référence NBS (National Bureau of Standards) [6].

Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (GC-FTIR)

Les solns. sont les mêmes que celles utilisées pour l'étude par GC/MS. Chromatographe Perkin-Elmer 8600 équipé d'une colonne SPB-1, (15m x 0,53 mm ID) (Supelco SA). Programme de température: 70° pendant 1 min suivi d'une augmentation de temp. jusqu'à 280° à raison de 4° par min, injecteur 250° . Spectromètre infrarouge Perkin-Elmer à transformée de Fourier 1720X, équipé d'un détecteur MCT et d'un système d'acquisition et de traitement de données SEARCH for IRDM.

Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les extractions au MeOH (4 x 5 ml) de 100 mg de substance blanche finement pulvérisée sont réalisées dans un bain ultrasonique. Les solns. obtenues après filtration sont ajustées à 100 ml par addition de méthanol. Chromatographe Varian 5020B équipée d'une boucle d'injection $10 \mu\text{l}$ Rheodyne 7125, d'une colonne phase-inverse LC 18-DB Supelcosil (taille des particules $5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 150 \text{ mm}$), d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) Perkin-Elmer LC-235 et d'un intégrateur Perkin-Elmer LCI-100. Deux systèmes d'éluant ont du être utilisés séparément: système A: MeOH/ H_3PO_4 13 mM (7:3), système B: MeCN/ KH_2PO_4 (15:85) avec addition d'acide phosphorique concentré jusqu'à pH 3,3. Le débit a été fixé à 2 ml/min. Les produits commer-

ciaux de référence sont l'indométhacine, l'acide méfénamique, l'hydrochlorothiazide (Sigma Chemical Co.) et le 4-méthyl-5-thiazoleéthanol (Aldrich Chemical Co.). Le diazépam a gracieusement été offert par les Laboratoires Sauter S.A. de Genève. Les solvants org. sont de qualité puriss ou HPLC-grade (Fluka AG).

Résultats et discussion

L'étude par GC/MS de l'extraction dans le méthanol permet d'identifier un grand nombre de constituants du mélange (fig. 1).

Les composés de synthèse tels que le diazépam, pic 2, (tranquillisant) et l'acide méfénamique, pic 3, (anti-inflammatoire) sont caractérisés aisément par leur spectre de masse. Le 4-méthyl-5-thiazoleéthanol, pic 1, dont les propriétés sédatives et hypnotiques peuvent justifier sa présence dans ce type de préparation, peut également être un produit de thermolyse de la thiamine (vitamine B1) dans l'injecteur 'on-column'. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée lors de la recherche des pics de masse spécifiques du fragment pyrimidine ($m/z = 122$).

Parmi les composés naturels, nous ne signalerons que le 4-méthyl-4-heptène-3-one dont l'intensité du signal soit comparable à celle des produits de synthèse. Ce produit se forme lors de la dégradation thermique de la paille de riz [7]. Les autres constituants d'origine végétale présentent des signaux dont l'intensité est plus faible. Les composés que nous avons identifiés (5-hydroxy-5,6-dihydromaltol [8], ostholle [9-12], guaïol [13], eudesmol [14][15], erémanthine [16][17]) sont connus pour leurs utilisations dans des préparations médicinales des pharmacopées orientales.

L'analyse de la solution estérifiée confirme l'identification de l'ostholle dont le pic de faible intensité dans le chromatogramme de l'extrait brut est partiellement masqué par le pic intense de l'acide méfénamique. Elle permet également de mettre en évidence d'autres composés d'origine végétale dont les esters des acides palmitique, linoléique et oléique ainsi que celle du calarène [18], isomère structural de l'aristolane [19], également utilisés en Orient pour leurs propriétés thérapeutiques.

Les composés de synthèse tels que l'ester de l'acide parachlorobenzoïque (agent de conservation) et l'indométhacine (analgésique) ont également été identifiés. L'étude de l'indométhacine par GC/MS avait montré qu'il n'était identifiable que sous sa forme estérifiée [20].

La liste des produits d'origine végétale et leur provenance probable sont reportés dans le tab. 1.

L'identification de composés organiques par GC-FTIR est un moyen analytique puissant et récent qui se heurte au nombre insuffisant de spectres de référence pour les produits en phase vapeur. Notre étude a porté sur les produits de synthèse (4-méthyl-5-thiazoleéthanol, diazépam, acide méfénamique) qui ont pu être observés par cette technique, les autres constituants trop dilués n'ayant pu être détectés. La réalisation de spectres de référence et leur comparaison aux spectres expérimentaux permet une caractérisation extrêmement fiable d'un composé.

L'étude quantitative par chromatographie liquide haute performance (HPLC) permet le dosage simultané des cinq produits de synthèse dont l'ordre d'éluion par le système A (MeOH/ H_3PO_4) est l'hydrochlorothiazide ($t_R = 0,89$), le 4-méthyl-

Tab. 1. Composés naturels identifiés par chromatographie en phase gazeuse associée à une spectrométrie de masse

Pic ^{a)}	Composés	Origine	Réf.
A	5-hydroxy-5,6-dihydromaltol	malt	[8]
B	4-méthyl-4-hepten-3-one	dégradation thermique de la paille de riz	[7]
C	Guaiol	<i>Balsamum toltanum</i> <i>Linné-guaiac</i> <i>Myroxylon balsamum</i>	[13]
D	Eudesmol	<i>Sphaeranthus indicus</i> (L.) <i>Libanotis buchtoriaensis</i> (FISCH)	[14][15]
F)	Erémantine	<i>Eremanthus incanus</i> <i>E. Eleaeagnus</i> (SCH.-BIP)	[16][17]
G	Ostholle	<i>Angelica pubescens</i> (MAXIM) <i>Angelica japonica</i> (A. GRAY) <i>Angelica polymorpha</i> (MAXIM)	[9-12]
C'	Calarene or aristolane	<i>Aristolochia debilis</i> (SIEB. et ZUCC)	[18]
D'	Aristolone	<i>Asarum dense</i> <i>Allium species</i> (A. chinense)	[19]

^{a)} Référence du pic sur le chromatogramme de la fig. 1.

Tab. 2. Teneur (mg/pilule) en composés thérapeutiques de synthèse déterminée par HPLC-DAD (x: valeur moyenne, S_x: écart type)

Pilules	1	2	3	4	x	S _x
Poids (mg)	425	390	374	439	407	30,1
Hydrochlorothiazide	2,8	1,7	2,1	1,3	1,9	0,6
Diazépam	1,5	1,0	1,1	1,3	1,2	0,2
Indométhacine	3,4	3,6	3,7	3,5	3,5	0,1
Acidéméfénamique	13,2	11,2	12,0	11,6	12,0	0,9

5-thiazoleéthanol ($t_R = 1,22$), le diazépam ($t_R = 2,22$), l'indométhacine ($t_R = 3,89$) et l'acide méfénamique ($t_R = 6,47$). Le système B a été utilisé pour contrôler les résultats précédents car il permet une meilleure séparation de l'hydrochlorothiazide et du 4-méthyl-5-thiazoleéthanol. L'étude préliminaire, effectuée avec un détecteur à barette de diodes (DAD), permet de déterminer pour chaque produit de référence son temps de rétention relatif ainsi que son absorption dans l'ultraviolet entre 190 et 370 nm. Ces informations permettant de contrôler la 'pureté' d'un pic en utilisant deux paramètres indépendants (temps de rétention et absorption UV) conduisent à des identifications et des analyses de très grande fiabilité. Ce mode d'identification a permis de mettre en évidence la présence d'hydrochlorothiazide (diurétique) qui n'avait pas pu être observé par les techniques analytiques précédentes.

Les résultats obtenus pour l'analyse de

4 pilules d'un même lot montrent une hétérogénéité importante des mélanges (tab. 2), la variation de la teneur en hydrochlorothiazide, e.g., pouvant varier d'un facteur deux.

Conclusion

L'étude des pilules *chui-fong-toukuwan* par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques performantes a permis de montrer que la nature végétale des constituants n'était pas seule responsable de l'effet thérapeutique souhaité de ce médicament.

La présence de molécules de synthèse (hydrochlorothiazide, 4-méthyl-5-thiazoleéthanol, diazépam, indométhacine et acide méfénamique) a pu être démontrée sans ambiguïté. Ces principes actifs de nombreux médicaments de la pharmacopée moderne participent certainement par

leurs effets 'bénéfiques' à la réputation de ces préparations.

Les molécules d'origine végétale que nous avons caractérisées sont également utilisées dans des préparations médicinales orientales, dont les effets sont peu connus. Elles ne doivent pas être négligées même si leurs concentrations semblent beaucoup plus faibles que celles des molécules de synthèse.

La mise en évidence, par des méthodes quantitatives, d'une grande variation des teneurs en principe actif trouve probablement son origine dans la fabrication artisanale de ces préparations.

La comparaison de nos analyses avec celles effectuées précédemment dans des laboratoires américains [1][2][5] montre que, sous une même appellation, la nature des constituants et leur concentration est variable.

De telles préparations, illicitement distribuées et frauduleuses, échappent à tout contrôle de qualité et peuvent présenter un danger pour la santé publique. Elles doivent faire l'objet de surveillance.

Nous voudrions tout particulièrement remercier Mme. *Silvia Stasny* et M. *Yves Janin* pour leur aide précieuse ainsi que le Dr. *Marco Simona* pour sa participation à l'interprétation des spectres de masse.

Reçu le 23 janvier 1992

- [1] C.A. Ries, Mervyn A. Sahud, MD, *JAMA* **1975**, 231, 352.
- [2] S. Yuen, C.A. Lau-Cam, *J. Chromatogr.* **1985**, 329, 107.
- [3] P.J.G. Forster, *Br. Med. J.* **1979**, 1, 308.
- [4] a) L. Offerhaus, M.N.G. Dukes, H.M. Smits, *Br. Med. J.* **1979**, 1, 669; b) G. Newton, *ibid.* **1979**, 1, 669.
- [5] A.J.C. Ethier, G. Lauriault, M. LeBelle, B.A. Lodge, C. Savard, W.-W. Sy, W.L. Wilson, *J. Chromatogr.* **1989**, 469, 406.
- [6] Office of Standard Reference Data, National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD 20899
- [7] A.E. Lipska-Quinn, S.H. Zeronian, K.M. Mc Gee, *Fondam. Thermochem. Biomass Convers. Pap-Int. Conf.* **1985**, 453-71.
- [8] R. Tressl, B. Helak, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 483.
- [9] T. Kosuge, M. Yokota, K. Sugiyama, T. Yamamoto, T. Mure, H. Yamazawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 5351.
- [10] M. Kozawa, K. Baba, Y. Matsuyama, K. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 1782.
- [11] Y. Kumar, J. Reisch, D.B. M. Wichremaratne, R.A. Hussain, K.S. Adesina, S. Balasubramaniam, *Photochemistry* **1987**, 26, 511.
- [12] K. Baba, K. Hata, Y. Kimura, Y. Matsuyama, M. Kozawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 2565.
- [13] H.D. Friedel, R. Matusch, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1616.
- [14] J.S. Sohoni, S.R. Rojatkari, M.M. Kulkarni, N.N. Dhaneshwar, S.S. Tavale, N.G. Tayur, B.A. Nagasampagi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1988**, 157.