



**LAM**  
LABORATOIRE  
D'ANALYSE  
DES MÉDICAMENTS

Université  
de Liège



Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

**UTILISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE  
POUR L'ANALYSE DE MOLÉCULES PHARMACEUTIQUES  
ET BIOPHARMACEUTIQUES  
DANS LE CONTEXTE DE LA CONTREFAÇON MÉDICAMENTEUSE**

**Caroline Lamalle**  
Pharmacienne

Professeur Marianne Fillet

2015







Université  
de Liège



Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

UTILISATION DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE  
POUR L'ANALYSE DE MOLÉCULES PHARMACEUTIQUES  
ET BIOPHARMACEUTIQUES  
DANS LE CONTEXTE DE LA CONTREFAÇON MÉDICAMENTEUSE

**Caroline Lamalle**  
Pharmacienne

Professeur Marianne Fillet

2015



*Je tiens à remercier tout particulièrement Marianne pour sa supervision, sa disponibilité et ses bonnes idées tout au long de ma thèse, ainsi qu'Anne-Catherine et Jacques Crommen pour leurs précieux conseils à chaque fois que j'en ai eu besoin.*

*Je remercie également les personnes du Laboratoire de Chimie Analytique (Philippe Hubert, Roland, Benjamin, Pierre,...) pour leur aide principalement dans le cadre de l'étude des antipaludiques, et le Docteur Radermecker pour nous avoir permis d'obtenir les différentes insulines.*

*J'adresse mes sincères remerciements aux membres du Comité de Thèse et aux membres du Jury pour avoir suivi l'évolution de mes résultats et avoir pris le temps de s'intéresser à ce travail.*

*Merci aussi aux institutions et organismes ayant apporté leur contribution financière, l'Université de Liège, le Fond National de la Recherche Scientifique et le Fonds Léon Fredericq.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à tous mes collègues qui, grâce à leur bonne humeur, ont rendu ces années de travail bien plus qu'agréables.*

*Vi, ça va être difficile de retrouver une partenaire de bureau aussi géniale que toi ! Aurore, partenaire n°2, je te fais confiance pour garder ce bureau au top ! Vir, les trajets Vottem-CHU avec toi vont me manquer ! Vincent, continue à être aussi disponible et au courant de tout ! Gaël, bien que normalement qu'à moitié dans le service, tu es indispensable à nous tous ! Elena, je compte sur toi pour prendre soin des CE (et de la qualité) ! Laurent, bonne continuation dans tes travaux et tes rébus ! Naïma, bienvenue au LAM, garde ton sourire et ta motivation ! Bérangère, merci pour l'enthousiasme que tu mets dans chacune de nos demandes ! Cédric, tu es déjà parti depuis plusieurs mois mais je te souhaite bon vent au Luxembourg ! Vous allez vraiment tous me manquer !*

*Bien sûr, je n'oublie pas non plus les « co-locataires » de chez ATC (Patrice, Jean-Claude, Laurence, Thomas, Enza), les doctorants en co-tutelle (Inès, Radu, Hanène), les anciens doctorants (Anne, François, Sylvestre) et les stagiaires étrangers et belges (notamment Diane, co-équipière d'insuline).*

*J'aimerais également remercier tous mes amis, et spécialement Marine pour tous ces temps de midi partagés, ainsi que ma famille et surtout mes parents pour leur présence discrète mais infiniment réelle.*

*Enfin, merci à toi, Nico, d'être à mes côtés depuis le début de cette aventure. Merci pour ta joie de vivre, ta persévérance, ta générosité, et toutes les ondes positives que tu propages autour de toi.*

**MERCI**

*Caroline*



<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>Section 1. La contrefaçon de médicaments: un problème grandissant</b>	<b>3</b>
1. Qu'est-ce que la contrefaçon médicamenteuse ?	7
1.1. Les définitions	7
1.2. Les différents types de médicaments contrefaits	8
2. Quelle est son étendue ?	9
2.1. La situation mondiale	9
2.2. Les médicaments cibles	11
3. Pourquoi est-elle si présente ?	12
3.1. Son mode d'infiltration	12
3.2. Les attraits pour les contrefacteurs	13
3.3. Les attraits pour les consommateurs	14
4. Quelles en sont les conséquences ?	14
4.1. La santé	14
4.2. L'économie	16
4.3. La sécurité	16
5. Que pouvons-nous faire pour réagir ?	17
5.1. L'éducation	17
5.2. La sanction	17
5.3. La coopération	18
5.4. La détection	21
<b>Section 2. Les biopharmaceutiques: un challenge analytique</b>	<b>29</b>
1. Que sont les biopharmaceutiques ?	33
1.1. Leur émergence	33
1.2. Leur production	34
1.3. Leur conception	34
1.4. Leur présence sur le marché	36
1.5. Les « biosimilaires »	37
2. Comment les analyser ?	39
2.1. L'utilité	39
2.2. Les difficultés	39
2.3. Les techniques analytiques	41
3. Quel rôle joue l'électrophorèse capillaire ?	43
3.1. Son importance	43
3.2. Les modes de séparation et paramètres principaux	43
3.3. L'adsorption	46
3.4. La détection	47
<b>Section 3. Références</b>	<b>49</b>



<b>CHAPITRE II. OBJECTIFS</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE III. RESULTATS</b>	<b>63</b>
<b>Section 1. Etude des paramètres influençant la mobilité électrophorétique en MEKC</b>	<b>65</b>
<i>Micellar electrokinetic chromatography systems for the separation of mixtures of charged and uncharged compounds</i>	69
<b>Section 2. Séparation de petites molécules médicamenteuses appartenant à la même classe pharmacologique</b>	<b>89</b>
<i>Development of a generic micellar electrokinetic chromatography method for the separation of 15 antimalarial drugs as a tool to detect medicine counterfeiting</i>	93
<b>Section 3. Séparation de biopharmaceutiques structurellement très proches</b>	<b>115</b>
1. Insuline humaine et ses 5 analogues synthétiques	
1 <sup>er</sup> article	119
<i>Développement de méthodes séparatives pour détecter la contrefaçon de molécules biosynthétiques comme l'insuline et les GHRP</i>	121
2 <sup>ème</sup> article	133
<i>Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography</i>	135
2. Insulines humaine, bovine et porcine	157
<i>Separation of human, bovine and porcine insulins, three very closely related proteins, by micellar electrokinetic chromatography</i>	159
3. Protamine	171
<i>Analysis of protamine peptides in insulin pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis</i>	173
<b>CHAPITRE IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>189</b>
<b>CHAPITRE V. RESUME DE LA THESE</b>	<b>195</b>
<b>CHAPITRE VI. THESIS SUMMARY</b>	<b>199</b>
<b>CHAPITRE VII. LISTE DES PUBLICATIONS</b>	<b>203</b>
1. Articles scientifiques	205
2. Communications orales	206
3. Posters	206
Références des photos utilisées pour la couverture	209





# CHAPITRE I

## INTRODUCTION GÉNÉRALE



## Section 1

La contrefaçon de médicaments :  
un problème grandissant



*« Les contrefacteurs sont des criminels opportunistes motivés par le profit. »*

(K. Karunamoorthi)





## 1. Qu'est-ce que la contrefaçon médicamenteuse ?

### 1.1. Les définitions

#### *Médicament contrefait*

La définition de médicament contrefait manque d'harmonisation, elle varie d'un pays à l'autre en fonction de la loi et du contexte [1].

La plus répandue est néanmoins celle proposée en 1992 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui définit un médicament contrefait comme un médicament dont l'identité et/ou l'origine est délibérément et frauduleusement falsifiée [2]. Plus récemment, l'OMS propose plutôt la notion de médicament SFFC («Spurious/Falsely labeled/Falsified/Counterfeit») ou SSFFC («Substandard/SFFC») [3, 4]. Un médicament sous-standard est un médicament légal mais qui ne rentre pas dans les spécifications de qualité [4]. Beaucoup de médicaments sous-standards circulent dans les pays en développement et cela peut s'expliquer par un problème de stabilité lié à des mauvaises conditions de stockage ou de transport, ou par un contrôle insuffisant du procédé de fabrication [4]. Ils peuvent être considérés comme contrefaits si le manque de qualité était délibéré [4]. Le terme SSFFC est donc très générique, il tente de regrouper tous les médicaments de mauvaise qualité sans renseigner sur la cause. Il est en effet souvent difficile de savoir s'ils sont le résultat d'une contrefaçon délibérée ou plutôt d'un problème non désiré lors de la fabrication, le stockage ou le transport [1]. L'utilisation d'un terme générique est une bonne chose puisque l'important est d'identifier tous les médicaments de mauvaise qualité et également ceux de bonne qualité mais dont l'emballage est frauduleux.

Néanmoins, tous ces termes rendent le problème plus ambigu. En effet, dans la plupart des articles et documents consultés, c'est principalement le mot « contrefait » qui est utilisé. Mais tient-il compte des médicaments sous-standards ? Dans cette introduction, nous utiliserons plutôt le mot « contrefait » pour le terme SFFC qui regroupe les médicaments illégaux de tous types mais les sous-standards ne seront pas abordés.

#### *Propriété intellectuelle*

La propriété intellectuelle est un terme qui revient très régulièrement quand la contrefaçon est évoquée.

La propriété intellectuelle représente les travaux et les innovations reconnus de quelqu'un qui bénéficie alors des droits exclusifs et d'une protection légale [5]. Cette protection est importante pour la croissance économique puisqu'elle encourage la société à innover [5].

La contrefaçon peut donc se référer à une violation de la propriété intellectuelle [3]. Les industries du médicament peuvent donc porter plainte mais la peine ne prend généralement en considération que la violation de propriété intellectuelle et pas le problème de santé publique sous-jacent [3].

## 1.2. Les différents types de médicaments contrefaits

Les médicaments contrefaits sont généralement des produits de mauvaise qualité et les raisons de cette moindre qualité peuvent être diverses.

- Les médicaments peuvent n'avoir aucun principe actif (PA). L'OMS estime la proportion de médicaments sans PA à 32% des contrefaçons [6]. Ce pourcentage varie d'un endroit à l'autre et d'un médicament à l'autre. Concernant les antipaludiques contrefaits par exemple, 60% ne contiendraient pas de PA [7].
- La concentration en PA peut être en dehors des spécifications, généralement plus faible mais parfois plus importante.
- Les médicaments peuvent aussi contenir une autre molécule. Dans ce cas, le PA est souvent remplacé par une autre substance active moins chère.

Mais cela ne s'arrête pas là. Même si le médicament contient le PA original en quantité adéquate, il peut malgré tout être contrefait.

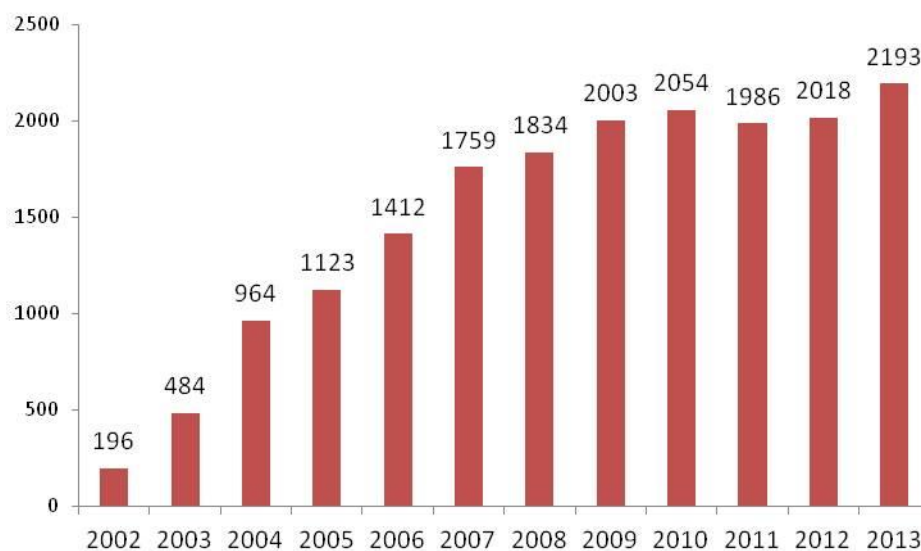
- Des matières premières de qualité bien plus faible ou même périmées peuvent être utilisées dans la fabrication, apportant des impuretés ou des produits de dégradation.
- Il peut aussi y avoir d'autres composants néfastes comme de l'eau non stérile, des acides forts, des colorants toxiques,...
- Le procédé de fabrication lui-même peut être différent de celui autorisé.
- L'uniformité de masse peut s'avérer non conforme.
- Des locaux non réglementés peuvent aussi ne pas assurer une conservation adéquate des médicaments.
- Le médicament peut être produit dans une industrie non autorisée se faisant passer pour une autre. Dans ce cas, l'emballage et la documentation associée sont souvent falsifiés.

## 2. Quelle est son étendue ?

### 2.1. La situation mondiale

Le « Pharmaceutical Security Institute » (PSI) réalise un recensement des incidents de contrefaçon médicamenteuse depuis 2002. La Figure 1 semble montrer que le nombre de cas a fortement augmenté en quelques années pour se stabiliser aux alentours des 2000 cas par an, bien que l'année 2013 renseigne presque 2200 cas [8].

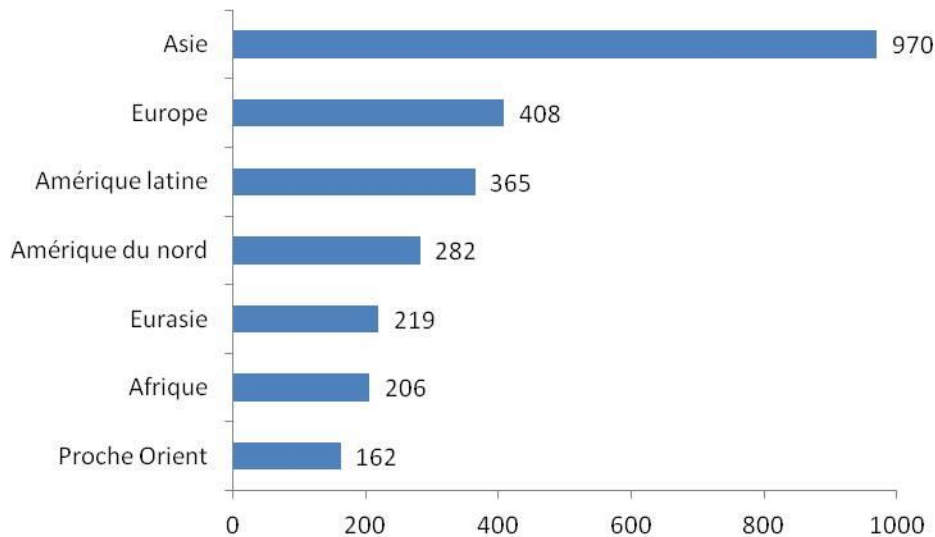
Mais il faut prendre tous ces chiffres avec précaution. La croissance pourrait être due à l'augmentation de la vigilance et des contrôles. De plus, ils ne reflètent que le sommet de l'iceberg puisque la plupart des contrefaçons ne sont pas détectées. Il est donc très difficile de quantifier l'étendue du problème. Toutefois, savoir que les chiffres sont sous-estimés ne fait que renforcer la gravité du problème.



**Figure 1.** Nombre d'incidents de contrefaçon médicamenteuse par année.

Reproduite à partir de [8]

L'OMS estime que plus de 10% des médicaments du monde entier sont contrefaits [9]. Bien entendu, l'incidence varie beaucoup d'un pays à l'autre ainsi qu'à l'intérieur d'un même pays. Même si la contrefaçon dans les pays industrialisés augmente légèrement, de par la vente sur internet, la proportion reste inférieure à 1% de la valeur du marché [9]. Par contre, la contrefaçon toucherait en moyenne entre 10 et 30% des médicaments vendus dans les pays en développement et pourrait atteindre 60% dans certaines régions d'Asie, d'Afrique ou d'Amérique latine [9].



**Figure 2.** Nombre d'incidents de contrefaçon médicamenteuse par région du monde (2013).

Reproduite à partir de [10]

La Figure 2 montre la répartition dans le monde des faits de contrefaçon médicamenteuse recensés par le PSI en 2013. Il faut cependant être bien conscient que la répartition géographique peut être biaisée puisqu'elle dépend des cas détectés. Par exemple, l'incidence en Afrique semble modérée sur cette figure alors que c'est une région du monde extrêmement touchée par la contrefaçon des médicaments, mais le manque de contrôle notamment rend la révélation des contrefaçons plus faible. L'Asie est clairement le continent le plus concerné d'après cette figure. D'autres sources affirment en effet que l'Asie est le plus grand fabricant de médicaments contrefaits, et principalement l'Inde, la Chine, puis la Thaïlande [3, 4]. A côté de ces fabricants, les Emirats Arabes Unis sembleraient jouer un rôle central dans l'exportation alors que ce serait en Afrique, en Asie mais aussi en Amérique latine que se trouverait le plus grand nombre de revendeurs [3]. En Afrique, incontestablement, beaucoup de médicaments sont vendus dans des points de vente non réglementés: dans des kiosques, sur des marchés ou en rue à l'aide de portoirs (Figure 3).



**Figure 3.** Exemples de points de vente non réguliers de médicaments en Afrique. [11-14]

## 2.2. Les médicaments cibles

Le marché de la contrefaçon s'étend à toutes les classes pharmacologiques mais certaines sont des cibles très prisées. Généralement, ces cibles sont des médicaments chers, mais dont le marché est souvent assez restreint, ou des médicaments à prix moyen mais avec un marché étendu [3].

Deux groupes peuvent être distingués : les médicaments essentiels dits « life-saving » et ceux pour le confort dits « lifestyle ».

Les pays en développement étant plus largement touchés par les maladies infectieuses, les médicaments contrefaits sont principalement des « life-saving » comme les antipaludiques, les antituberculeux et les antirétroviraux contre le SIDA [1, 3, 7]. Dans les pays industrialisés, les médicaments les plus touchés sont évidemment les narcotiques et les « lifestyle » (médicaments contre la dysfonction érectile ou la chute des cheveux, amaigrissants,...) mais aussi certains « life-saving » comme les médicaments contre le cancer, l'asthme, le diabète et les problèmes cardiovasculaires [3, 7]. Il est estimé qu'environ 50% des médicaments contrefaits dans le monde concernent les antimicrobiens (antibiotiques, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires) [4].

### 3. Pourquoi est-elle si présente ?

#### 3.1. Son mode d'infiltration

La contrefaçon médicamenteuse est devenue une grande industrie structurée, composée de fabricants, de grossistes, de distributeurs et de vendeurs locaux.

Généralement, les médicaments fabriqués dans des entreprises réglementées arrivent rapidement aux personnes de dernière ligne, à savoir les pharmaciens ou les médecins. Mais dans certains cas, la chaîne de distribution peut être très longue et chaque étape devient alors une opportunité pour les médicaments contrefaits d'entrer dans le circuit [5]. Il peut y avoir de la corruption à chaque niveau de la distribution, et certains pays semblent clairement faciliter les opérations clandestines [3]. Les contrôles sur les marchandises importées étant différents selon le pays d'origine, il n'est pas rare que la provenance des médicaments contrefaits soit masquée ou changée frauduleusement dans certaines zones de transit de commerce libre (« free trade ») [3]. Les organismes de réglementation souffrant, en plus de la corruption, d'un manque de moyens financiers et de personnel, les produits contrefaits peuvent se retrouver dans la chaîne légale, parfois sans même que les vendeurs n'en soient conscients [15, 16].

Dans les pays industrialisés où les systèmes de contrôle sont plus efficaces, la contrefaçon s'opère plutôt par la vente en ligne.

#### *Internet*

Le nombre de sites internet proposant l'achat de médicaments a fortement augmenté. L'OMS estime que plus de la moitié des médicaments vendus sur ces sites sont contrefaits [17].

Le plus souvent, les pharmacies en ligne font croire qu'elles sont localisées dans un pays (le Canada par exemple) et que les médicaments proposés sont également fabriqués dans ce pays mais en réalité elles peuvent être originaires de n'importe où. Une étude de 2005 a montré que seulement 214 sur 11 000 pharmacies en ligne contrôlées se disant canadiennes étaient réellement enregistrées au Canada, c'est-à-dire 2% [5]. Les Etats-Unis sont la cible principale de ces pharmacies en ligne qui sont les premiers fournisseurs de médicaments contrefaits par internet. En effet, l'achat de médicaments sur les pharmacies en ligne par des Américains représenterait 1 milliard de dollars par an [18].

### 3.2. Les attraits pour les contrefacteurs

#### *Avantage économique*

La contrefaçon de médicaments est incontestablement un commerce qui rapporte beaucoup.

En effet, vendre du sildénafil (médicament contre la dysfonction érectile) rapporterait jusqu'à 2000 fois plus que vendre de la cocaïne [5]. En 2010, les ventes mondiales en médicaments contrefaits étaient estimées à 75 milliards de dollars américains, alors qu'elles étaient estimées à 50 pour les drogues illicites [1, 3].

Comme déjà dit plus haut, les contrefacteurs choisissent bien leurs cibles, principalement des médicaments chers et/ou qui sont largement utilisés par la population. Une situation de pénurie de certains médicaments peut également rapidement être mise à profit par les trafiquants. Sur le marché parallèle, l'augmentation des prix de ces médicaments devenus rares peut être impressionnante. Dans une étude réalisée en 2011, cette augmentation était en moyenne de 650% mais pouvait monter jusqu'à 4000% du prix standard [19].

#### *Risque faible*

Non seulement la contrefaçon médicamenteuse a un avantage financier certain, mais en plus le risque de se faire démasquer et punir par la loi est très faible.

En comparaison avec le vendeur de cocaïne, le vendeur de médicaments contrefaits court un risque plus faible car la détection est plus difficile [5]. En effet, étant donné le nombre de médicaments importés et d'étapes possibles dans la chaîne de distribution, les contrôles ne sont pas toujours efficaces. Aussi, les fabricants font preuve de plus en plus de sophistications notamment au niveau de l'emballage, de telle sorte qu'il est très difficile, même pour des personnes averties, de distinguer les médicaments contrefaits des originaux [1, 7]. Sur internet également, les personnes responsables de contrefaçon sont difficilement identifiables grâce à l'anonymat [15]. Et, bien souvent, soit les patients ne vont pas suspecter leurs médicaments, soit ils ne voudront pas révéler qu'ils en ont achetés sur internet, surtout sans prescription [5].

La détection de contrefaçons n'est donc pas fréquente, mais même dans le cas où les trafiquants sont démasqués, la peine encourue n'est pas proportionnelle à la gravité des faits. Les pénalités sont trop faibles, elles sont d'ailleurs bien plus faibles que celles attribuées à la vente illégale de cocaïne. Généralement, elles sont au maximum de quelques milliers de dollars et/ou de quelques années de prison [5]. La cause majeure est le manque de mise à jour de la législation à ce sujet.



### 3.3. Les attrait pour les consommateurs

Pour les consommateurs de ces médicaments contrefaits, le principal attrait, même s'il n'est pas le seul, est bien sûr le coût plus faible.

Dans les pays en développement, le prix des médicaments originaux est bien souvent trop élevé pour la population. Certains pays proposent des traitements antipaludiques gratuits mais généralement dans les villes. Cependant, beaucoup de personnes ne peuvent s'y rendre facilement et préfèrent acheter ce qu'ils trouvent près de chez eux [7]. Les patients infectés par le VIH peuvent préférer se fournir en médicaments via une voie plus discrète pour éviter les stigmatisations [4]. Cette recherche de discrétion est également une des raisons qui font si bien fonctionner les ventes en ligne. L'achat par internet est également facile, rapide, pratique et permet parfois d'obtenir sans ordonnance des médicaments normalement soumis à prescription.

La majorité des consommateurs ne voient que des avantages. Ils ne sont pas conscients des dangers possibles lors de l'achat de médicaments via des points de vente non réglementés.

## 4. Quelles en sont les conséquences ?

La contrefaçon peut sembler être un crime sans victime... Cependant, la contrefaçon médicamenteuse pose de sérieux problèmes de santé, d'économie et de sécurité.

### 4.1. La santé

La contrefaçon de médicaments est majoritairement un problème de santé publique pouvant mener à des conséquences terribles pour les patients.

L'OMS estime à 100 000 le nombre de décès par an liés aux médicaments contrefaits en Afrique [16]! Et l'« International Policy Network » (IPN) estime que les médicaments contrefaits utilisés contre la malaria et la tuberculose tuent potentiellement 700 000 personnes par an dans le monde, soit presque 2000 personnes chaque jour [7, 16]!

Les médicaments n'ayant aucun PA non seulement empêchent les patients de guérir mais souvent aggravent leur état.

Niger, 1995 [3, 4] : des vaccins contrefaits sans PA ont été injectés à plus de 50 000 personnes pour combattre une épidémie de méningite. 2500 personnes sont mortes et beaucoup ont été handicapés à long terme.

De nombreux médicaments contrefaits contiennent une concentration inadaptée en PA. Généralement, celle-ci est plus faible et l'efficacité en est diminuée. Dans le cas des antimicrobiens, une teneur plus faible en PA peut entraîner une résistance de l'agent pathogène et ainsi diminuer l'effet des futurs traitements. Parfois, la concentration en PA est plus importante et la toxicité en est augmentée. Cette toxicité peut mener jusqu'à la mort, surtout quand l'index thérapeutique est étroit.

Chine, 2009 [3, 17, 18] : des antidiabétiques à base de glibenclamide contenant 6 fois plus de PA que la dose normale ont fait 2 morts et 9 hospitalisations graves.

Les médicaments dont le PA a été remplacé par un autre n'ont généralement pas la même activité et peuvent entraîner des effets indésirables sévères ainsi que des interactions non soupçonnées. Ils peuvent aussi simplement masquer les signes cliniques, faisant ainsi croire aux patients qu'ils guérissent alors que ce n'est pas du tout le cas.

Congo, 2004 [4] : Des antidépresseurs ont été retrouvés dans des contrefaçons à la place d'antirétroviraux.

Si le dosage en PA est correct, cela ne veut pas dire que le médicament est sans danger. En fonction de la nature et de la quantité, il est évident que les médicaments contenant des composés nocifs (eau non stérilisée, colorants et cires toxiques, acides forts, carcinogènes,...) sont néfastes pour la santé.

Haïti, 1995 et Nigéria, 2009 [20] : Un sirop pour la toux contaminé par du diéthylène glycol (un antigel) a fait 89 morts en Haïti et 84 au Nigéria, essentiellement des enfants. Cette préparation aurait d'ailleurs fait plus de 500 victimes partout dans le monde depuis les années 90 [5].

La contrefaçon crée des doutes à l'égard des médicaments, elle diminue la confiance de la population et la crédibilité des systèmes de santé et peut ainsi pousser les patients à une mauvaise compliance ou à l'utilisation d'alternatives moins adaptées [5, 7]. Les médecins aussi peuvent perdre confiance en l'efficacité des médicaments et recommander des traitements hors de prix, alors qu'ils ne sont pas vraiment nécessaires [4].

L'achat de médicaments par internet et sans prescription encourage aussi l'automédication et peut par conséquent entraîner des usages inappropriés et des abus.

#### 4.2. L'économie

Bien que les répercussions sur la santé soient les plus importantes, l'impact économique ne doit certainement pas être oublié.

Comme mentionné plus haut, le chiffre des ventes de médicaments contrefaits serait de l'ordre de 75 milliards de dollars américains par an. Cela peut démotiver les véritables industries pharmaceutiques à investir dans la recherche [5]. La contrefaçon réduit ainsi la croissance économique et le nombre d'emplois [5]. De plus, les médicaments qui ont été copiés peuvent avoir leur image entachée par un manque d'efficacité ou par l'apparition d'effets indésirables [3].

Les soins de santé sont aussi affectés, étant donné le nombre de complications médicales nécessitant fréquemment une hospitalisation.

Enfin, dans une moindre mesure, les patients sont affectés financièrement puisqu'ils ont dépensé de l'argent pour un produit sans effet ou avec des effets néfastes. D'autres médicaments, généralement plus chers, devront d'ailleurs bien souvent être achetés pour traiter la maladie initiale ou les effets indésirables engendrés.

#### 4.3. La sécurité

Finalement, la contrefaçon médicamenteuse peut aussi amener des problèmes de sécurité.

La commande en ligne par exemple peut conduire à des conséquences indésirables telles que la fraude par carte de crédit, le vol d'identité, l'apparition de nouveaux virus informatiques, ... [5].

Plus grave encore, l'ampleur du commerce illégal peut entraîner un sentiment d'insécurité et de la criminalité dans certains pays fortement touchés.

Certains groupes terroristes ou cartels de la drogue sont également impliqués dans ce trafic illégal. En effet, étant donné son caractère lucratif, la contrefaçon jouerait un rôle direct dans le financement de leurs activités [3, 21].

## 5. Que pouvons-nous faire pour réagir ?

Les actions à entreprendre pour lutter contre la contrefaçon des médicaments sont évidemment fortement liées aux causes du problème : manque d'information, de législation, de contrôle,...

### 5.1. L'éducation

Le premier niveau d'action à mettre en place est clairement l'information et l'éducation des consommateurs principalement mais également des professionnels de la santé.

Il faudrait organiser plus de campagnes de sensibilisation en insistant sur les dangers des médicaments contrefaits et sur la vigilance dont il faut faire preuve lors d'un achat. Un prix trop intéressant cache souvent une mauvaise qualité et le risque n'en vaut sûrement pas la peine [18]. Pareillement, des médicaments dont l'emballage est endommagé ou qui ont déjà été ouverts ne doivent jamais être acceptés [18]. Concernant la vente en ligne, les consommateurs ne doivent jamais acheter un médicament sans ordonnance s'il est soumis à prescription et doivent se renseigner sur la fiabilité de la pharmacie. Il existe des listes qui répertorient les pharmacies en ligne autorisées. En Belgique par exemple, la liste est tenue à jour par l'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (AFMPS) [22]. Une directive européenne propose aussi un logo commun qui permettrait d'identifier les sites de pharmacies légaux sur internet [23].

Les médecins et les pharmaciens doivent non seulement sensibiliser les patients à la problématique de la contrefaçon mais également acheter les médicaments à des fournisseurs fiables, suivre les alertes de contrefaçon, inspecter les médicaments douteux, et collaborer avec les autres intervenants de la chaîne de distribution ainsi qu'avec le gouvernement en cas de suspicion [24].

### 5.2. La sanction

Si la contrefaçon est si présente, c'est en grande partie parce que la sanction n'est pas suffisante pour un tel acte. Et si la sanction n'est pas suffisante, c'est parce que la législation n'est ni mise à jour, ni harmonisée.

En premier lieu, la définition de médicament contrefait doit impérativement être harmonisée dans tous les pays. Avoir une définition commune permettra ensuite de mettre en place une loi internationale appropriée ayant pour but la pénalisation de l'acte de contrefaçon médicamenteuse. Cette législation doit être suffisamment dissociée de la notion de propriété intellectuelle pour garantir une peine proportionnelle au crime tenant compte des conséquences sur la santé publique [3]. En 2011, le Conseil de l'Europe a élaboré une convention dite « MEDICRIME » qui constitue le

premier outil pénal criminalisant la contrefaçon médicamenteuse [25]. Cependant, toute la difficulté de mettre en place ce type de réglementation internationale réside dans le fait que, pour l'instant, chaque pays autorise et condamne des choses différentes. Par exemple, beaucoup de pays n'ont toujours pas de législation précise concernant la vente en ligne de médicaments. Chez nous, seules les pharmacies ouvertes au public autorisées en Belgique peuvent vendre par internet des médicaments à usage humain non soumis à prescription médicale et certains dispositifs médicaux, sous conditions très strictes [26]. Certains pays autorisent par contre des pharmacies en ligne à livrer des médicaments aux patients après avoir obtenu une ordonnance électronique délivrée par un médecin [23].

Quoi qu'il en soit, les sanctions doivent clairement être plus strictes qu'à présent pour décourager les contrefacteurs. Des peines d'emprisonnement de plus longue durée pourraient être instaurées. Des pénalités pourraient aussi être envisagées pour les médecins ou autres professionnels de la santé ayant manqué de prudence et ayant par conséquent fourni des médicaments contrefaits aux patients. Par exemple, en 2012 aux Etats-Unis, un cas d'antitumoral contrefait (bevacizumab, Avastin®) ne contenant pas le PA aurait impliqué des médecins voulant payer moins cher et ayant donc commandé chez des fournisseurs non autorisés [5, 17].

### 5.3. La coopération

Pour pouvoir lutter efficacement contre la contrefaçon des médicaments, une démarche internationale doit être mise en place, favorisant la coopération de toutes les personnes concernées de près ou de loin par cette problématique.

Ces dernières années, de nombreux groupes internationaux se sont formés et ont développé des programmes d'action dans ce but.

*IMPACT («International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce»)* [27, 28]

Ce groupe spécialisé a été créé en 2006 par l'OMS. Il est composé des états membres de l'OMS (presque 200) et des principaux acteurs engagés dans la lutte contre la contrefaçon, c'est-à-dire de nombreuses ONG, autorités de réglementation pharmaceutique, autorités chargées de la répression, associations représentant les fabricants de produits pharmaceutiques, grossistes, professionnels de la santé et même patients.

Son programme s'articule autour de 5 groupes de travail :

- « Législation » pour évaluer les lacunes des législations nationales et internationales ou élaborer une législation modèle.

- « Aspects réglementaires » pour promouvoir les bonnes pratiques de fabrication et de distribution, développer des outils de formation ou de collecte de données.
- « Application de la loi, répression » pour augmenter les ressources disponibles pour appliquer les mesures de répression, améliorer les compétences des agents de terrain ou faciliter la coordination entre les pays.
- « Technologie » pour favoriser le développement de technologies destinées principalement à détecter les produits contrefaits.
- « Communication » pour élaborer des messages adaptés aux différentes cibles, assurer une meilleure diffusion de l'information et assister les autorités de chaque pays dans leurs opérations de sensibilisation.

#### *Interpol [27, 28]*

C'est la plus grande organisation internationale de police du monde. Elle est membre du groupe IMPACT. Une unité spécialisée (MPCPC, pour « Medical Products Counterfeiting and Pharmaceutical Crime ») a été créée en 2010 et a pour principales missions de coordonner les opérations sur le terrain pour déjouer les réseaux criminels transnationaux et de former les principaux acteurs engagés dans la lutte contre la criminalité pharmaceutique.

Depuis 2008, Interpol mène notamment les opérations « Pangea » contre le commerce de médicaments contrefaits sur internet. En 2014 par exemple, Pangea VII qui rassemblait 111 pays, a permis de fermer 10 600 sites web, de saisir 20 000 colis et d'arrêter 239 personnes.

#### *Organisation Mondiale des Douanes (OMD) [27, 28]*

Cette organisation regroupe 179 membres dont les trois quarts sont des pays en développement. Elle a pour but d'améliorer l'efficacité des administrations des douanes à travers le monde en les aidant à faciliter le commerce et à sécuriser les échanges. Elle se trouve en première ligne dans la lutte contre la contrefaçon de médicaments. En effet, 70 % des saisies de contrefaçon dans le monde sont réalisées par les services douaniers (Figure 4).

Ces trois groupes internationaux jouent chacun un rôle important dans ce combat mais ils ont été choisis à titre d'exemple et sont loin d'être les seuls. De plus, il existe aussi de nombreuses associations nationales ou régionales jouant un rôle plus discret et plus local.





Figure 4. Exemples de contrôles et de saisies de médicaments contrefaits. [29-32]

La coopération existe donc bien mais elle apparaît insuffisante face à l'ampleur du problème. Il faudrait la rendre encore plus globale, réactive et efficace. Elle pourrait même s'étendre aux banques, aux services postaux et aux moteurs de recherche sur internet qui pourraient avertir les autorités en cas de suspicion de trafic illégal de médicaments [3].

Pour diminuer quelque peu la croissance de la contrefaçon médicamenteuse, les différents pays pourraient aussi s'entraider afin de contrôler le nombre d'intervenants dans la chaîne de distribution, d'éviter les pénuries de certains médicaments et de proposer aux pays en développement des médicaments originaux à un prix plus abordable [4, 5].

#### 5.4. La détection

La détection des médicaments contrefaits est importante aux yeux de toutes les organisations, pour éviter des problèmes de santé aux patients, pour punir les responsables et diminuer l'incidence de la contrefaçon.

Malheureusement, les trafiquants ont recours à des techniques de plus en plus sophistiquées, faisant de leurs imitations des produits d'apparence presque parfaite et rendant très difficile la détection de contrefaçons. Il faut donc encore renforcer le contrôle à toutes les étapes de la chaîne de distribution.

Une approche à trois niveaux peut être proposée pour contrôler les médicaments. Le premier concerne l'inspection visuelle, le deuxième concerne des méthodes pouvant être réalisées sur le lieu de contrôle et le dernier des méthodes à réaliser en laboratoire avec un équipement particulier.

##### Premier niveau

La première étape est bien entendu l'analyse visuelle de l'emballage, en faisant attention à toutes les inscriptions, puis de la forme médicamenteuse (forme, couleur, poinçon, homogénéité, consistance, odeur,...).

Il est important pour les firmes pharmaceutiques d'essayer de protéger au maximum leurs médicaments, en les identifiant de plusieurs manières. L'idéal est d'avoir une caractéristique facilement identifiable par les patients (par exemple un hologramme ou un système mPedigree (voir ci-après)), une autre plus discrète pour les pharmaciens ou les médecins (un code-barres, un numéro d'identification, un DataMatrix ou une étiquette vérifiable par radio-fréquence RFID (voir ci-après)) et encore une plus sophistiquée pour les fabricants eux-mêmes (par exemple un nano code, un marqueur chimique, UV ou ADN) [5].



### Système mPedigree [16, 33]

C'est un système de vérification par téléphonie mobile principalement utilisé en Afrique. Certains fabricants peuvent faire figurer un code unique sur les emballages, sous forme d'étiquettes à gratter. Le patient qui achète le médicament gratte l'étiquette, envoie le code gratuitement par SMS et reçoit instantanément une réponse informant de l'authenticité (Figure 5).



Figure 5. Système mPedigree. [34, 35]

### DataMatrix [33]

C'est un code bidimensionnel qui se présente sous la forme de points juxtaposés dans un carré (Figure 6). Il permet de coder de manière compacte des informations telles que le code produit, le numéro de lot, la date de péremption, le numéro de série, etc. C'est donc un code de traçabilité et d'authenticité que le pharmacien contrôle avant de remettre le médicament au patient. L'OMS recommande l'utilisation de DataMatrix, bien que cela ne soit pas encore obligatoire dans tous les pays. En Belgique, il est prévu que le code DataMatrix soit seulement obligatoire en 2022.



**Figure 6.** Système DataMatrix. [36, 37]

*RFID («Radio Frequency IDentification»)* [5, 33]

Ce système d'identification repose sur l'apposition d'un « radio chip » sur le produit, une étiquette émettant des ondes radio (Figure 7). Le lecteur RFID permet de lire les étiquettes même à travers des fines couches de matériau (du carton par exemple). Ce système est recommandé par la « Food and Drug Administration » (FDA) mais en réalité il est peu utilisé, notamment à cause de son coût.



**Figure 7.** Système RFID. [38, 39]

En Belgique, nous ne sommes pas très familiarisés à ces systèmes de protection. Les pharmaciens ne contrôlent principalement que le code unique EAN (« European Article Numbering ») qui se retrouve sous forme de code-barres sur les médicaments soumis à prescription et qui permet effectivement une traçabilité.

Si les organisations mondiales jugent que ces systèmes plus élaborés sont nécessaires, il faudrait peut-être en choisir un seul, commun à tous et qui ne serait pas trop contraignant tout en restant efficace et difficile à imiter.

## Deuxième niveau

Dans le deuxième niveau, se retrouvent les tests simples, rapides, et à pouvoir réaliser sur place par le personnel de contrôle.

Les techniques de choix pour un premier criblage de la composition des médicaments sont la colorimétrie et la chromatographie sur couche mince (CCM) [1, 4]. Bien que ces techniques ne soient pas très spécifiques, elles peuvent être considérées comme qualitatives et semi-quantitatives, en évaluant l'intensité de la coloration ou de l'absorbance UV [1]. Elles sont en plus bon marché.

*GPHF («Global Pharma Health Fund») Minilab® [1, 33]*

Ce Minilab® porte bien son nom puisqu'il s'agit d'un laboratoire d'analyse mobile et compact, composé de seulement 2 mallettes (Figure 8). Il permet de réaliser un contrôle de qualité sur place grâce à 4 tests : inspection visuelle, désintégration, colorimétrie et CCM. Il contient une notice explicative comprenant aussi les résultats attendus pour une cinquantaine de médicaments.



**Figure 8.** Les 2 mallettes du GPHF Minilab®. [40]

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle, comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie proche infrarouge (NIR) et le Raman, se sont également beaucoup développées pour le contrôle des médicaments [41-44]. Elles donnent des informations sur la structure moléculaire et la distribution spatiale des composants dans le médicament, tout en étant non destructives, rapides et relativement simples [1]. Au départ, ces techniques sont chères mais certains fabricants ont mis au point des appareils moins chers, simplifiés et portatifs ; c'est pourquoi elles se retrouvent dans le deuxième niveau de contrôle [1, 3].

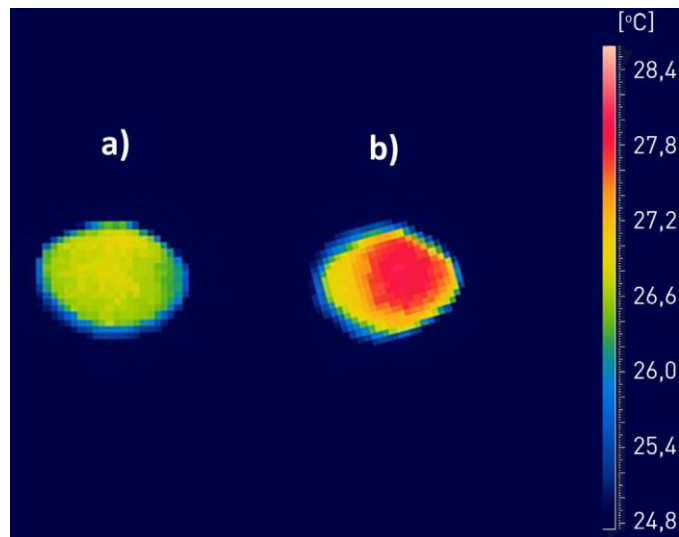
*Truscan*® [1, 16, 33]

*Truscan*® est un exemple de spectromètre Raman portable. Il s'utilise directement sur la forme médicamenteuse ou à travers l'emballage (plastique, blister, verre,...) (Figure 9). Il s'avère être d'une grande utilité dans les aéroports et les postes frontaliers, grâce à sa simplicité d'utilisation et sa rapidité (moins d'une minute pour obtenir le résultat).



**Figure 9.** Spectromètre Raman portable *Truscan*®. [45, 46]

Une étude très récente propose aussi une analyse thermique pour distinguer les médicaments falsifiés des originaux [47]. Cette technique consiste à chauffer les comprimés à 60°C pendant 10 minutes par exemple puis à les filmer par caméra infrarouge jusqu'à ce qu'ils reviennent à température ambiante. Des différences de température peuvent être observées selon la composition chimique (Figure 10). C'est une technique assez bon marché et rapide mais qui nécessite d'avoir au moins un four et un comprimé original pour pouvoir faire la comparaison. Il n'est donc pas évident de savoir si elle a plutôt sa place dans le deuxième ou le troisième niveau.



**Figure 10.** Thermogrammes de comprimés Viagra® contrefaits (a) et originaux (b), 6 minutes après un chauffage à 60°C. [47]

### Troisième niveau

Des tests plus précis mais demandant plus de temps et de moyens sont généralement réalisés en cas de suspicion [3].

Les techniques chromatographiques simples sont les plus utilisées même s'il est parfois nécessaire de recourir à des techniques plus perfectionnées, comme la spectrométrie de masse. Elles permettent l'analyse qualitative et quantitative des médicaments mais doivent être réalisées en laboratoire par un personnel formé. De plus, elles sont chères et assez lentes (quelques jours pour fournir le résultat). Des méthodes par électrophorèse capillaire [48, 49] ou par chromatographie gazeuse [50] ont été développées pour le contrôle de médicaments contrefaits mais les méthodes par chromatographie liquide restent majoritairement les méthodes de référence [1, 51].

Il y a quelques années, un équipement de faible coût basé sur l'électrophorèse capillaire a été mis au point en Suisse dans le but d'être utilisé par les pays en développement pour contrôler les médicaments (Figure 11) [52].

Quel que soit le niveau de contrôle, toutes ces technologies ont un coût non négligeable et sont donc parfois difficiles à mettre en place dans certains pays, qui sont le plus souvent, malheureusement, ceux qui en auraient le plus besoin.



**Figure 11.** Electrophorèse capillaire de faible coût ECB. [53]



## Section 2

Les biopharmaceutiques :  
un challenge analytique





*« En terme de production, formulation et contrôle qualité,  
les protéines thérapeutiques posent beaucoup de défis  
par rapport aux petites molécules. »*

(A. Staub)



## 1. Que représentent les biopharmaceutiques ?

Les biopharmaceutiques, appelés aussi biomédicaments ou « biologics » en anglais, sont des médicaments obtenus par biotechnologie et non par synthèse chimique comme les petites molécules.

### 1.1. Leur émergence

Les avancées en biologie moléculaire et en ingénierie génétique ont entraîné un énorme progrès dans la compréhension des maladies [54]. Par conséquent, la biotechnologie a permis de développer des traitements pour toute une série de maladies sévères. Partout dans le monde, plusieurs millions de patients ont déjà bénéficié de biomédicaments pour traiter les cancers, les infarctus, la sclérose en plaques, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde et des maladies auto-immunes [55]. A côté de leur action thérapeutique, certains biomédicaments peuvent aussi avoir une utilité dans le diagnostic (comme la tuberculine, utilisée pour dépister la tuberculose).

Ces biomédicaments regroupent différents types de médicaments dont le principe actif est produit à partir d'une source biologique. Ils peuvent donc être des anticorps, des vaccins, des enzymes, des hormones, des facteurs sanguins, des facteurs de croissance, des interférons, etc.

En 1982, la FDA approuve le premier biopharmaceutique : Humulin®, à base d'insuline humaine [56, 57]. Cette protéine, obtenue par la technologie de l'ADN recombinant, est utilisée dans le traitement du diabète, en comblant le déficit de l'insuline produite naturellement. Successivement, d'autres protéines recombinantes ont été développées, comme l'érythropoïétine, l'interféron alpha et les hormones de croissance [57, 58]. Puis, à partir des années 90, des anticorps thérapeutiques (comme l'infliximab, le trastuzumab et le rituximab) sont arrivés sur le marché pour devenir maintenant la classe de biomédicaments la plus importante d'un point de vue clinique et commercial [57, 58]. A présent, de nombreux produits biothérapeutiques de tout type sont encore développés, de plus en plus innovants. Au vu de l'évolution des technologies et du succès des biomédicaments sur le marché, leur avenir semble effectivement prometteur.

Les biomédicaments ont des structures très différentes des médicaments issus de la synthèse chimique, ce qui rend notamment leur développement et leur production plus complexes et plus coûteux.

## 1.2. Leur production

La plupart des protéines thérapeutiques sont dites recombinantes car elles sont produites par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique.

Premièrement, la séquence d'ADN correspondant à la protéine recombinante est isolée avant d'être transférée dans la cellule hôte [59]. Cette cellule peut être une bactérie (principalement *Escherichia Coli*), une levure, une cellule de mammifère (ovaire de hamster par exemple), mais aussi une cellule d'insecte, une cellule végétale ou des animaux transgéniques (la chèvre par exemple qui exprime les produits recombinants dans son lait) [60].

Ensuite, la multiplication de la cellule transformée est stimulée et la protéine recombinante est synthétisée en grande quantité lors de l'étape de fermentation. L'extraction des protéines se fait par choc osmotique qui détruit les cellules et libère les protéines. Celles-ci doivent encore être purifiées par plusieurs étapes de filtration et de centrifugation [59].

Le médicament peut ensuite être formulé de manière optimale pour garantir la stabilité de la protéine en termes de structure et d'activité biologique. Le conditionnement est également important pour minimiser l'influence de l'environnement [59].

## 1.3. Leur conception

L'*ingénierie protéique* étudie les relations structure-fonction et permet de modifier à façon les protéines existantes ou de créer de nouvelles protéines. Des analogues de l'insuline humaine ont ainsi été créés par remplacement de certains acides aminés pour avoir des molécules à courte ou longue durée d'action. En plus de leur profil physiologique optimisé, ces analogues offrent de nombreux bénéfices par rapport à l'insuline humaine de première génération, principalement un risque réduit d'hypoglycémie et un meilleur confort pour les patients.

D'autres stratégies ont été développées, notamment pour augmenter l'activité ou la spécificité de protéines thérapeutiques existantes. Ces biomédicaments modifiés sont appelés des « biobetters ». La Figure 12 illustre bien les différents types de protéines qui sont présents sur le marché pharmaceutique.

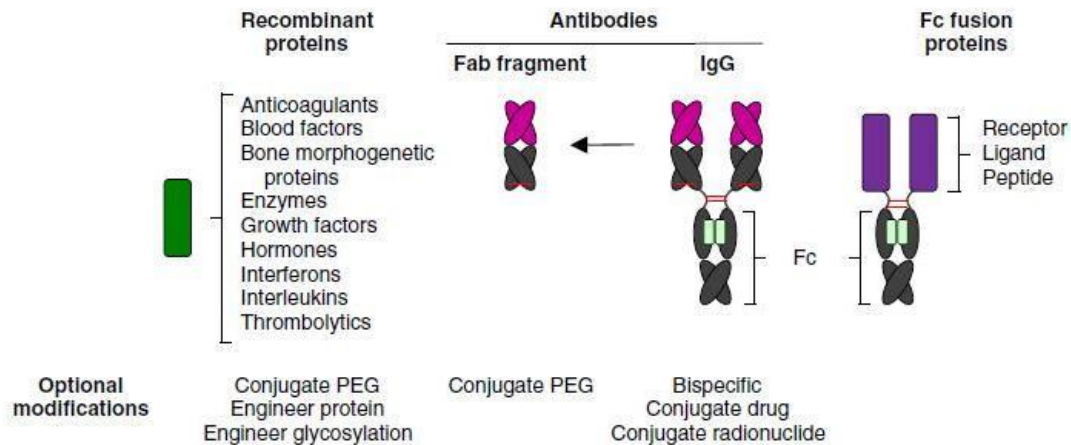


Figure 12. Les différents types de protéines pharmaceutiques. [57]

La *glycosylation* des protéines est une modification très utilisée qui a pour but principal d'augmenter leur demi-vie dans l'organisme et donc leur durée d'action [57]. Par exemple, l'époétine alpha (équivalent biosynthétique de l'érythropoïétine humaine, utilisé pour stimuler la production de globules rouges) possède 3 chaînes oligosaccharidiques mais la darbépoétine alpha en possèdent 2 supplémentaires, conduisant donc à une demi-vie plus élevée [57, 58].

La *pégylation* des protéines, c'est-à-dire leur conjugaison à du polyéthylène glycol (PEG), est aussi beaucoup utilisée pour diminuer leur clairance et donc augmenter leur demi-vie [57]. Par exemple, la méthoxypolyéthylèneglycol-époétine bêta a une durée d'action encore plus longue que la darbépoétine alpha [58]. La pégylation peut également réduire la réponse immunitaire [58, 61]. En effet, à l'exception des vaccins bien sûr, l'immunogénicité est une des caractéristiques des biopharmaceutiques qu'il faut essayer de contrecarrer.

La *conjugaison des anticorps* avec une petite molécule ou un radioisotope est de plus en plus fréquente. L'anticorps permet la reconnaissance de la cellule cible puis le complexe est clivé à l'intérieur et les molécules peuvent agir séparément. Le brentuximab védotine par exemple est un médicament orphelin récemment commercialisé et utilisé dans certains lymphomes. C'est un anticorps monoclonal reconnaissant l'antigène CD30 à la surface des lymphocytes, conjugué à une molécule cytotoxique perturbant le réseau des microtubules [62].

La *fusion de protéines* a également beaucoup de succès, principalement celle qui fait intervenir un fragment constant (Fc) d'immunoglobuline. L'Enbrel® (etanercept), un des biomédicaments les plus vendus, en est un bel exemple. Il est le résultat de la fusion d'un fragment Fc avec le récepteur du TNF (facteur de nécrose tumorale) et est utilisé dans l'arthrite rhumatoïde ou d'autres maladies auto-immunes [57].

#### 1.4. Leur présence sur le marché

La valeur des ventes de biopharmaceutiques augmente progressivement chaque année. En 2013, elle représentait 140 milliards de dollars américains [63]. Depuis quelques années, le top 10 des biomédicaments les plus vendus génère toujours environ la moitié de cette somme [60].

Dans le top 10 de 2013, se retrouvaient 6 anticorps monoclonaux, voire 7 si est inclu l'Enbrel®, qui contient un fragment d'anticorps (Tableau 1). L'Humira® (adalimumab), utilisé entre autres pour l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn, était le premier du classement, générant à lui tout seul 11 milliards de dollars [63].

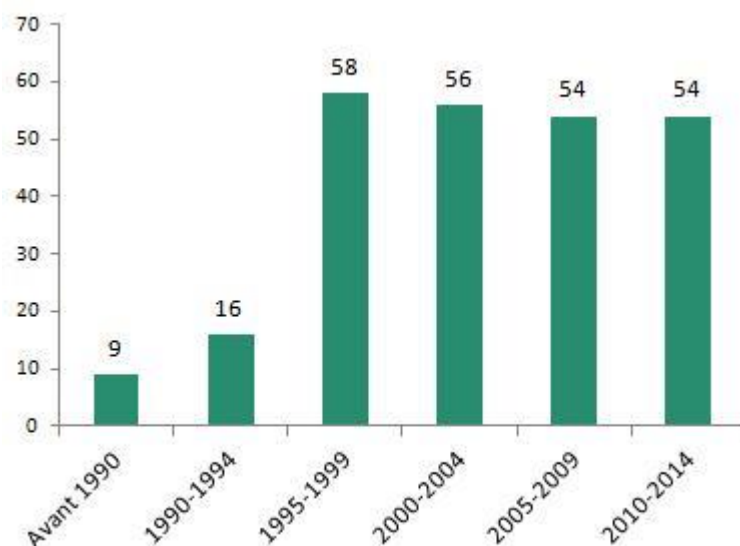
**Tableau 1.** Top 10 des biomédicaments les plus vendus en 2013.

Reproduit à partir de [63]

Rang	Spécialité	Principe actif	Ventes (billions \$)
1	Humira®	Adalimumab	11.00
2	Enbrel®	Etanercept	8.76
3	Remicade®	Infliximab	8.37
4	Lantus®	Insuline glargine	7.95
5	Rituxan®/MabThera®	Rituximab	7.91
6	Avastin®	Bevacizumab	6.97
7	Herceptin®	Trastuzumab	6.91
8	Neulasta®	Pegfilgrastim	4.39
9	Lucentis®	Ranibizumab	4.27
10	Epogen®/Procrit®/ Eprex®/ESPO®	Epoétine alpha	3.35

Toujours en 2013, les anticorps thérapeutiques qui rapportaient le plus ciblaient les maladies inflammatoires et/ou auto-immunes (41 milliards \$) puis les cancers (26 milliards \$). Parmi les produits qui ne sont pas basés sur des anticorps, les insulines constituaient la classe la plus lucrative (21,5 milliards \$) [63].

Comme le montre la Figure 13, le nombre de médicaments biologiques approuvés aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne a fortement augmenté à la fin des années 90 [60]. Depuis, il est relativement stable, avec 54 approbations entre 2010 et le milieu de l'année 2014. Durant cette période, les anticorps monoclonaux représentaient environ 30% de ces biomédicaments approuvés [60].



**Figure 13.** Nombre de biomédicaments approuvés par période de 5 ans (USA-UE).

Reproduite à partir de [60]

En milieu d'année 2014, le nombre total de biopharmaceutiques commercialisés aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne était de 212 [60]. Mais ça ne veut pas dire qu'il y a 212 principes actifs différents ! Certains biopharmaceutiques ont plusieurs noms commerciaux selon le marché visé, d'autres sont des reformulations d'un principe actif existant, et il existe aussi des produits « biosimilaires ».

### 1.5. Les « biosimilaires »

Le terme « générique » ne s'appliquant qu'aux médicaments issus de la synthèse chimique, c'est le terme « biosimilaire » qui est utilisé pour les copies de biomédicaments.

L'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a établi cette définition dans le courant de l'année 2012 [55] : *Un produit médical biologique similaire, également dénommé « biosimilaire », est un produit qui est similaire à un médicament biologique déjà autorisé, communément nommé « le produit médical de référence ». La substance active d'un médicament biosimilaire est une substance active biologique connue et similaire à celle du médicament de référence. Un médicament biologique similaire et son médicament de référence sont censés avoir le même profil de sécurité et d'efficacité et sont en général utilisés pour combattre les mêmes maladies.*

Un biosimilaire n'est donc pas la copie conforme du produit de référence. En effet, la production par biotechnologie étant complexe, il est difficile de reproduire exactement la substance active du



produit de référence. De nombreux tests doivent néanmoins être réalisés pour prouver qu'il n'y a pas de différence significative en termes d'efficacité et de sécurité.

Le développement de biomédicaments est très cher étant donné les coûts importants de la production et des essais cliniques. Les prix des spécialités sont donc très élevés. Ainsi, la mise sur le marché de biosimilaires a pour premier but de les rendre plus abordables. En moyenne, les biosimilaires seraient vendus 30% moins chers que leurs produits de référence [60].

Étant donné que les premiers médicaments biologiques ont été autorisés dans les années 1980, les brevets de certains sont arrivés à échéance ou le seront dans les prochaines années. Beaucoup de fabricants en profitent donc pour mettre au point leurs biosimilaires. C'est notamment le cas pour les spécialités à base d'insuline, comme le Lantus® (insuline glargine), étant en 4<sup>ème</sup> position des ventes de 2013 (voir Tableau 1). Son premier biosimilaire, Abasaglar®, a été approuvé par l'EMA en septembre 2014 [64]. Quant à l'Humira®, le biomédicament le plus vendu, son brevet expire en 2016 aux États-Unis et en 2018 en Europe [60].

Le premier biosimilaire, Omnitrope® (somatotropine), a été approuvé par l'EMA en 2006. L'Europe était en effet la première à introduire le concept de biosimilaire dans sa législation [55]. Aux États-Unis, c'est seulement en 2010 qu'ils ont intégré ce terme dans une loi. Et c'est seulement le 6 mars 2015 que la FDA a approuvé leur premier produit biosimilaire, le Zarxio® (filgrastim) [65]. En Europe, ce produit est déjà autorisé depuis 2009 sous le nom de Zarzio® !

En Belgique, des biosimilaires sont disponibles sur le marché pour les molécules reprises dans le Tableau 2.

**Tableau 2.** Biosimilaires sur le marché belge. Reproduit à partir de [60, 62]

Principe actif	Spécialité du biosimilaire	Spécialité de référence	Année d'autorisation en Europe
Somatropine	Omnitrope®	Genotonorm®	2006
Epoétine alpha	Binocrit®	Eprex®	2007
Epoétine zêta	Retacrit®		2007
Filgrastim	Tevagrastim®	Neupogen®	2008
	Zarzio®		2009
	Nivestim®		2010
Infliximab	Inflectra®	Remicade®	2013
	Remsima®		2013
Follitropine alpha	Bemfola®	Gonal-F®	2014

L'usage des biosimilaires varie beaucoup selon les pays. En Belgique, il est particulièrement faible [66]. Cela peut s'expliquer par la méfiance des médecins quant à l'efficacité et la sécurité des biosimilaires, ainsi que par le manque d'avantage financier. En effet, même si le prix de base des biosimilaires est plus faible, les hôpitaux bénéficient bien souvent de ristournes plus intéressantes pour les médicaments originaux habituellement commandés [66].

En moyenne, le total des ventes des biosimilaires en Europe est assez faible mais, à la fin de l'année 2012, ces ventes atteignaient presque 41% du marché du filgrastim et 19% du marché de l'époétine alpha [60].

## 2. Comment les analyser ?

### 2.1. L'utilité

L'analyse des biomédicaments est essentielle à toutes les étapes de la production, du stade recherche-développement au contrôle qualité.

Le processus de fabrication étant complexe, les techniques analytiques sont nécessaires pour déterminer la pureté des protéines thérapeutiques dans le but de garantir l'efficacité et la sécurité des produits finis [55, 67]. A côté du contrôle quantitatif, ces méthodes peuvent être utilisées pour la caractérisation : études de conformation, de modifications post-traductionnelles, d'isomères, de stabilité, d'agrégation,... [68].

La quantification des biopharmaceutiques dans des matrices biologiques est également nécessaire pour obtenir des informations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, ou contrôler la concentration sanguine de molécules ayant un index thérapeutique faible [67, 69].

Pour l'analyse des protéines d'un point de vue encore plus large, des méthodes analytiques peuvent aussi être appliquées pour observer l'expression des protéines dans les systèmes cellulaires, analyser leur composition et leur séquence en acides aminés, réaliser une cartographie peptidique, ou encore découvrir des biomarqueurs [70-72].

### 2.2. Les difficultés

Les biomédicaments et les médicaments issus de la synthèse chimique ont des propriétés très différentes dont certaines sont reprises dans le Tableau 3.

**Tableau 3.** Différences principales entre les petites molécules et les biomolécules.

Reproduit à partir de [61, 68]

Petite molécule	Biomolécule
Faible poids moléculaire	Poids moléculaire élevé
Propriétés physico-chimiques bien définies	Propriétés physico-chimiques complexes
Synthèse chimique	Production par biotechnologie
Une seule entité de pureté élevée et connue	Mélange souvent hétérogène, de pureté plus faible
Structure relativement simple	Modifications post-traductionnelles, structure secondaire et tertiaire, changement de conformation possible
Généralement stable et pas trop sensible à la chaleur	Habituellement très sensible à la chaleur

Les produits biologiques comportent beaucoup de défis par rapport aux petites molécules à cause de leur complexité [55, 68]. En effet, il est presque impossible d'obtenir une molécule totalement pure, la présence d'impuretés est presque inévitable [55, 73]. Cette hétérogénéité peut provenir d'une erreur dans la composition en acides aminés ou d'une instabilité chimique, mais aussi de différentes modifications post-traductionnelles, de différentes conformations, d'agrégation,...

Le comportement chromatographique des protéines est plus complexe que celui des petites molécules. Bien qu'il ne soit pas encore entièrement compris, il est évident qu'il dépend de nombreuses caractéristiques, à la fois des protéines et de la méthode [73].

Tout d'abord, il est utile de s'assurer de la stabilité des protéines en solution et à la température de travail [73]. Il faut savoir que les structures secondaire et tertiaire jouent un rôle important. Si la protéine est présente sous différentes conformations, une déformation du pic chromatographique voire plusieurs pics peuvent être observés [74]. Ensuite, une des difficultés principales observées avec les protéines est due à leur capacité à s'adsorber aux surfaces (tips, eppendorf®, vials, certaines pièces des appareillages, phases stationnaires,...) [67]. L'adsorption peut poser des problèmes de rétention et de déformation des pics mais peut aussi entraîner des effets « mémoire » et une perte d'analyte donc de sensibilité, ce qui est problématique en cas d'analyse quantitative [67, 68]. Pour minimiser l'adsorption, des vials en polypropylène sont recommandés ainsi que l'addition de solvant organique, souvent l'acétonitrile, dans l'échantillon [67]. Il a aussi été logiquement observé que la perte relative est plus faible pour les échantillons plus concentrés [67]. D'autres mesures plus spécifiques à certaines techniques sont abordées plus loin.

Lors de l'analyse de protéines intactes par utilisation de la spectrométrie de masse (MS), un autre problème de sensibilité peut survenir car il y a souvent de nombreux états de charge possibles et le signal est alors divisé entre tous ceux-ci [73].

Une étape de préparation de l'échantillon peut s'avérer utile pour augmenter la sensibilité, en concentrant l'analyte, et pour augmenter la sélectivité, en diminuant la présence d'interférents [67]. Mais c'est une étape qui peut prendre beaucoup de temps et consommer une quantité relativement grande en solvants organiques.

### 2.3. Les techniques analytiques

Pour étudier toutes les propriétés des protéines (structure, conformation, modifications post-traductionnelles, quantité, stabilité, etc.), il est souvent nécessaire d'utiliser plusieurs outils analytiques basés sur des principes différents [68].

La spectroscopie vibrationnelle peut être intéressante pour étudier la structure et la stabilité de la biomolécule durant la purification et la formulation mais les techniques les plus utilisées en bioanalyse sont clairement les tests immunologiques et les techniques séparatives [68, 69]. Ces dernières fournissent des informations qualitatives et quantitatives, souvent de manière précise et rapide [71].

#### Tests immunologiques

Les tests immunologiques sont très souvent utilisés pour le dosage de macromolécules dans les matrices biologiques [61]. Leurs avantages sont principalement une grande sensibilité et une spécificité, toutefois relative [67]. En effet, ces tests requièrent l'utilisation d'antigènes ou d'anticorps spécifiques mais des réactions croisées sont possibles avec des composés proches, provenant de la matrice ou de l'hétérogénéité de la biomolécule.

#### Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est une technique de choix pour l'identification et le dosage des protéines ainsi que pour l'analyse des substances apparentées [73]. Elle a un haut pouvoir de résolution, elle est reproductible, automatisée, assez rapide et facile [68, 73, 75].

Le comportement des protéines est énormément influencé par les conditions chromatographiques. Par exemple, en mode isocratique, un tout petit changement de proportion d'acétonitrile (0,1% seulement) peut modifier fortement la rétention ; ce phénomène est appelé effet on-off [68]. Il est ainsi recommandé de travailler en mode gradient, pour obtenir une meilleure reproductibilité et une

meilleure forme des pics [68, 74]. Les problèmes d'adsorption en HPLC sont dus aux interactions secondaires avec la phase stationnaire. Pour empêcher l'adsorption, en plus de l'utilisation d'un solvant organique polaire, les matériaux de l'appareillage doivent être inertes et des colonnes moins hydrophobes que les C-18 peuvent être utilisées avantageusement [68]. Pour diminuer les interactions électrostatiques et donc le phénomène de tailing, les charges des groupements silanol peuvent être masquées en modifiant le pH ou en utilisant des phases stationnaires particulières. Les charges de la protéine peuvent également être masquées en modifiant le pH ou en formant une paire d'ions [68]. Un autre paramètre chromatographique à prendre en compte est la taille des pores des particules de la phase stationnaire. En effet, les protéines sont trop volumineuses pour une taille de pores conventionnelle [68]. Des pores d'au moins 300 Å doivent être envisagés pour réduire la largeur des pics [68].

Le couplage HPLC-MS est recommandé pour l'analyse d'échantillons biologiques car il améliore encore la sélectivité et la sensibilité [67, 73]. Grâce aux informations qualitatives précises qu'elle fournit, la MS est très utilisée pour la caractérisation des protéines [68].

### Electrophorèse

L'électrophorèse sur gel est une technique de choix pour séparer les protéines mais elle offre une sensibilité limitée, elle demande une quantité importante d'échantillon et, n'étant pas automatisée, elle est très chronophage [70, 75]. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) permet le fractionnement des macromolécules selon la taille, la forme et la charge nette [68]. Le PAGE avec du dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) permet une séparation en fonction du poids moléculaire seulement, car il dénature les protéines et leur impose une charge négative uniforme [68]. La focalisation isoélectrique sur gel (IEF) permet de séparer les protéines selon la charge et plus précisément le point isoélectrique [68]. Elle peut être suivie d'un SDS-PAGE [68]. Ces différentes méthodes peuvent également servir de préparation d'échantillon ; des spots sont alors excisés du gel puis digérés par de la trypsine avant d'être caractérisés en MS/MS [75].

L'électrophorèse sur gel reste la technique électrophorétique dominante pour l'analyse des protéines, mais l'électrophorèse capillaire (CE) présente également des propriétés intéressantes [68].

### 3. Quel rôle joue l'électrophorèse capillaire ?

#### 3.1. Son importance

L'analyse de biopharmaceutiques par CE se développe de plus en plus. En effet, les méthodes CE sont présentes dans la Pharmacopée Européenne et sont utilisées par de nombreuses industries pharmaceutiques lors du développement, de la formulation, de la libération de lots ou d'études de stabilité [68]. Les applications à l'analyse de protéines sont vastes : identification, quantification, détermination des produits de dégradation, séparation de peptides proches, analyse d'énantiomères ou d'isoformes, analyse en milieux biologiques, détermination de l'activité enzymatique, détermination du point isoélectrique,... [68, 76].

La CE est considérée comme une technique orthogonale à l'HPLC puisqu'elles sont toutes les deux basées sur des principes de séparation différents. Cela signifie que des séparations difficiles avec une technique pourraient s'avérer plus faciles avec l'autre. En CE, la mobilité des analytes soumis à un champ électrique dépend de leur charge et de leur taille.

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

avec  $\mu_{ep}$  la mobilité électrophorétique,  $q$  la charge,  
 $\eta$  le coefficient de viscosité et  $r$  le rayon de Stokes

La CE offre une grande efficacité de séparation, elle est automatisée, rapide et facile à utiliser et elle permet l'analyse d'échantillons de petit volume avec de faibles quantités de solvant organique [68, 73, 76]. Elle est donc à la fois économique et écologique. Par contre, la sensibilité est un peu plus faible qu'en HPLC [73].

#### 3.2. Les modes de séparation et paramètres principaux

L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est le mode le plus utilisé et celui sous-entendu quand la CE est évoquée sans autre spécification.

De nombreux paramètres peuvent influencer la séparation des analytes : la composition et le pH du milieu de séparation (ou BGE : « background electrolyte »), l'addition de solvants organiques, surfactants ou autre additifs, le voltage, la température et la taille du capillaire.

Un long capillaire peut améliorer la séparation mais entraîne évidemment une augmentation du temps de migration, et un capillaire de petit diamètre diminue l'effet Joule, augmente l'efficacité et la résolution mais diminue la sensibilité (car le trajet optique est plus petit) [76].

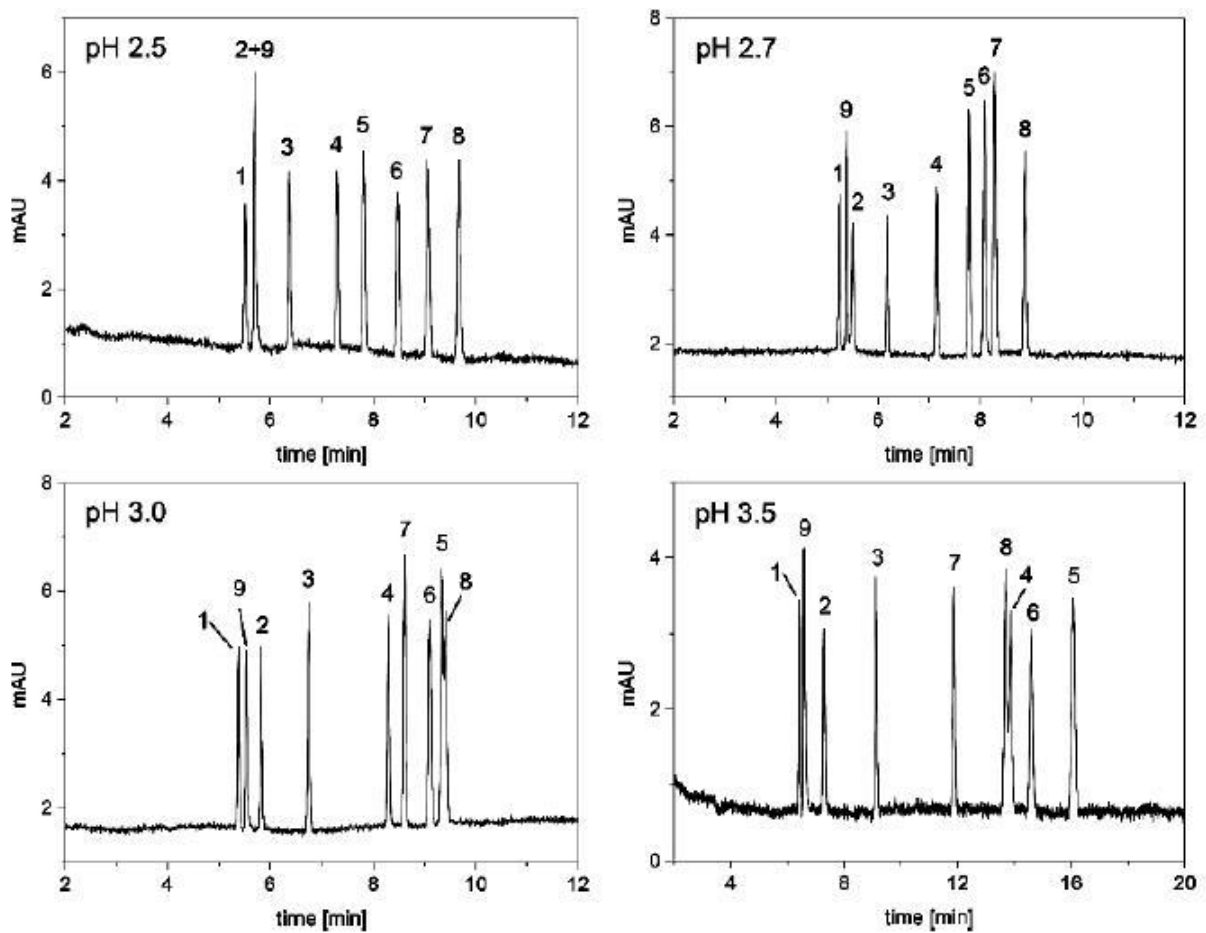
L'augmentation de la température amène une viscosité plus faible du BGE et une plus grande mobilité des analytes.

L'augmentation du voltage diminue le temps de migration tout en augmentant généralement l'efficacité et la résolution, mais un courant trop élevé entraîne un effet Joule important. Celui-ci peut entraîner un élargissement des pics, une perte de résolution et un bruit de fond plus intense [70].

Le facteur le plus important pour optimiser la sélectivité est sans doute le pH du BGE. Il détermine l'ionisation et la migration des analytes mais aussi l'écoulement électroosmotique (EOF). Deux régions de pH sont particulièrement recommandées pour l'analyse de protéines. A faible pH (2,0-3,0), les biomolécules migrent comme des cations et la dissociation négligeable des groupements silanol annule l'EOF et empêche leur adsorption à la surface du capillaire [76]. A pH élevé (8,0-10,0), elles migrent comme des anions et la déprotonation des groupements silanol entraîne un EOF important et empêche leur adsorption par répulsion de charges [76]. Dans certains cas, de toutes petites variations de pH peuvent influencer fortement la séparation et même changer l'ordre de migration (Figure 14).

Un BGE avec une force ionique élevée diminue aussi l'adsorption, l'EOF et la mobilité électrophorétique, ce qui augmente la résolution et l'efficacité, mais augmente le courant électrique et l'effet Joule [70, 76].

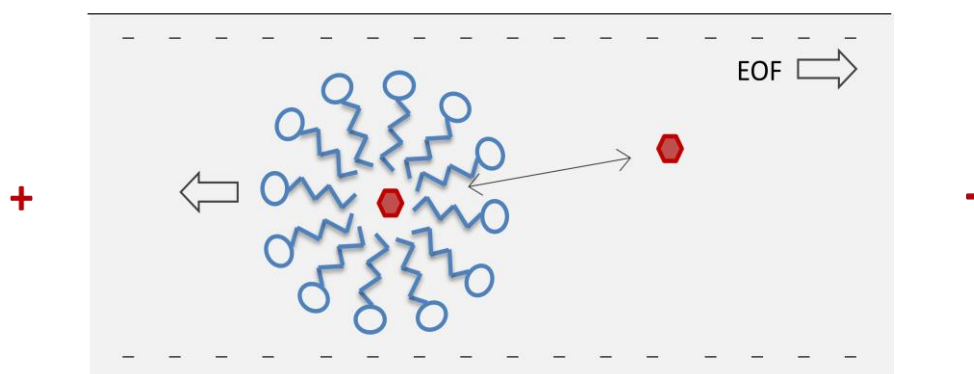
Si la résolution n'est pas suffisante en faisant varier les paramètres précités, des additifs peuvent être utilisés. Les solvants organiques modifient la viscosité, l'EOF, le temps de migration des analytes ainsi que la sélectivité [76]. Généralement, ils augmentent la viscosité, diminuent l'EOF et augmentent le temps de migration des analytes mais leur effet peut être différent selon leur nature. Ils affectent également l'équilibre de dissociation et peuvent par conséquent engendrer une modification de l'ordre de migration des analytes. Les cyclodextrines sont principalement employées comme sélecteur chiral mais peuvent aussi influencer la séparation de peptides. Ce sont des oligosaccharides cycliques qui peuvent inclure les parties hydrophobes des molécules dans leur cavité.



**Figure 14.** Exemple de séparation de petits peptides à différents pH. [76]

Capillaire 50  $\mu\text{m}$  d.i., L : 57 cm, tampon phosphate de sodium 50 mM, 25 kV, 20°C, détection 215 nm.

- 1: Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, 2: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, 3: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe  
 4: L-Ala-L-Phe, 5: L-Ala-D-Phe, 6: Gly-Leu-Tyr, 7: Trp-Met-Asp-PheNH<sub>2</sub>, 8: Tyr-Gla-Gly-Phe-Leu,  
 9: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.



**Figure 15.** Représentation schématique de la MEKC.



Des surfactants peuvent également être ajoutés à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) pour former des micelles agissant alors comme phase pseudostationnaire [76]. Le surfactant le plus souvent utilisé est le dodécyl sulfate de sodium (SDS), formant des micelles de charge négative. Dans ce mode appelé chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), les analytes se partagent entre les phases aqueuse et micellaire en fonction de leur hydrophobicité (Figure 15).

Au départ, la MEKC a été développée pour séparer des composés non chargés mais elle peut également séparer des composés chargés et donc être utilisée quand la résolution obtenue en CZE est insuffisante. Ce mode est d'ailleurs approprié pour la séparation de protéines structurellement proches, ayant un rapport charge sur masse similaire mais des hydrophobicités différentes [70, 71].

D'autres modes de CE peuvent aussi être utiles pour l'analyse de biomolécules.

L'électrophorèse capillaire sur gel (CGE) est basée sur le même principe que celui du SDS-PAGE, à l'exception que l'échantillon est injecté dans un capillaire rempli d'un gel (polyacrylamide, PEG ou dextrane) [68]. Les avantages par rapport au PAGE sont l'automatisation, la détection quantitative en temps réel, la rapidité et la résolution améliorée [68].

La focalisation isoélectrique capillaire (CIEF) est l'équivalent de l'IEF dans un capillaire. C'est une technique intéressante pour analyser des isoformes de protéines [68]. En effet, elle peut séparer deux protéines dont les points isoélectriques ne diffèrent que de 0,005 unité de pH [68].

L'électrochromatographie capillaire (CEC) combine la migration électrophorétique et la rétention chromatographique sur phase stationnaire [68].

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) peut être intéressante pour étudier les interactions biomoléculaires et déterminer les constantes d'affinité de complexes protéiques [68].

### 3.3. L'adsorption

Bien que le phénomène d'adsorption des protéines soit généralement plus faible qu'en HPLC, il existe aussi en CE et est principalement causé par les interactions ioniques entre les groupements silanol chargés négativement de la paroi du capillaire et les acides aminés chargés positivement [68, 76]. Comme déjà abordé en partie dans les difficultés de la bioanalyse, l'adsorption peut générer des temps de migration peu reproductibles, une efficacité plus faible, une perte d'analytes et une altération de l'EOF [68, 70]. Elle est influencée par la nature de la protéine, la composition et le pH du BGE, la nature du capillaire et la température [68].

Pour diminuer les désagréments engendrés par l'adsorption, les rinçages du capillaire doivent être appropriés, de même que la sélection du BGE. En plus de la présence de solvant organique, le pH peut être ajusté de manière à limiter les interactions entre la protéine et les groupements silanol du capillaire. Pour empêcher ces interactions, la paroi interne du capillaire peut également être recouverte (coating). Il existe des coatings dynamiques (ou réversibles), créés par adsorption de molécules présentes dans le BGE, et des coatings statiques (ou permanents), créés par liaisons covalentes ou adsorption physique [70, 71].

#### 3.4. La détection

La détection des biomolécules en CE est le plus souvent réalisée en UV, à basses longueurs d'onde (200-220 nm), région dans laquelle les liaisons peptidiques absorbent un peu [76]. La présence d'acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) augmente cependant l'absorbance à de plus hautes longueurs d'onde, plus spécifiques (260-280 nm).

La sensibilité est généralement plus faible qu'en HPLC mais il est possible de l'améliorer en augmentant le trajet optique (utilisation de cellules élargies ou en Z par exemple), en ayant recours à des techniques de préconcentration en ligne, ou encore en dérivatisant les analytes avec des réactifs bénéficiant d'une meilleure absorbance UV [76]. Malheureusement, il est possible d'avoir plusieurs sites de dérivatisation sur la protéine et donc différents dérivés ayant des mobilités différentes et donnant des pics multiples [71].

La détection par fluorescence est plus sensible que par UV mais toutes les protéines n'émettent pas de fluorescence. L'utilisation d'un détecteur de fluorescence induite par laser (LIF) nécessite donc souvent une dérivatisation par un marqueur fluorescent mais le même problème que pour la dérivatisation en UV peut bien sûr survenir.

Le couplage à la MS est très intéressant car il combine l'efficacité et le pouvoir de résolution de la CE avec la sélectivité et la sensibilité de la MS [72]. La MS est très utile pour la quantification de biomolécules dans des matrices biologiques et également pour leur caractérisation puisqu'elle permet une détermination précise de la masse moléculaire relative et, via la MS en tandem, fournit aussi des informations structurelles [76].



## Section 3

## Références



- [1] R. Martino, M. Malet-Martino, V. Gilard, S. Balayssac, Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification, *Anal Bioanal Chem* 2010, *398*, 77-92.
- [2] World Health Organization, Counterfeit drugs: guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs, Geneva, 1999.  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO\\_EDM\\_QSM\\_99.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_EDM_QSM_99.1.pdf). Accès le 27 mai 2015.
- [3] K. Degardin, Y. Roggo, P. Margot, Understanding and fighting the medicine counterfeit market, *J Pharm Biomed Anal* 2014, *87*, 167-175.
- [4] T. Kelesidis, M. E. Falagas, Substandard/counterfeit antimicrobial drugs, *Clin Microbiol Rev* 2015, *28*, 443-464.
- [5] E. A. Blackstone, J. P. Fuhr, Jr., S. Pociask, The health and economic effects of counterfeit drugs, *Am Health Drug Benefits* 2014, *7*, 216-224.
- [6] World Health Organization, General information on counterfeit medicines, Geneva, 2010.  
<http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/overview/en/>. Accès le 27 mai 2015.
- [7] K. Karunamoorthi, The counterfeit anti-malarial is a crime against humanity: a systematic review of the scientific evidence, *Malar J* 2014, *13*, 209.
- [8] Pharmaceutical Security Institute, Incident Trends. <http://psi-inc.org/incidentTrends.cfm>. Accès le 27 mai 2015.
- [9] International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce, Counterfeit medicines: an update on estimates, 2006. <http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/impact/TheNewEstimatesCounterfeit.pdf>. Accès le 27 mai 2015.
- [10] Pharmaceutical Security Institute, Geographic Distribution.  
<http://psi-inc.org/geographicDistributions.cfm>. Accès le 27 mai 2015.
- [11] Les Afriques. <http://www.lesafriques.com/actualite/faux-medicaments-le-grand-peril-de-l-afrique.html?Itemid=89>. Accès le 26 mai 2015.
- [12] La presse. <http://www.lapresse.ca/international/afrique/201409/22/01-4802484-113-millions-de-faux-medicaments-saisis-en-afrique.php>. Accès le 26 mai 2015.
- [13] Le Monde. [http://www.lemonde.fr/economie/article/2013/09/25/les-medicaments-contrefaits-une-activite-lucrative\\_3484165\\_3234.html](http://www.lemonde.fr/economie/article/2013/09/25/les-medicaments-contrefaits-une-activite-lucrative_3484165_3234.html). Accès le 26 mai 2015.
- [14] JOL Press. <http://www.jolpress.com/550-millions-medicaments-contrefaits-interceptes-afrique-article-820149.html>. Accès le 26 mai 2015.
- [15] Jen-Te Yao, The impact of counterfeit-purchase penalties on anti-counterfeiting under deceptive counterfeiting, *Journal of Economics and Business* 2015, *80*, 51-61.
- [16] J. Sambira, Médicaments contrefaits : un problème de santé en Afrique, *Afrique Renouveau* 2013.

- [17] World Health Organization, Medicines: spurious/falsefully labeled/falsified/counterfeit (SFFC) medicines, 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/>. Accès le 27 mai 2015.
- [18] M. M. Cheng, Is the drugstore safe? Counterfeit diabetes products on the shelves, *Journal of Diabetes Science and Technology* 2009, 3, 1516-1520.
- [19] C. Cherici, P. McGinnis, W. Russell, Premier healthcare alliance, Buyer beware: Drug shortages and the gray market, 2011. <http://www.chcablog.com/wp-content/uploads/2011/08/Gray-Market-Analysis-David-Edit.pdf>. Accès le 28 mai 2015.
- [20] Les Entreprises du Médicament, dossier de presse: contrefaçon de médicament, 2010. [http://www.leem.org/sites/default/files/import/presse/dossiers/76\\_DP%2BContrefa%25C3%25A7on%2B2010.pdf](http://www.leem.org/sites/default/files/import/presse/dossiers/76_DP%2BContrefa%25C3%25A7on%2B2010.pdf). Accès le 28 mai 2015.
- [21] Institut International de Recherche Anti-Contrefaçon de Médicaments, La criminalité organisée. <http://www.iracm.com/observatoire-thematique/criminalite-organisee/>. Accès le 2 juin 2015.
- [22] AFMPS, Sites internet notifiés de pharmacies autorisées en Belgique, 2014. [http://www.fagg-afmps.be/fr/binaries/Websites\\_tcm291-43501.pdf](http://www.fagg-afmps.be/fr/binaries/Websites_tcm291-43501.pdf). Accès le 1<sup>er</sup> juin 2015.
- [23] Institut International de Recherche Anti-Contrefaçon de Médicaments, Falsification sur internet. <http://www.iracm.com/observatoire-thematique/falsification-sur-internet/>. Accès le 2 juin 2015.
- [24] W. G. Chambliss, W. A. Carroll, D. Kennedy, D. Levine, M. A. Mone, L. D. Ried, M. Shepherd, M. Yelvig, Role of the pharmacist in preventing distribution of counterfeit medications, *J Am Pharm Assoc (2003)* 2012, 52, 195-199.
- [25] Convention du Conseil de l'Europe sur la contrefaçon des produits médicaux et les infractions similaires menaçant la santé publique, 2012. <http://conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/211.htm>. Accès le 1<sup>er</sup> juin 2015.
- [26] AFMPS, Site Internet d'une pharmacie, 2012. [http://www.fagg-afmps.be/fr/humain/medicaments/medicaments/distribution/pharmacies\\_ouvertes\\_au\\_public/Site\\_Internet\\_d\\_une\\_pharmacie/](http://www.fagg-afmps.be/fr/humain/medicaments/medicaments/distribution/pharmacies_ouvertes_au_public/Site_Internet_d_une_pharmacie/). Accès le 2 juin 2015.
- [27] Institut International de Recherche Anti-Contrefaçon de Médicaments, Actions internationales. <http://www.iracm.com/engagement-et-strategie/actions-internationales/>. Accès le 2 juin 2015.
- [28] Institut International de Recherche Anti-Contrefaçon de Médicaments, Historique. <http://www.iracm.com/historique/>. Accès le 2 juin 2015.
- [29] 20 minutes. <http://www.20minutes.fr/economie/1308830-20140225-20140225-nouvel-arsenal-lutter-contre-contrefacon>. Accès le 26 mai 2015.
- [30] Doc du net. [http://www.docdunet.fr/?attachment\\_id=979](http://www.docdunet.fr/?attachment_id=979). Accès le 26 mai 2015.
- [31] L'express. [http://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/contrefacon-faux-medicaments-vraies-menaces\\_1285097.html](http://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/contrefacon-faux-medicaments-vraies-menaces_1285097.html). Accès le 26 mai 2015.

- [32] Le Figaro santé. <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2013/09/25/21301-medicaments-contrefaits-tuent-700000-personnes-par-an>. Accès le 26 mai 2015.
- [33] Institut International de Recherche Anti-Contrefaçon de Médicaments, Les technologies de détection des faux médicaments. <http://www.iracm.com/observatoire-thematique/outils-technologiques/>. Accès le 2 juin 2015.
- [34] Malaria no more. <https://www.malarianomore.org/news/blog/sproxil-protecting-mobile-users-from-counterfeit-malaria-drugs>. Accès le 2 juin 2015.
- [35] mPedigree Goldkeys App. <https://brightideastomakelifebetter.wordpress.com/page/3/>. Accès le 2 juin 2015.
- [36] Manufacturing chemist. [http://www.manufacturingchemist.com/technical/article\\_page/France\\_is\\_first\\_to\\_set\\_the\\_code/60653](http://www.manufacturingchemist.com/technical/article_page/France_is_first_to_set_the_code/60653). Accès le 2 juin 2015.
- [37] Sanofi. <http://www.sanofi.fr/l/fr/fr/layout.jsp?scat=FACD3660-DCB3-45CA-BD21-C9DA9342D83D>. Accès le 2 juin 2015.
- [38] Nosco. <http://www.nosco.com/services/rfid-and-serialization/>. Accès le 2 juin 2015.
- [39] Kitchcheck. <https://kitchcheck.com/2014/02/rfid-better-manual-pharmacy-kit-medication-checks/>. Accès le 2 juin 2015.
- [40] GPHF. <http://www.gphf.org/en/index.htm>. Accès le 2 juin 2015.
- [41] F. Been, Y. Roggo, K. Degardin, P. Esseiva, P. Margot, Profiling of counterfeit medicines by vibrational spectroscopy, *Forensic Sci Int* 2011, *211*, 83-100.
- [42] S. Neuberger, C. Neususs, Determination of counterfeit medicines by Raman spectroscopy: Systematic study based on a large set of model tablets, *J Pharm Biomed Anal* 2015, *112*, 70-78.
- [43] D. Custers, T. Cauwenbergh, J. L. Bothy, P. Courselle, J. O. De Beer, S. Apers, E. Deconinck, ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics: An interesting tool to discriminate and characterize counterfeit medicines, *J Pharm Biomed Anal* 2014.
- [44] Feng Lu, Xinxin Weng, Yifeng Chai, Yongjian Yang, Yinjia Yu, Gengli Duan, A novel identification system for counterfeit drugs based on portable Raman spectroscopy, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2013, *127*, 63-69.
- [45] Securing industry. [http://www.securindustry.com/pharmaceuticals/new-truscan-device-is-faster-smaller-and-more-powerful-/s40/a872/#.VZDz\\_hvtmkp](http://www.securindustry.com/pharmaceuticals/new-truscan-device-is-faster-smaller-and-more-powerful-/s40/a872/#.VZDz_hvtmkp). Accès le 2 juin 2015.
- [46] SecuringIndustry. <http://www.securindustry.com/pharmaceuticals/usp-suggests-truscan-not-reliable-for-substandard-drug-detection/s40/a1640/#.VZD0MRvmtmko>. Accès le 2 juin 2015.
- [47] S. Wilczynski, The use of dynamic thermal analysis to distinguish between genuine and counterfeit drugs, *Int J Pharm* 2015.



- [48] C. Lamalle, R. D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, J. Crommen, P. Hubert, A. C. Servais, M. Fillet, Development of a generic micellar electrokinetic chromatography method for the separation of 15 antimalarial drugs as a tool to detect medicine counterfeiting, *Electrophoresis* 2012, *33*, 1669-1678.
- [49] C. Lamalle, A. C. Servais, R. P. Radermecker, J. Crommen, M. Fillet, Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 2014, *111*, 344-350.
- [50] E. Deconinck, M. Canfyn, P. Y. Sacre, S. Baudewyns, P. Courselle, J. O. De Beer, A validated GC-MS method for the determination and quantification of residual solvents in counterfeit tablets and capsules, *J Pharm Biomed Anal* 2012, *70*, 64-70.
- [51] L. Hoellein, U. Holzgrabe, Development of simplified HPLC methods for the detection of counterfeit antimalarials in resource-restraint environments, *J Pharm Biomed Anal* 2014, *98*, 434-445.
- [52] R. D. Marini, E. Rozet, M. L. A. Montes, C. Rohrbasser, S. Roht, D. Rhème, P. Bonnabry, J. Schappler, J. L. Veuthey, Ph. Hubert, S. Rudaz, Reliable low-cost capillary electrophoresis device for drug quality control and counterfeit medicines, *J Pharmaceut Biomed* 2010, *53*, 1278-1287.
- [53] ECB project. <https://ecbprojectimpact.wordpress.com/prototype/>. Accès le 26 juin 2015.
- [54] A. K. Pavlou, J. M. Reichert, Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010, *Nat Biotechnol* 2004, *22*, 1513-1519.
- [55] Commission Européenne, Document consensuel d'information, Ce qu'il faut savoir sur les médicaments biosimilaires, 2013. [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/healthcare/files/docs/biosimilars\\_report\\_fr.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/healthcare/files/docs/biosimilars_report_fr.pdf). Accès le 10 juin 2015.
- [56] Z. Weng, C. DeLisi, Protein therapeutics: promises and challenges for the 21st century, *Trends Biotechnol* 2002, *20*, 29-35.
- [57] P. J. Carter, Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective, *Exp Cell Res* 2011, *317*, 1261-1269.
- [58] T. Ueda, Next-generation optimized biotherapeutics - A review and preclinical study, *Biochim Biophys Acta* 2014, *1844*, 2053-2057.
- [59] Sandoz, Sandoz met à profit son expertise technologique et son savoir-faire pour accroître l'offre de soins dans le secteur des médicaments de pointe. <http://www.sandoz.fr/produits/biosimilaires/fabrication.shtml>. Accès le 11 juin 2015.
- [60] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2014, *Nat Biotechnol* 2014, *32*, 992-1000.
- [61] A. Baumann, Early development of therapeutic biologics-pharmacokinetics, *Curr Drug Metab* 2006, *7*, 15-21.
- [62] Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique, Répertoire commenté des médicaments, mai 2015. <http://www.cbip.be/>. Accès le 10 juin 2015.

- [63] La Merie Publishing, 2013 Sales of Recombinant Therapeutic Antibodies & Proteins, 2014. [http://www.pipelinereview.com/free-downloads/2013\\_Biologics\\_Sales.pdf](http://www.pipelinereview.com/free-downloads/2013_Biologics_Sales.pdf). Accès le 11 juin 2015.
- [64] European Medicines Agency, Abasaglar, Résumé EPAR à l'intention du public, 2015. [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002835/WC500175384.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002835/WC500175384.pdf). Accès le 29 juillet 2015.
- [65] U.S. Food and Drug Administration, Biosimilars. <http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/approvalapplications/therapeuticbiologicapplications/biosimilars/default.htm>. Accès le 10 juin 2015.
- [66] Centre fédéral et d'expertise des soins de santé, Freins et leviers à l'adoption des médicaments biosimilaires en Belgique, 2013. [http://kce.fgov.be/sites/default/files/page\\_documents/KCE\\_199Bs\\_Biosimilaires\\_synthese%20FR\\_0.pdf](http://kce.fgov.be/sites/default/files/page_documents/KCE_199Bs_Biosimilaires_synthese%20FR_0.pdf). Accès le 11 juin 2015.
- [67] H. John, M. Walden, S. Schafer, S. Genz, W. G. Forssmann, Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 2004, 378, 883-897.
- [68] A. Staub, D. Guillaume, J. Schappler, J. L. Veuthey, S. Rudaz, Intact protein analysis in the biopharmaceutical field, *J Pharm Biomed Anal* 2011, 55, 810-822.
- [69] N. Ansermot, M. Fathi, J. L. Veuthey, J. Desmeules, S. Rudaz, D. Hochstrasser, Simultaneous quantification of cyclosporine, tacrolimus, sirolimus and everolimus in whole blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Clin Biochem* 2008, 41, 728-735.
- [70] W. W. Quigley, N. J. Dovichi, Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers, *Anal Chem* 2004, 76, 4645-4658.
- [71] V. Kasicka, Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2011-2013), *Electrophoresis* 2014, 35, 69-95.
- [72] A. C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, Capillary electrophoresis-mass spectrometry, an attractive tool for drug bioanalysis and biomarker discovery, *Electrophoresis* 2006, 27, 2616-2629.
- [73] A. Van Eeckhaut, D. Mangelings, Toward greener analytical techniques for the absolute quantification of peptides in pharmaceutical and biological samples, *J Pharm Biomed Anal* 2015.
- [74] S. Fekete, J. L. Veuthey, D. V. McCalley, D. Guillaume, The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography, *J Chromatogr A* 2012, 1270, 127-138.
- [75] H. J. Issaq, The role of separation science in proteomics research, *Electrophoresis* 2001, 22, 3629-3638.
- [76] G. K. Scriba, A. Psurek, Separation of peptides by capillary electrophoresis, *Methods Mol Biol* 2008, 384, 483-506.



## CHAPITRE II

### OBJECTIFS



L'objectif général de la thèse est de développer des méthodes par électrophorèse capillaire (CE), et principalement par chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), pour analyser des médicaments dans le contexte de la contrefaçon, qu'il s'agisse de petites ou de plus grosses molécules comme des peptides ou des petites protéines.

La contrefaçon médicamenteuse étant une problématique de santé publique en plein essor, il est important de mettre en place des moyens pour lutter contre son expansion. Une des actions évidentes à poursuivre est l'augmentation de la fréquence et de la qualité des contrôles afin de favoriser la détection des médicaments contrefaits. Dans ce but, les techniques analytiques sont fortement recommandées. La plupart des méthodes analytiques appliquées à la détection de contrefaçons médicamenteuses font intervenir la chromatographie ou la spectroscopie. Dans le cadre de cette thèse, le choix de la CE se justifie par sa complémentarité ainsi que sa simplicité et son économie en consommables par rapport à la chromatographie liquide.

Notre intention est de développer des méthodes génériques permettant de séparer plusieurs molécules médicamenteuses d'une même classe pharmacologique. Le premier avantage d'une méthode générique est la simplicité d'utilisation puisqu'une seule et même méthode peut être appliquée à différents échantillons. Un autre avantage intéressant dans le cadre de l'analyse de médicaments contrefaits est la sélectivité par rapport aux autres molécules potentiellement présentes. En effet, comme il n'est pas rare qu'un principe actif soit substitué par un autre de la même classe, souvent pour raison financière, il sera possible d'identifier ce dernier grâce à son temps de migration en plus de son spectre UV.

La MEKC s'avèrera utile dans ce projet, étant donné son pouvoir de séparation basé non seulement sur le rapport charge/masse de l'analyte mais aussi sur son hydrophobicité. La MEKC ne permet pas seulement de séparer les molécules neutres, elle permet aussi la séparation d'un grand nombre de molécules ionisées, quelle que soit leur charge et dont la structure peut être très proche.

La première partie du travail consistera en l'étude de la mobilité d'analytes modèles en MEKC. Son objectif est de mieux comprendre le comportement de migration de molécules chargées ou non, selon le milieu de séparation. Cette étude sera réalisée à différents pH, différentes concentrations en sodium dodécyl sulfate (SDS) et différentes proportions en acétonitrile.

Ensuite, la MEKC sera appliquée à l'analyse de molécules pharmaceutiques.

Dans un premier temps, des petites molécules de structures assez différentes mais provenant d'une même classe pharmacologique seront analysées simultanément. Il s'agit de 15 antipaludiques.

Dans un deuxième temps, les biopharmaceutiques seront étudiés, et plus précisément les protéines présentes dans les formulations à base d'insuline. Une première méthode sera développée afin de séparer simultanément l'insuline humaine et ses 5 analogues synthétiques (insulines lispro, aspart, glulisine, glargine et détémir), et une autre sera mise au point pour séparer l'insuline humaine des insulines d'origine animale (bovine et porcine). Enfin, la protamine, un mélange de peptides utilisé comme excipient dans certaines formulations à base d'insuline, sera également analysée par CE.

Toutes ces méthodes pourront dès lors être appliquées au contrôle qualité des médicaments concernés.







## CHAPITRE III

### RÉSULTATS



## Section 1

Etude des paramètres influençant  
la mobilité électrophorétique en MEKC



Tout au long de cette thèse, la technique analytique utilisée a été la CE, et majoritairement son mode de séparation appelé MEKC. Celui-ci, caractérisé par la présence de micelles dans le tampon de séparation, est communément employé pour la séparation de composés neutres mais il peut en réalité l'être également pour tous types de composés chargés.

Dans un premier temps, une étude fondamentale a été envisagée afin d'étudier l'influence du tampon de séparation sur la migration de molécules neutres, cationiques ou anioniques. Plutôt que de nous intéresser au temps de migration, nous avons examiné la mobilité effective, c'est-à-dire la mobilité électrophorétique sous l'influence des micelles. Les mobilités de plusieurs analytes modèles ont été mesurées à pH neutre, acide et basique, et ont été suivies en présence d'une concentration croissante en SDS (le surfactant le plus souvent utilisé en MEKC) et d'une proportion croissante en modificateur organique (ici, l'acétonitrile). Ces trois facteurs jouent un rôle évident sur le comportement des analytes dans un système MEKC. Parallèlement aux données théoriques existantes à ce sujet, cette étude réalisée sur un mélange complexe apporte des informations globales et visuelles sur le comportement des différents types d'analytes, permettant d'encore améliorer notre compréhension de la MEKC et de son mode d'utilisation.



Journal of Separative Science 2012, 35, 1933–1939

MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY SYSTEMS  
FOR THE SEPARATION OF MIXTURES OF CHARGED  
AND UNCHARGED COMPOUNDS

Caroline Lamalle, Anne-Catherine Servais, Jacques Crommen, Marianne Fillet





## Abstract

MEKC can successfully achieve the separation of complex mixtures. In this study, the migration behaviour of charged and uncharged analytes was investigated under different conditions. Effective mobilities – electrophoretic mobilities under the influence of micelles – of cations, anions and neutrals were measured at neutral, basic and acidic pH (7.5, 11 and 2.2) using background electrolytes containing different sodium dodecylsulfate (SDS) concentrations (0-90 mM) and acetonitrile (ACN) proportions (0-75%). SDS concentration and ACN proportion were found to have a tremendous effect on the effective mobilities and migration order of the model compounds. Although the SDS micelles preferably interact with neutrals and cations, hydrophobic bonds can also occur with anions. Cations, anions and neutrals having rather different migration behaviours, it is possible to considerably enhance the selectivity of the method by adjusting only the SDS concentration and the ACN proportion. These observations confirm the interest of using MEKC not only for the separation of neutral substances but also to analyse charged compounds.



## 1. Introduction

CE is a separation technique that has attracted attention because of its interesting features such as small sample volumes, minimal solvent consumption, high separation efficiency, and short analysis times. In classical CE, namely CZE, the electrophoretic mobility of the analytes depends on their charge and their hydrodynamic radius. This means that uncharged analytes migrate with EOF and are separated neither from each other nor from EOF.

In 1984, Terabe and co-workers introduced a modified version of CE, called micellar electrokinetic chromatography (MEKC), in which surfactant-formed micelles are included in the running buffer providing a two-phase chromatographic system for the separation of neutral compounds [1–3]. Depending on their hydrophobicity, compounds can interact with the core of the micelles. Thus, with respect to the separation mechanism, MEKC is analogous to reversed-phase liquid chromatography with micelles acting as a pseudo-stationary phase [4]. However, in MEKC, chromatography is carried out in a homogeneous solution, which enables a rapid establishment of partition equilibrium between the micelles and the aqueous phase and thus provides high peak efficiency. Moreover, in MEKC, uncharged analytes migrate in a time range defined by the migration time of a solute that does not interact with the micelles,  $t_{eo}$ , and the migration time of a solute that is completely solubilized in the micelles,  $t_{mc}$ . This means that only the time range  $t_{mc}-t_{eo}$  is available for the separation of neutral compounds [5].

Many MEKC methods have been described for the separation of neutral and basic compounds and for various applications [6–14]. However, the migration behavior of mixtures of cationic, anionic, and neutral analytes is not well established with respect to the surfactant concentration and the proportion of organic solvent in the background electrolyte (BGE). With such mixtures, it is important to remember that the separation of charged solutes in MEKC involves a combination of chromatographic and electrophoretic separation mechanisms. Moreover, it is worth noting that with charged analytes, two kinds of interactions with the micelles may occur: not only with the hydrophobic core but also with the charged head groups of the micelles through electrostatic interactions. In systems in which the surfactant has an opposite charge to that of the solute, strong coulombic attraction may occur. On the contrary, when a solute and the surfactant have similar charges, coulombic forces may cause the repulsion of these molecules [15, 16].

Sodium dodecyl sulfate (SDS), the most currently used surfactant, forms negatively charged micelles when the surfactant concentration is above its critical micellar concentration (CMC), approximately 8 mM in water [17]. Water is a unique solvent as far as micellization is concerned. Thanks to its appropriate properties (dielectric constant, hydrogen bonding, dipole moment, cohesive energy density, etc.), water favors attraction between alkyl chains rather than repulsion between ionic

heads [18]. An organic solvent, such as methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN), is often added to the BGE to enhance resolution. Indeed, it decreases the EOF and increases the migration window [19, 20]. But the organic solvent has also an impact on the partition coefficient of analytes between micelles and BGE [21]. Actually, the addition of an organic modifier changes the properties of the aqueous phase. First, the increase of hydrophobicity decreases the analyte–micelles affinity and displaces the partition equilibrium toward BGE [15, 22]. Second, the increase of surfactant solvation and the decrease of dielectric constant reduce the hydrophobic interactions between alkyl chains and increase the electrostatic repulsion between head groups. This means that the CMC is increased and that the micelle aggregation number is decreased resulting in a progressive dissolution of the micelles that can totally disappear at high proportions of organic solvent (e.g. about 35% v/v MeOH in water) [22, 23]. In the literature, data can be found on the effect of various organic modifiers on the micellization but the information is dispersed concerning the effect on solute migration in MEKC [24–27]. The goal of this study was therefore to improve our understanding of the migration behavior of charged and uncharged analytes in MEKC systems in the presence of an organic modifier. With this aim in view, the effective mobilities (electrophoretic mobilities under the influence of micelles) of neutrals, cations, and anions were measured at neutral, basic, and acidic pH with BGE containing increasing SDS concentrations and ACN proportions. Moreover, the changes of migration order between CZE and MEKC systems according to the BGE composition were also systematically investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Instrumentation

All experiments were carried out on an HP<sup>3D</sup>CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, an on-column diode array detector (DAD), and a temperature control system ( $15\text{--}60 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ). A CE Chemstation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) was used for instrument control, data acquisition, and data analysis. Fused silica capillaries were provided by ThermoSeparation Products (San Jose, CA, USA).

### 2.2. Chemicals and reagents

Artesunate and artemether were provided by Arengo Pharmaceutica (Aarschot, Belgium). Mefloquine hydrochloride, primaquine diphosphate, and sulfadoxine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Atovaquone and Halfan<sup>®</sup> tablets from which halofantrine was obtained

by extraction were purchased from GlaxoSmithKline (Genval, Belgium). Butylhydroxyanisole (BHA) was from Merck (Darmstadt, Germany) and butylhydroxytoluene (BHT) from VWR International (Leuven, Belgium).

Sodium tetraborate decahydrate, monosodium dihydrogen phosphate, disodium monohydrogen phosphate, triethanolamine, and ACN were obtained from Merck. Sodium hydroxide (NaOH) and N-methylformamide (NMF) were obtained from VWR International, phosphoric acid and SDS from Acros Organics (Geel, Belgium), and ethanol (EtOH) from Sigma-Aldrich.

MeOH was purchased from Merck, ultra-pure water was supplied by a Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA), and Chromafil® syringe filters (0.20 µm) were from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

### 2.3. Standard solutions

Stock solutions of artemether and artesunate were prepared in MeOH at a concentration of 100 mg/mL. For the other molecules, stock solutions were prepared in the same solvent to obtain a concentration of 1 mg/mL. These solutions were filtered through a syringe filter and stored at 4°C.

Artesunate and artemether stock solutions were diluted in order to obtain a 3.5 mg/mL concentration and the other stock solutions were diluted to obtain a concentration of 35 µg/mL. Dilutions were carried out with MeOH and water in order to get a mixture 70–30% (v/v) in each injected sample.

### 2.4. Electrophoretic conditions

Electrophoretic separations were carried out with uncoated fused silica capillaries having 50 µm i.d. and 48.5 cm total length (40 cm effective length). At the beginning of each working day, the capillary was washed with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, and water for 10 min each. Before each injection, the capillary was successively washed with 1 M NaOH for 2 min, water for 1 min, and was then equilibrated with the BGE for 3min. After each run, the capillary was washed with ACN–water 50:50 (v/v) for 2 min, ACN for 3 min, and water for 1 min. Capillary wash cycles were performed at a pressure of approximately 1 bar. Injections were made by applying a pressure of 50 mbar for a period of 5 s. During the run, the applied voltage was 20 kV and the capillary was thermostated at a temperature of 27.5°C.

Buffers were made up of 10 mM monosodium dihydrogen phosphate and disodium monohydrogen phosphate for pH 7.5, 10 mM disodium tetraborate decahydrate and NaOH for pH 11, and 100 mM phosphoric acid and triethanolamine for pH 2.2.

BGEs were prepared by addition of 0–90 mM SDS and 0–75% (v/v) ACN and then filtration through a syringe filter.

Electropherograms were mainly observed at 210 nm, although all data were recorded from 190 to 400 nm. EOF was determined by MeOH present in each sample.

### 3. Results and discussion

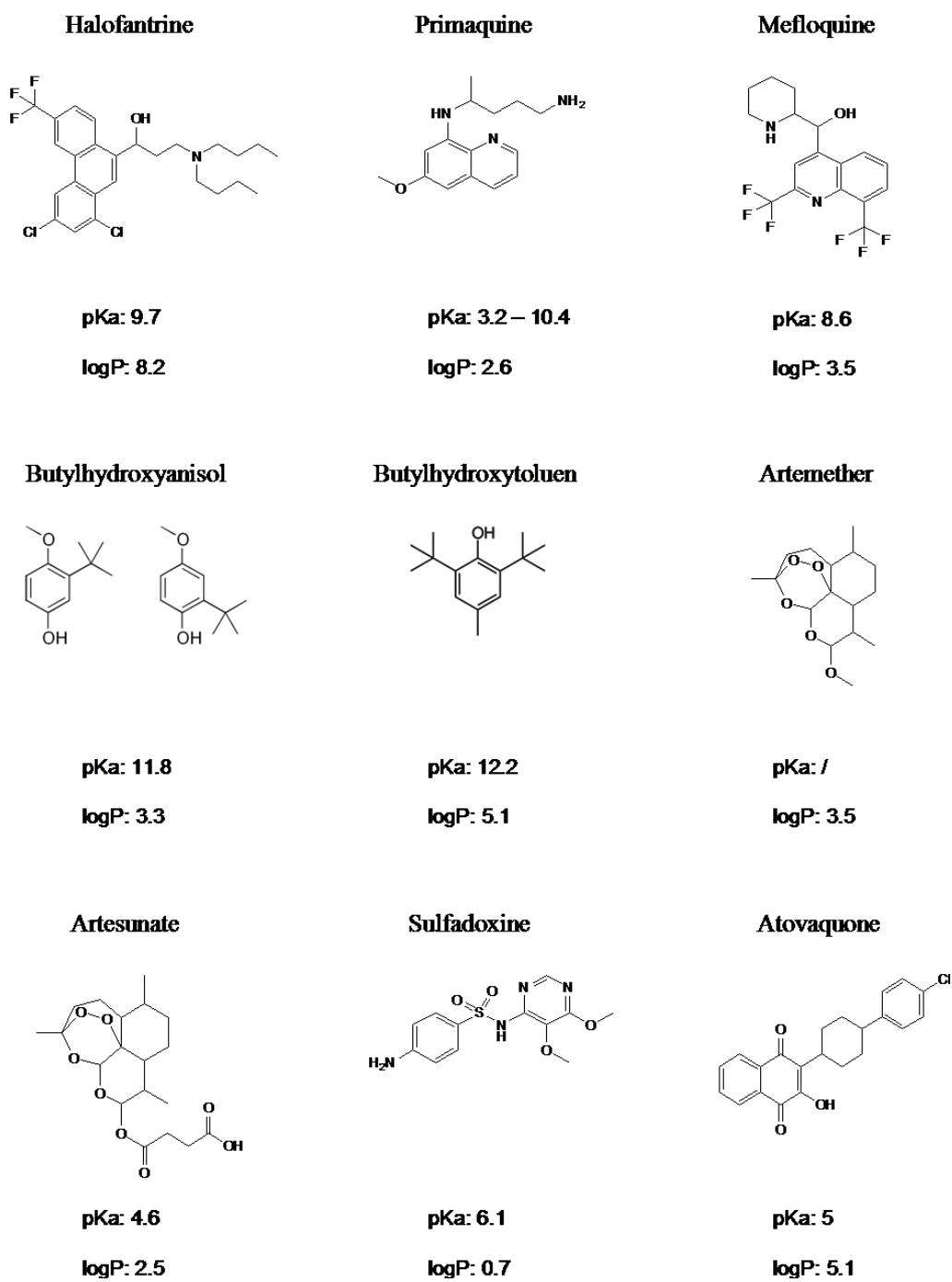
In MEKC systems, the effective mobility of the analytes results from their own electrophoretic mobility but also from their interaction with the micelles and thus depends on the analyte fraction incorporated into the micelles and the electrophoretic mobility of the micelles. The effective mobility ( $\mu_{eff}$ , in  $\text{cm}^2/\text{volt}\cdot\text{s}$ ) can be calculated according to the equation involving the migration time of the analyte ( $t$ ) and the migration time of EOF ( $t_{eo}$ ):

$$\mu_{eff} = \frac{l \cdot L}{V} \left( \frac{1}{t} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad (1)$$

with  $l$ : effective length of capillary,  $L$ : total length, and  $V$ : voltage. It is worth noting that  $1/t$  was considered equal to zero when  $t$  was higher than 80 min.

The measurement of the effective mobility can represent an advantage over the calculation of the retention factor, which requires the determination of the migration time of micelles ( $t_{mc}$ ). Actually,  $t_{mc}$  is not easy to measure accurately. For example, Sudan III is often used as marker for the micelles but because of its very poor solubility in water and its tendency to adsorb onto the capillary wall, it is not always possible to observe its peak [28]. Moreover, under some conditions, highly hydrophobic compounds interact more strongly with the micelles than Sudan III (e.g. Triclosan®) [29]. This observation was also made in our laboratory with halofantrine and  $\gamma$ -schisandrin (data not shown). In such a case, the determination of retention factors is not possible. Finally, the micellization can be incomplete, especially when organic cosolvents are used. This makes the use of micelle tracers unsuitable [17]. Therefore, how to obtain the “true”  $t_{mc}$  is still a matter of discussion [30].

In order to study the migration behavior of differently charged analytes in SDS/ACN MEKC systems, nine compounds were selected as model substances: halofantrine, primaquine, mefloquine, BHA, BHT, artemether, artesunate, sulfadoxine, and atovaquone (Fig. 1).



**Figure 1.** Chemical structures of the studied compounds with their pKa and logP; most of them coming from Merck Index database.



ACN is commonly used as organic modifier in MEKC systems. However, some experiments were also carried out with two other modifiers: NMF and EtOH. Nevertheless, no significant advantage with respect to selectivity was obtained compared to ACN (data not shown).

A univariate approach was then carried out at three pH (7.5, 11, and 2.2) by varying the SDS concentration and the ACN proportion. The migration times of cations, neutrals, and anions were measured in duplicate and the corresponding mean effective mobilities were calculated.

### 3.1. Neutral BGE (pH 7.5)

At pH 7.5, two cationic (halofantrine and primaquine), two uncharged (BHA and BHT), and two anionic (artesunate and sulfadoxine) compounds were analyzed. Different SDS concentrations (from 0 to 90 mM) and ACN proportions (from 0 to 75%) were tested.

Figure 2A–D illustrates the influence of ACN proportion on the effective mobilities at SDS concentrations of 0, 20, 55, and 90 mM, respectively.

Figure 2A illustrates CZE migration behavior; i.e. neutrals migrate with EOF, cations have positive effective mobility, whereas anions exhibit a negative mobility.

Interestingly, in the presence of SDS and with a low ACN proportion, cations and neutrals migrate after anions (Fig. 2B–D). Their effective mobilities are highly negative, which means that they interact strongly with the SDS micelles.

For neutrals, only hydrophobic interaction with the core of the micelles may occur. The migration order of these analytes is related to their logP (Fig. 1). The negative mobilities observed for cations are due not only to hydrophobic bonds but also to ionic interactions with the sulfate groups of SDS.

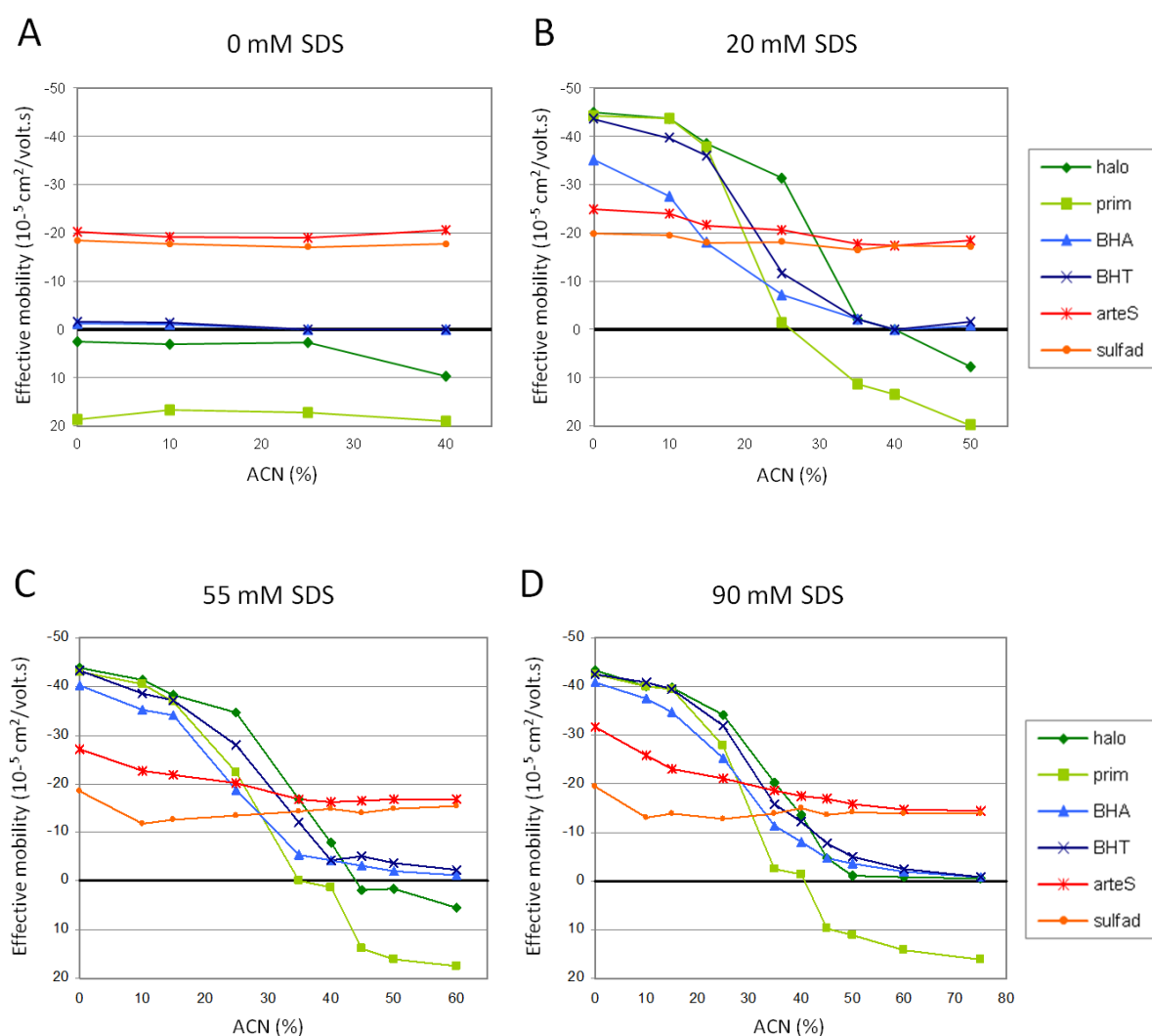
This can explain why cations have a higher negative mobility than neutral compounds, when the proportion of ACN is very low. Actually, even primaquine, which has a lower logP than BHT and BHA, migrates after them.

As expected, negative mobilities of cationic and neutral compounds decrease with the increase of ACN proportion (Fig. 2B–D), which means that ACN decreases the interactions between analytes and micelles. At a low SDS concentration and a high ACN proportion, these interactions do not seem to occur anymore. Then, the behavior of the analytes is again close to CZE: neutrals migrate with EOF and cations migrate before EOF.

For 20, 55, and 90 mM SDS concentrations, primaquine has a positive mobility from 35, 40, and 45% ACN, respectively. And the neutrals have mobilities near 0 (between 0 and  $-4 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/Vs) from 35, 50, and 60% ACN for 20, 55, and 90 mM SDS concentrations, respectively. This confirms that the

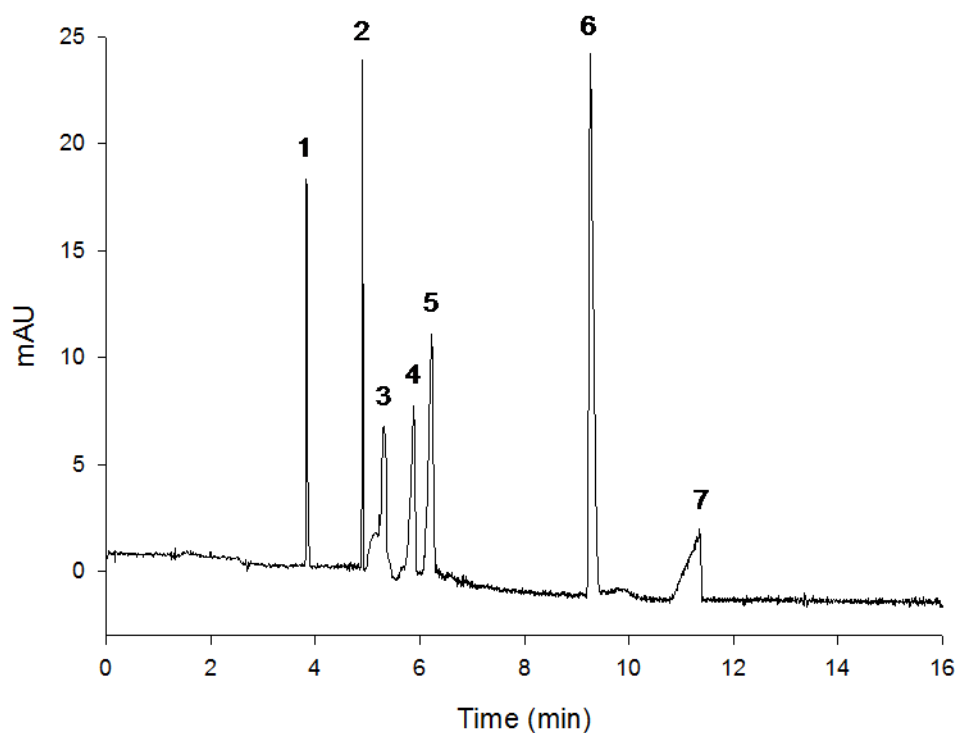
decrease of analyte–micelles interactions caused by ACN can be somewhat compensated by an increase of SDS concentration.

Mobilities of anionic compounds were found to be only slightly influenced by SDS concentration and ACN proportion (Fig. 2B–D). Nevertheless, a difference between the effective mobilities of artesunate and sulfadoxine can be observed when the ACN proportion is low and the SDS concentration is high: artesunate, which has a higher logP, has also a more negative mobility. It means that the anions interact somewhat with the SDS micelles and, as mentioned above, these interactions decrease with increasing ACN proportion.



**Figure 2.** Effective mobilities obtained in pH 7.5 BGE for halofantrine (halo), primaquine (prim), BHA, BHT, artesunate (arteS), and sulfadoxine (sulfad), depending on the ACN proportion at (A) 0 mM, (B) 20 mM, (C) 55 mM, and (D) 90 mM SDS.

Figure 2 confirms that, in MEKC systems, neutrals can be separated from EOF and from each other but also illustrates that the separation of charged analytes can be enhanced. Some conditions are relevant for the fast separation of such a mixture, e.g. at 55 mM SDS and 45% ACN (Fig. 2C). Figure 3 shows the electropherogram obtained under these conditions, allowing the separation of the two cationic, two uncharged, and two anionic compounds in <12 min. Other conditions seem to be appropriate as well, e.g. with 25% ACN and 20, 55, or 90 mM SDS, with an analysis time increasing with SDS concentration.



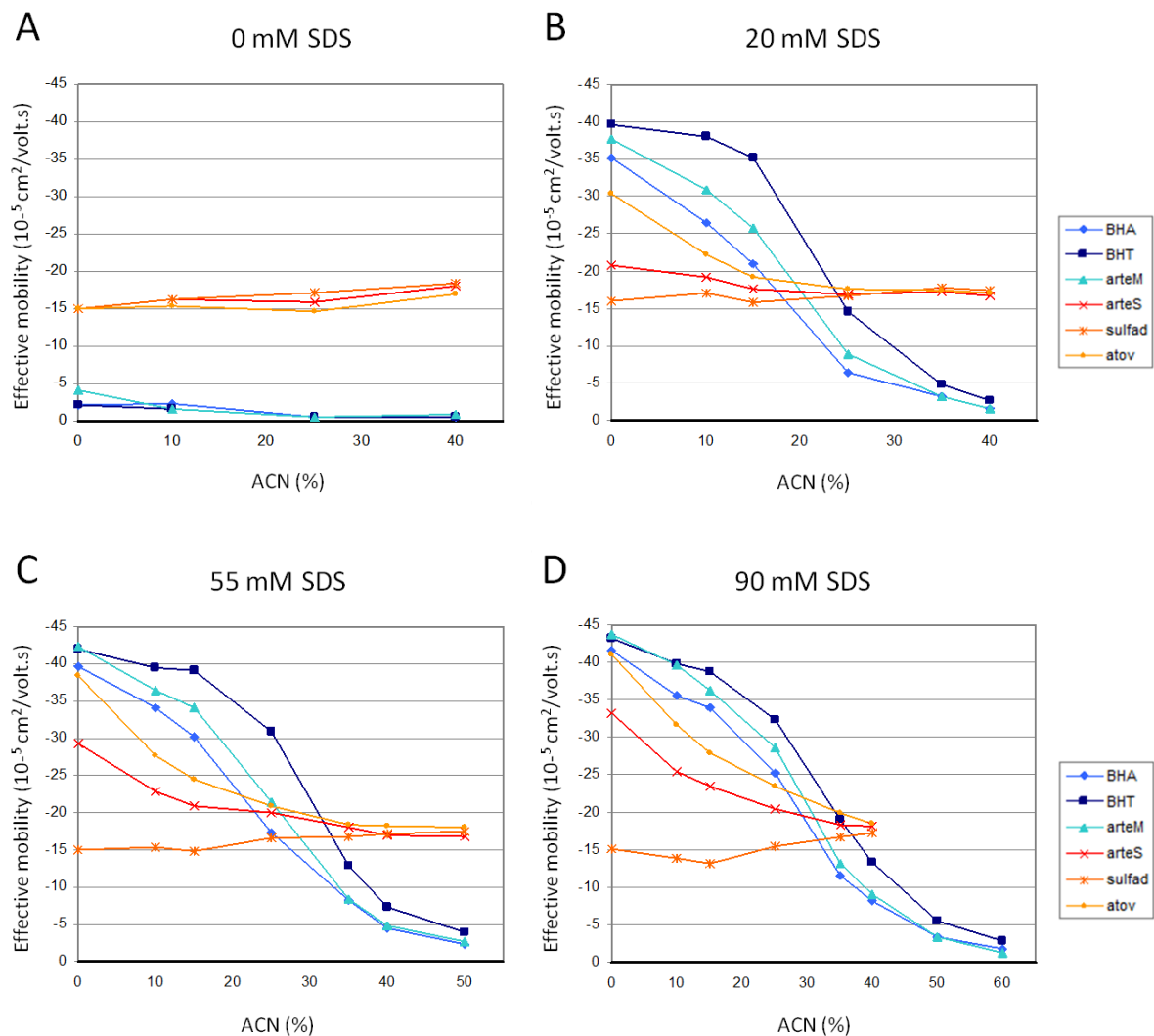
**Figure 3.** Electropherogram of the six studied compounds at pH 7.5, 55 mM SDS, and 45% ACN.

See Section 2.4 for other electrophoretic conditions. Peak identification: 1 = primaquine, 2 = halofantrine, 3 = EOF, 4 = BHA, 5 = BHT, 6 = sulfadoxine, 7 = artesunate.

The choice of a neutral pH is favorable due to the fact that the three classes of compounds (neutral, cationic and anionic) have distinct mobility values.

### 3.2. Basic BGE (pH 11)

At pH 11, three anionic (artesunate, sulfadoxine, and atovaquone), one uncharged (artemether), and two predominantly uncharged (BHA and BHT) compounds were analyzed. Similarly to neutral BGE studies, different SDS concentrations (from 0 to 90mM) and ACN proportions (from 0 to 50%) were tested.



**Figure 4.** Effective mobilities obtained in pH 11 BGE for BHA, BHT, artemether (arteM), artesunate (arteS), sulfadoxine (sulfad), and atovaquone (atov), depending on the ACN proportion at (A) 0 mM, (B) 20 mM, (C) 55 mM, and (D) 90 mM SDS.

Figure 4A–D illustrates the influence of ACN proportion on the effective mobilities, at SDS concentrations of 0, 20, 55, and 90 mM, respectively.

The analytes interact with the micelles through hydrophobic bonds and, inside each group (neutrals and anions), the migration order depends on the hydrophobicity of the analytes (Fig. 1).

Negative mobilities of the neutral compounds decrease with increasing ACN proportion and increase with SDS concentration (Fig. 4B–D). At 40% ACN and above, neutrals migrate before anions; at 15% ACN and below, they migrate after anions; and at intermediate ACN proportion, the migration order depends on the SDS concentration.

The anionic compounds have mobilities that tend to become constant (between  $-18.5$  and  $-15 \times 10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{Vs}$ ) with increasing ACN proportion and decreasing SDS concentration (Fig. 4B–D).

Figure 4 shows that some conditions are particularly interesting for the separation of the studied mixture, e.g. at 20 or 55 mM SDS and 10 or 15% ACN. At 90 mM SDS and 15 or 25% ACN, the separation could also be achieved but with a much longer analysis time.

As observed at neutral pH, the basic BGE is useful since neutral and anionic compounds have different migration behavior. But it is less attractive for the separation of several basic compounds that are no longer protonated and therefore migrate all together as neutrals.

### 3.3. Acidic BGE (pH 2.2)

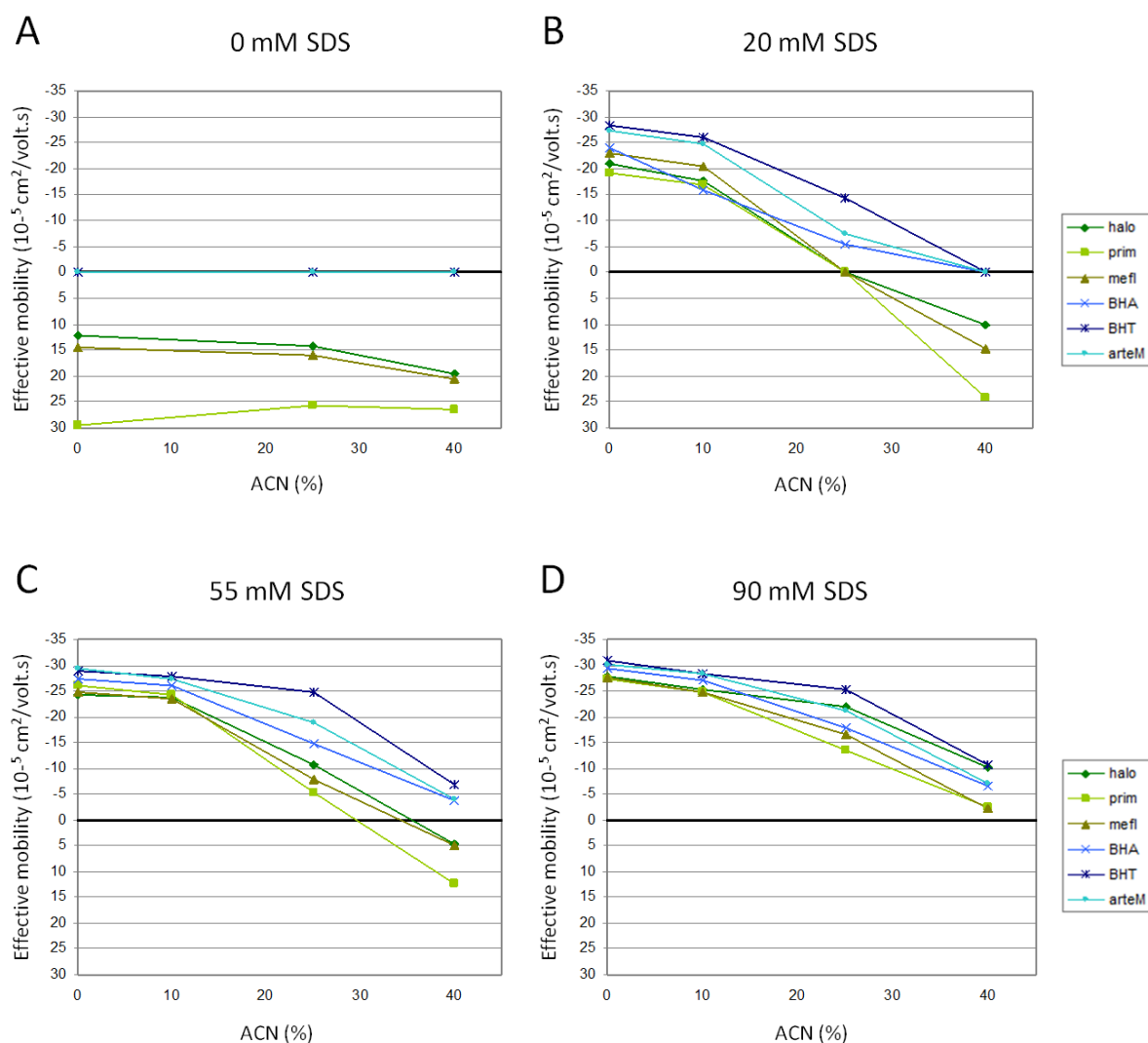
At pH 2.2, three cationic (halofantrine, primaquine, mefloquine) and three uncharged (BHA, BHT, and artemether) compounds were analyzed. Different SDS concentrations (from 0 to 90 mM) and ACN proportions (from 0 to 40%) were also evaluated.

Figure 5A–D illustrates the influence of ACN proportion on the effective mobilities, at SDS concentrations of 0, 20, 55, and 90 mM, respectively.

It is worth noting that most of the studied analytes were observed using the negative polarity mode but the positive polarity mode was necessary to detect the cations under some conditions.

As EOF was almost equal to zero at pH 2.2,  $1/t_{\text{eo}}$  was considered equal to zero to calculate the effective mobility.

At pH 2.2, negative mobilities for cationic and neutral compounds also decrease with increasing ACN proportion and increase with SDS concentration (Fig. 5B–D). Like at pH 7.5 and 11, the migration order of the analytes inside each group (neutrals and cations) depends on their logP (Fig. 1). But the main difference with pH 7.5 is that the cations migrate before the neutrals with a low ACN proportion. It is worth noting that logP values are calculated for uncharged forms. At very acidic pH, the apparent logP values of the basic compounds are much decreased.

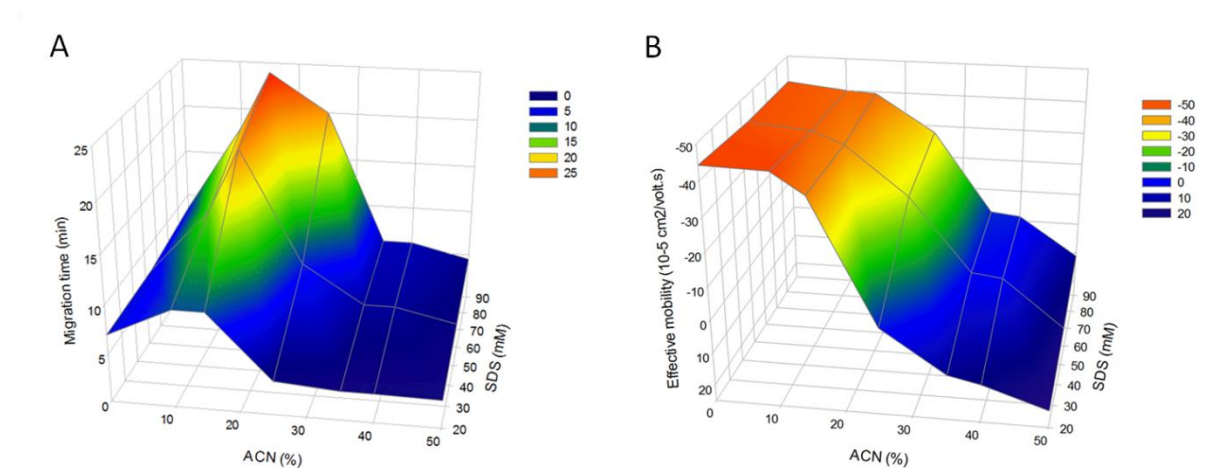


**Figure 5.** Effective mobilities obtained in pH 2.2 BGE for halofantrine (halo), primaquine (prim), mefloquine (mefl), BHA, BHT, and artemether (arteM), depending on the ACN proportion at (A) 0 mM, (B) 20 mM, (C) 55 mM, and (D) 90 mM SDS.

In terms of separation potential, only the conditions at 55 mM SDS and 25% ACN seem to be useful (Fig. 5C). Actually, the use of acidic BGE is much less favorable due to the presence of only neutral and cationic compounds that have rather similar migration behaviors. Moreover, under some conditions, the cations migrate toward the cathode and the neutrals toward the anode, which means that they cannot be analyzed within the same run. Lastly, due to very low EOF, the analysis time can be very long, especially when the effective mobility of the compounds is close to 0.

### 3.4. Effective mobility versus migration time

At pH 7.5 and 11, EOF plays a major role in the determination of mobility (Eq. (1)) and as expected,  $t_{eo}$  increases with increasing organic modifier proportion. So it is worth noting that, while the effective mobilities of cations and neutrals decrease with increasing organic modifier proportion, their migration times first increase reaching a maximum and then decrease. Figure 6 illustrates the influence of ACN proportion on primaquine migration time and effective mobility.



**Figure 6.** (A) Migration time and (B) effective mobility of primaquine at pH 7.5, depending on the SDS concentration and the ACN proportion.

Lower proportions of organic modifier are therefore interesting to enlarge the migration window and on the contrary, higher proportions will shorten the migration times of highly hydrophobic analytes.

## 4. Conclusion

At neutral, basic, and acidic pH, the migration behavior of analytes in MEKC presents some similarities. While anions interact weakly with SDS micelles, neutrals and cations interact with SDS through hydrophobic bonds and also through ionic interactions for cations. At high SDS concentrations and low ACN proportions, the migration order of analytes is reversed compared to CZE: EOF first, then anions, then neutrals and cations. The analytes–micelles interactions become weaker with decreasing SDS concentration and increasing ACN proportion. A high ACN proportion can cause the disappearance of these interactions; therefore, the migration order is again comparable to that in CZE. The proper handling of those considerations makes MEKC a very

attractive tool not only for the separation of neutral compounds but also of variously charged analytes.

Since the separation of complex mixtures is controlled by a high number of parameters in MEKC and since the migration order can be reversed, a multivariate approach is recommended to optimize the proportions of surfactant and organic modifier as well as the pH, in order to obtain complete resolution within a short analysis time.

*Many thanks are due to the FNRS and the Léon Fredericq Fund for their financial supports.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5. References

- [1] Cohen, A. S., Terabe, S., Smith, J. A., Karger, B. L., *Anal. Chem.* 1987, 59, 1021–1027.
- [2] Terabe, S., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 1989, 8, 129–134.
- [3] Muijselaar, P. G., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1997, 780, 41–61.
- [4] Terabe, S., *Chem. Rev.* 2008, 8, 291–301.
- [5] El Deeb, S., Iriban, M. A., Gust, R., *Electrophoresis* 2011, 32, 166–183.
- [6] Bechet, I., Fillet, M., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis* 1994, 15, 1316–1321.
- [7] Hilhorst, M. J., Derksen, A. F., Steringa, M., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2001, 22, 1337–1344.
- [8] Kuroda, N., Sato, D., Ohyama, K., Wada, M., Nakahara, Y., Nakashima, K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2001, 49, 905–908.
- [9] Mallampati, S., Leonard, S., De Vulder, S., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 4079–4088.
- [10] Gibson, G., Ramstad, T., Mills, K.A., Dunn, M. J., *Farmaco* 2005, 60, 847–853.
- [11] Dalmora, S. L., Oliveira, P. R., Barth, T., Todeschini, V., *Anal. Sci.* 2008, 24, 499–503.
- [12] Flores, J. R., Salcedo, A. M., Fernandez, L. M., *Anal. Chem. Insights* 2008, 3, 91–101.
- [13] Thormann, W., Theurillat, R., Zimmerli, S., *J. Pharm. Biomed.* 2010, 53, 1313–1318.
- [14] Nussbaumer, S., Fleury-Souverain, S., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L., Bonnabry, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 55, 253–258.
- [15] Wetsel, D. L. B., Charalambous, G., *Instrumental Methods in Food and Beverage Analysis*, Elsevier Science B. V., Amsterdam 1998.
- [16] Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P. A., Testa, B., *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002, 15, 225–234.



- [17] Vindevogel, J., Sandra, P., Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography, Hu" thig, Heidelberg 1992.
- [18] Binana-Limbele, W., Zana, R., Colloid Polym. Sci. 1989, 267, 440–447.
- [19] Silva, M., Electrophoresis 2007, 28, 174–192.
- [20] Liu, Z., Zou, H., Ye, M., Ni, J., Zhang, Y., J. Chromatogr. A 1999, 863, 69–79.
- [21] Terabe, S., Procedia Chem. 2010, 2, 2–8.
- [22] Lopez-Grio, S., Baeza-Baeza, J. J., Garcia-Alvarez-Coque, M. C., Chromatographia 1998, 48, 655–663.
- [23] Zana, R., Adv. Colloid Interface Sci. 1995, 57, 1–64.
- [24] Lukkari, P., Vuorela, H., Riekkola, M. L., J. Chromatogr. A 1993, 655, 317–324.
- [25] Bretnall, A. E., Clarke, G. S., J. Chromatogr. A 1995, 716, 49–55.
- [26] Liu, Z., Zou, H., Ye, M., Ni, J., Zhang, Y., Electrophoresis 1999, 20, 2898–2908.
- [27] Thorsteinsdottir, M., Ringbom, C., Westerlund, D., Andersson, G., Kaufmann, P., J. Chromatogr. A 1999, 831, 293–309.
- [28] Chankvetadze, B., Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1997.
- [29] Prevot, A. B., Pramauro, E., Gallarate, M., Carlotti, M. E., Orio, G., Anal. Chim. Acta 2000, 412, 141–148.
- [30] Ackermans, M. T., Everaerts, F. M., Beckers, J. L., J. Chromatogr. 1991, 585, 123–131.





## Section 2

Séparation de petites molécules  
médicamenteuses appartenant à  
la même classe pharmacologique



Après nous être intéressés au comportement de composés modèles en MEKC et nous être convaincus de l'importance à accorder au choix du pH, de la concentration en surfactant et de la proportion en modificateur organique, nous avons appliqué ce mode de séparation à l'analyse de molécules médicamenteuses.

Dans cette partie, la MEKC a été utilisée pour analyser simultanément 15 petites molécules d'une même classe pharmacologique, les antipaludiques. Cette classe a été choisie car elle est une cible privilégiée de la contrefaçon médicamenteuse, particulièrement dans les pays non industrialisés. Le développement d'une méthode simple et générique était donc utile pour réaliser le contrôle qualité de ces médicaments.

Ces molécules étant de structure différente, certaines seront neutres et d'autres chargées quel que soit le pH choisi. La MEKC est donc indispensable et un plan d'expériences a été entrepris afin de déterminer les conditions optimales de séparation. De plus, étant donné le grand nombre de molécules à étudier, des groupes ont été formés et une détection automatisée (Independent Component Analysis) a été utilisée pour faciliter l'identification lors du traitement des résultats.



Electrophoresis 2012, 33, 1669–1678

DEVELOPMENT OF A GENERIC MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY  
METHOD FOR THE SEPARATION OF 15 ANTIMALARIAL DRUGS  
AS A TOOL TO DETECT MEDICINE COUNTERFEITING

Caroline Lamalle, Roland Djang'Eing'A Marini, Benjamin Debrus, Pierre Lebrun,  
Jacques Crommen, Philippe Hubert, Anne-Catherine Servais, Marianne Fillet





## Abstract

Since antimalarial drugs counterfeiting is dramatically present on the African market, the development of simple analytical methods for their quality control is of great importance. This work consists in the CE analysis of 15 antimalarials (artesunate, artemether, amodiaquine, chloroquine, piperazine, primaquine, quinine, cinchonine, mefloquine, halofantrine, sulfadoxine, sulfalen, atovaquone, proguanil, and pyrimethamine). Since all these molecules cannot be ionized at the same pH, MEKC was preferred because it also allows separation of neutral compounds. Preliminary experiments were first carried out to select the most crucial factors affecting the antimalarials separation. Several conditions were tested and four parameters as well as their investigation domain were chosen: pH (5–10), SDS concentration (20–90 mM), ACN proportion (10–40%), and temperature (20–35°C). Then, the experimental design methodology was used and a central composite design was selected. Mathematical modeling of the migration times allowed the prediction of optimal conditions (29°C, pH 6.6, 29 mM SDS, 36% ACN) regarding analyte separation. The prediction at this optimum was verified experimentally and led to the separation of 13 compounds within 8 min. Finally, the method was successfully applied to the quality control of African antimalarial medicines for their qualitative and quantitative content.

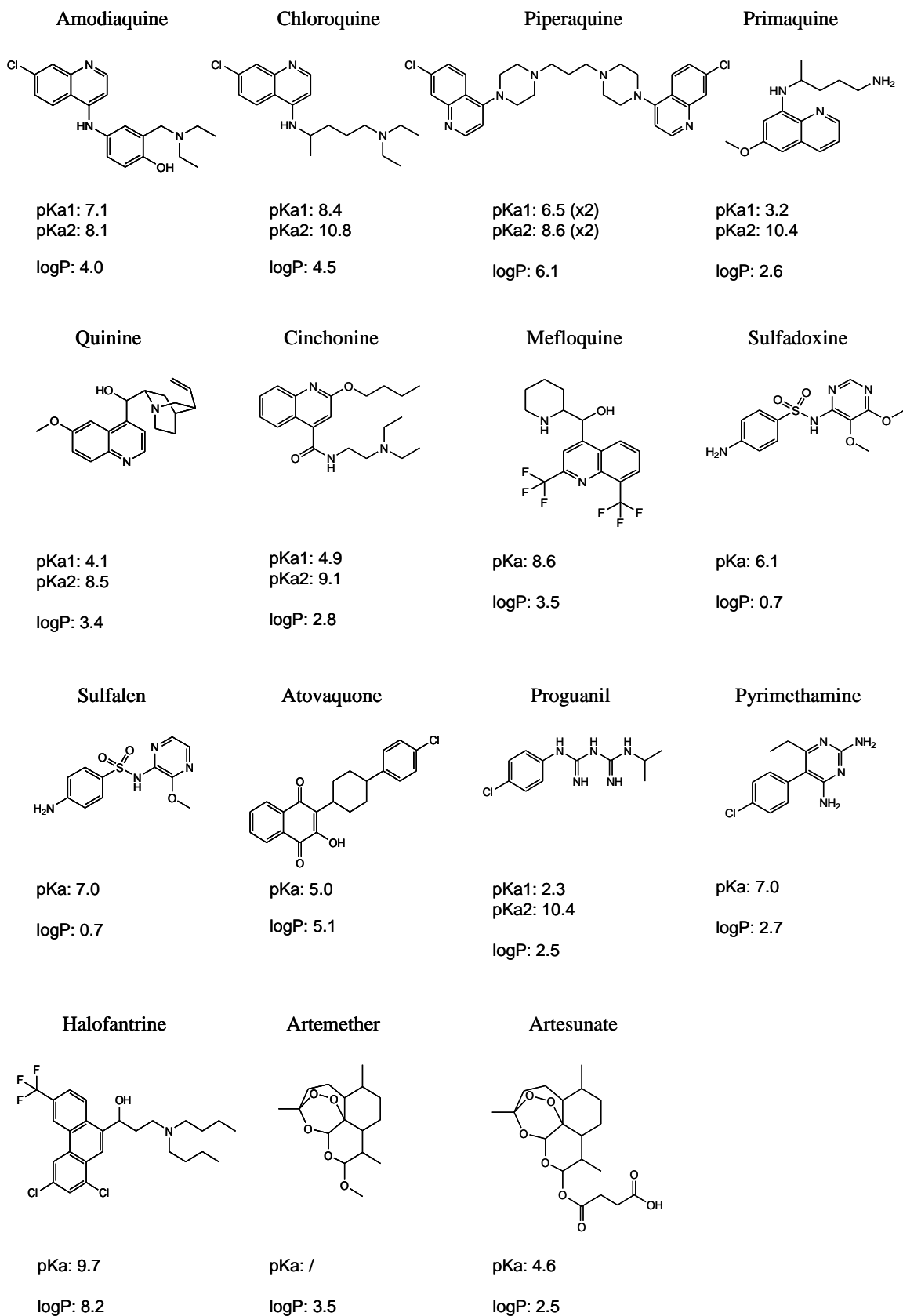


## 1. Introduction

Malaria is one of the most dramatic parasitic diseases affecting people all over the world and especially in sub-Saharan Africa where *Plasmodium falciparum* is prevalent. Approximately 250 million people are infected by this parasite per year and one million die annually [1, 2]. Several antimalarial drugs can be administered as prophylaxis and for the treatment of this illness. Since 2001, the artemisinin-based combination therapies are recommended by the World Health Organisation (WHO) [2–4]. Unfortunately, little information is available concerning the quality of the products present on the market. Prescribers are unable to assess their quality, safety, and efficacy. The WHO has estimated that approximately 25% of the medicines are counterfeited in developing countries and that this percentage can reach 50% in some parts of Africa [1]. It is worth noting that drug counterfeiting is affecting the whole world. A counterfeit medicine is one that is deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source (WHO, Geneva, 1999). As a result, some patients may receive overdosed medicines; however, in most cases the medicines are underdosed. The active compound may be missing or replaced with another one. Therefore, the medicine counterfeiting contributes to therapeutic failures and can increase the incidence of drug resistance. Some cases can also lead to death. Moreover, the presence of counterfeit drugs decreases the public confidence and may result in a reduced uptake of potentially helpful medicines [1, 5, 6]. It is therefore essential to strengthen the control of pharmaceutical products present on the African market.

Over the last five years, different analytical methods have been developed to analyze antimalarial drugs. Refractometry, colorimetry, potentiometric titration, UV spectroscopy, Raman spectroscopy, and infrared spectroscopy can be applied to the analysis of pharmaceutical formulations [7–10].

Separations techniques such as HPLC or CE are still the most commonly used. Lots of HPLC methods were developed for the analysis of antimalarials in biological samples [11–14] but, also for the quality control of medicines [15–19]. CE methods were essentially optimized for the analysis of antimalarials in biological samples [20, 21] and/or for separation of their isomers [22–24]. These CE methods were often used to analyze one or two molecules and rarely for several molecules simultaneously. However, Tsimachidis et al. have developed a method for four main Cinchona alkaloids [24] and Taylor et al. have separated 11 basic antimalarial drugs and their metabolites [25]. To the best of our knowledge, no CE method with a direct application for the quality control of pharmaceutical formulations has been developed so far, except for piperazine [4] and quinine [6] and the sulfadoxine pyrimethamine association [26].



**Figure 1.** Chemical structures of the studied compounds with their pKa and logP.

A major cause in the lack of quality control in low income countries is that the developed methods require too expensive instrumentation and facilities. Therefore, CE could be a suitable alternative due to its low consumption of solvents and samples associated to rapidity and easiness of use. Moreover, there is a possibility of using a low-cost capillary electrophoresis device [6]. Other well-known advantages of CE are also high efficiency and selectivity.

Therefore, the aim of the present study was to develop a simple MEKC method able to simultaneously separate 15 common antimalarial drugs depicted in Fig. 1 (artesunate, artemether, amodiaquine, chloroquine, piperaquine, primaquine, quinine, mefloquine, cinchonine, sulfadoxine, sulfalen, atovaquone, proguanil, pyrimethamine, and halofantrine). The developed method will then be used for controlling the quality of medicines coming from the African market.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Artesunate and artemether were provided from Arenco Pharmaceutica (Aarschot, Belgium). Amodiaquine hydrochloride, chloroquine diphosphate, cinchonine, mefloquine hydrochloride, primaquine diphosphate, pyrimethamine, and sulfadoxine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Quinine sulfate was provided from Certa (Braine l'Alleud, Belgium). Atovaquone, proguanil hydrochloride, and the Halfan<sup>®</sup> tablets from which halofantrine was obtained by extraction were purchased by GlaxoSmithKline (Genval, Belgium). Piperaquine was obtained by extraction from P-Gvaxin tablets and was provided by BlissGVS pharma (Mumbai, India). Sulfalene were purchased from Fagron NV/SA (Waregem, Belgium). The internal standards (IS), betahistine, and sulfamerazine were from Sigma-Aldrich.

Sodium tetraborate decahydrate, sodium dihydrogen phosphate, sodium hydrogen phosphate, HCl (37%), ACN, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and THF were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). NaOH, sodium citrate, and sodium dihydrogen citrate were obtained from VWR International (Leuven, Belgium), phosphoric acid and SDS from Acros Organics (NJ, USA).

Methanol (MeOH) was purchased from Merck, ultrapure water was supplied by a Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA) and Chromafil<sup>®</sup> syringe filters (0.20 µm) were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

## 2.2. Buffers and BGE

Buffers were made up of 10 mM sodium tetraborate decahydrate and HCl or NaOH for a pH between 8 and 10, sodium citrate and sodium dihydrogen citrate for pH 5 and 5.8, sodium dihydrogen phosphate and phosphoric acid for pH 3 and sodium dihydrogen phosphate and sodium hydrogen phosphate for pH 6 and 7.5. Unless otherwise mentioned, BGE was prepared by the addition of 20–90 mM SDS and 10–40% (v/v) ACN and then filtered through a syringe filter.

## 2.3. Sample preparation

Stock solutions of artemether and artesunate were prepared in MeOH at a concentration of 50 mg/mL. For the other 13 antimalarial drugs, stock solutions were prepared in the same solvent to obtain a concentration of 1 mg/mL. These solutions were filtered through a syringe filter and stored at 8°C.

To reduce the number of analyses, several compounds were introduced in each sample (cf. Table 1). The set of 15 molecules was divided into four groups in such a way that each molecule is present in two groups. They were distributed according to their chemical structure to avoid a similar electrophoretic behavior and to their UV spectrum to allow an easier identification.

**Table 1.** Repartition of the 15 molecules in 4 groups of injection.

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Artemether	Artesunate	Artemether	Artesunate
Chloroquine	Primaquine	Primaquine	Chloroquine
Amodiaquine	Quinine	Amodiaquine	Quinine
Atovaquone	Mefloquine	Atovaquone	Mefloquine
Sulfalen	Sulfadoxine	Sulfadoxine	Sulfalen
Proguanil	Pyrimethamine	Pyrimethamine	Proguanil
Piperaquine	Piperaquine	Cinchonine	Cinchonine
		Halofantrine	Halofantrine

Artesunate and artemether stock solutions were diluted in order to obtain a 5 mg/mL concentration and the other stock solutions were diluted to obtain a concentration of 50 µg/mL. Except otherwise mentioned, dilutions were performed with MeOH and water in order to obtain a mixture 70:30 (v/v) in each injected sample.

For the analysis of antimalarial drugs, the standard solutions were prepared by dissolving the standards in water for chloroquine and in MeOH for the other ones, and then the ISs (betahistine and/or sulfamerazine, dissolved in MeOH) were added. Appropriate solvent was used to reach the proportion of 70:30 MeOH-water (v/v). For the preparation of the sample solutions, the powder coming from the tablets previously grinded was mixed with the same solvent as described above but with the addition of a centrifugation step. The following steps were similar as for the standard solutions. For the quantitation of *Amodiaquine Suspension*<sup>®</sup>, the standard addition method was used. At a sample solution, prepared by mixing the suspension with MeOH and with a centrifugation step, three different standard concentrations were added. The IS was then added as well as the appropriate solvent to reach the proportion of 70:30 MeOH water (v/v).

#### 2.4. Instrumentation

All the experiments were carried out on a HP<sup>3D</sup>CEsystem (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, an on-column DAD and a temperature control system (15–60°C ± 0.1°C). Chemstation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) was used for instrument control, data acquisition and data analysis. Fused silica capillaries were provided by ThermoSeparation Products (San Jose, CA, USA).

Electrophoretic separations were carried out on uncoated fused silica capillaries having 50 µm i.d. and 48.5 cm total length (40 cm effective length). At the beginning of each working day, the capillary was washed with 1M NaOH, 0.1M NaOH, and water for 10 min each. Before each injection, the capillary was successively washed with 1 M NaOH for 2 min, water for 1 min and was then equilibrated with the BGE for 3 min. After each run, the capillary was washed with ACN water 50:50 (v/v) for 2 min, ACN for 2 min and water for 1 min. Capillary wash cycles were performed at a pressure of approximately 1 bar. Injections were made by applying a pressure of 50 mbar for a period of 5 s. During the run, the applied voltage was 20 kV and the capillary was thermostated at a temperature between 20°C and 35°C following the conditions defined by the design of experiments. Electropherograms were recorded from 190 nm to 400 nm while the peak integration was performed at 210 nm.



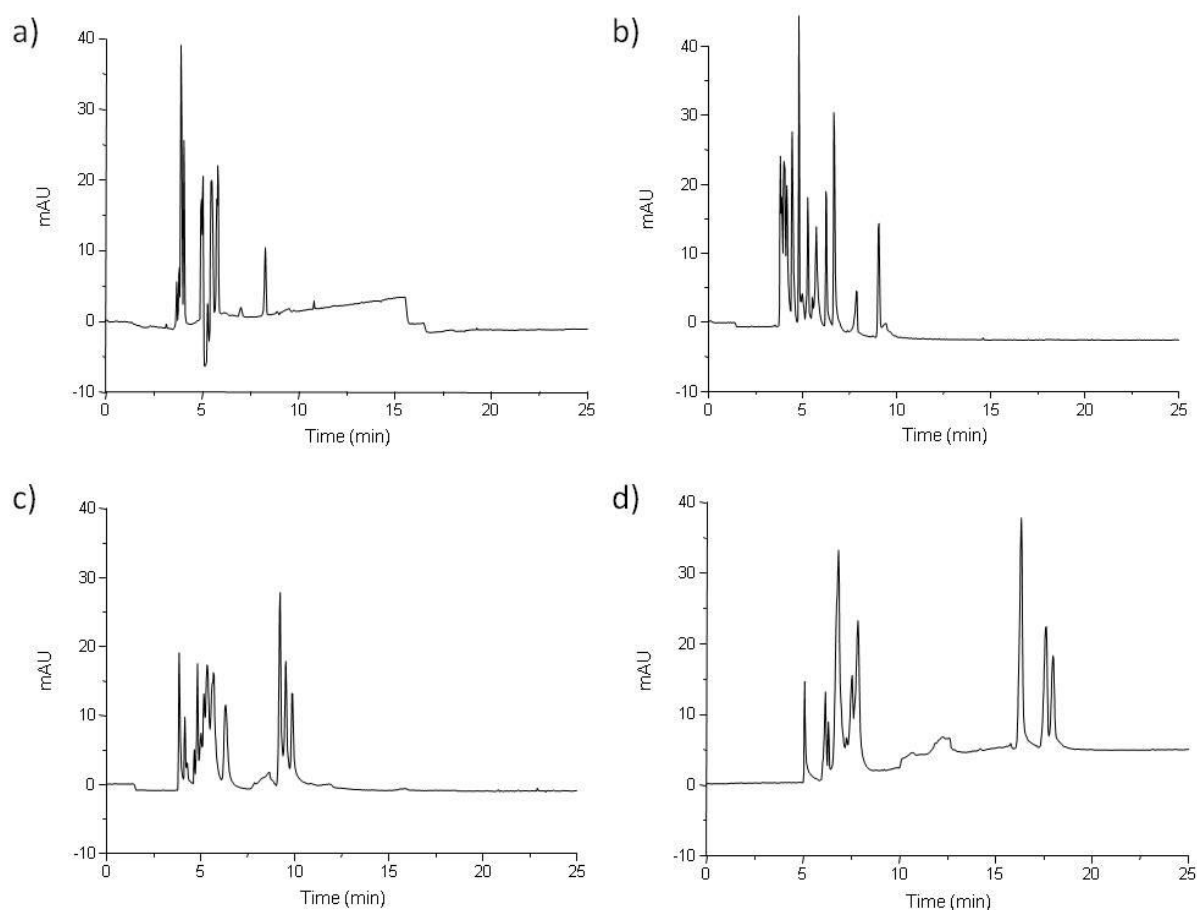
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of the MEKC conditions

As the 15 antimalarials have different pKa (cf. Fig. 1), they cannot be all ionized at a given pH. A technique able to separate charged and neutral compounds in one single run was therefore essential and MEKC was chosen. With this approach, surfactant-formed micelles (such as SDS) are included in the BGE. Depending on their hydrophobicity, compounds may interact with the core of the micelles modifying their migration [26].

In order to optimize the separation, an experimental design methodology was used and a central composite design (CCD) was employed.

##### 3.1.1. Selection of the studied factors and their experimental domain



**Figure 2.** Effect of the pH on the analysis time: electropherograms of 13 antimalarials at (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 8, and (d) pH 10, with 40 mM SDS and 35% ACN.

The first step of the method development was to screen the CE experimental factors to select the most crucial ones. After having tested several conditions, the selected factors were the temperature, the pH, the SDS concentration, and the ACN proportion.

Temperature was considered as an essential factor because the method has to be robust in a large range of temperatures allowing its use in laboratories where the temperature of analysis might not be accurately controlled. It was thus important to evaluate its influence between 20°C and 35°C.

The effect of pH was evaluated between pH 5 and 10. At a higher pH, the MEKC system was found unstable and at a lower pH no compound was detected after 60 min. Actually, at a pH below 5, the EOF becomes so weak that the migration of the micelles is reversed [27]. The interaction between the micelles and the positively charged compounds could explain their very slow migration to the cathode. As can be seen in Fig. 2, pH 5–10 provided rather good separations. It was observed that the migration window increased with the pH.

SDS micelles are the most employed in MEKC but other types like CTAB-micelles can be used. CTAB was tested at a concentration of 2 mM at pH 3 in the negative polarity mode but the molecules were found to co-migrate. The effect of the SDS concentration was evaluated from 20 to 90 mM. The SDS critical micellar concentration is 8.2 mM in pure water at ambient temperature [28] and current instability was observed at concentrations higher than 90 mM.

Organic modifiers are often used in MEKC to expand the migration window and to improve selectivity and resolution [29, 30]. THF was tested and led to very low efficiencies. With MeOH, only a small number of compounds could be detected. Finally, different percentages of ACN (between 10% and 40%) were tested. At higher percentages, some peaks were not detected.

Finally, the chosen experimental domains for the selected factors were: 20–35°C for the temperature (*Temp*), 5–10 for the pH (*pH*), 20–90 mM for SDS concentration (*SDS*), and 10–40% for the ACN proportion (*ACN*).

### 3.1.2. Design of experiments

Four different sample solutions were used as described in Section 2.4.1 and Table 1.

A CCD was first defined with 26 experimental conditions, including the repetition at the centre. Five levels for each factor were investigated. The 26 conditions were performed in random order. At some experimental conditions using pH 5 and pH 5.8, no or few peaks could be observed regardless of the SDS concentration and the temperature. At these pH levels, the EOF is not high enough to allow the migration of the micelles toward the cathode. However, for some conditions at pH 5.8 using a high ACN proportion, peaks could be observed. An explanation could be that an addition of ACN increases the apparent pH value of the BGE and also the EOF. Another assumption is that ACN

decreases the compounds affinity for the micelles. Moreover, it has been told that the presence of a high percentage of organic modifiers causes the instability of the micelles [29]. The five conditions that gave no suitable result (i.e. no response for all studied analytes) were removed from the experimental design. Then, nine conditions were added at pH 10 to maintain the number of degrees of freedom sufficiently high for the modeling by the planned mathematic model. As shown in Table 2, five levels were still investigated except for the pH (four levels).

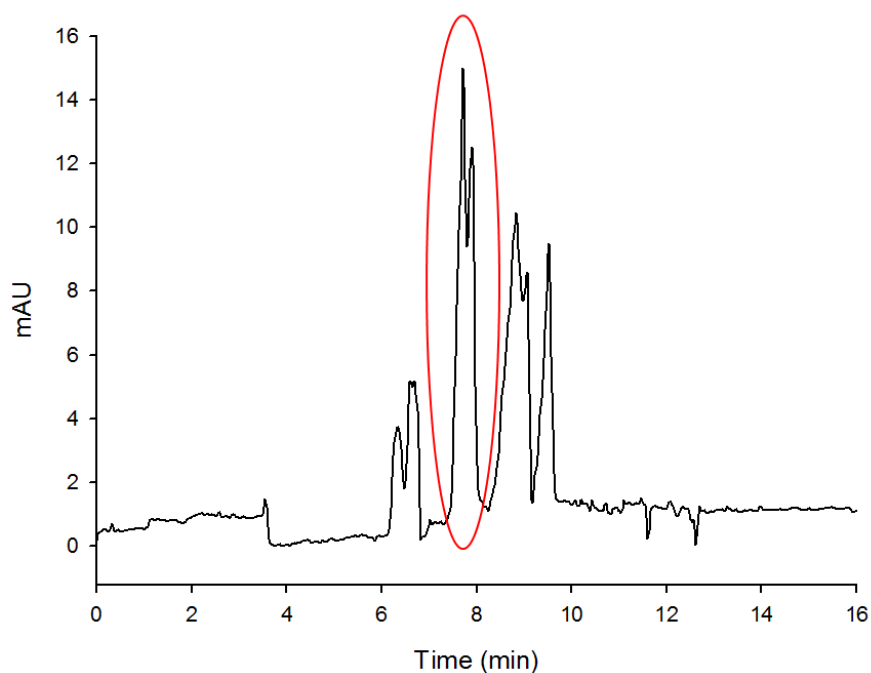
**Table 2.** Design of experiments

Temperature (°C)	pH	SDS (mM)	ACN (%)
20,0	7,50	55,0	25
0,0	10,00	20,0	10
20,0	10,00	20,0	40
20,0	10,00	90,0	10
20,0	10,00	90,0	40
22,4	5,81	31,4	35
22,4	5,81	78,6	35
22,4	9,19	31,4	15
22,4	9,19	31,4	35
22,4	9,18	78,6	15
22,4	9,19	78,6	35
27,5	7,50	20,0	25
27,5	7,50	55,0	10
27,5	7,50	55,0	25
27,5	7,50	55,0	25
27,5	7,50	55,0	40
27,5	7,50	90,0	25
27,5	10,00	55,0	25
27,5	10,00	55,0	25
32,6	5,81	31,4	35
32,6	5,81	78,6	35
32,6	9,19	31,4	15
32,6	9,19	31,4	35
32,6	9,19	78,6	15
32,6	9,19	78,6	35
35,0	7,50	55,0	25
35,0	10,00	20,0	10
35,0	10,00	20,0	40
35,0	10,00	90,0	10
35,0	10,00	90,0	40

### 3.1.3. Evaluation of experimental results

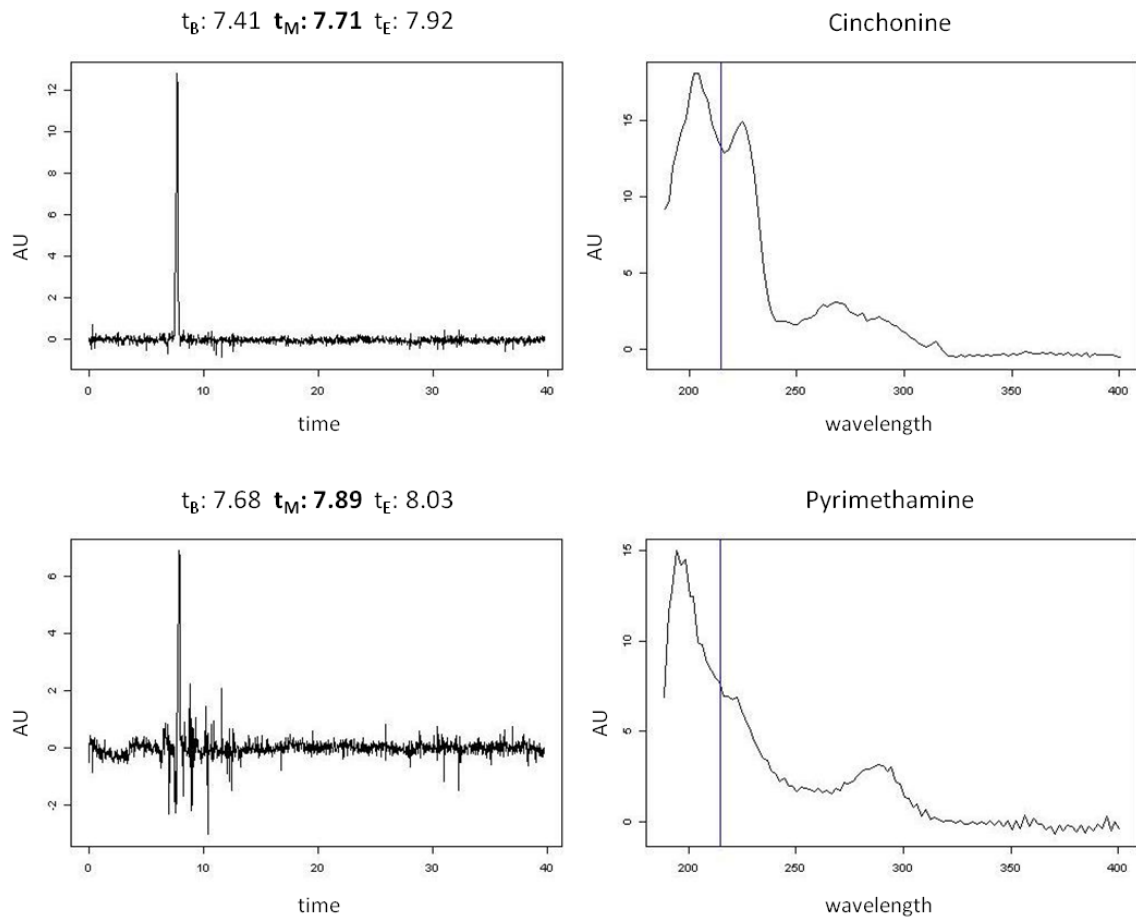
From each electropherogram and for each compound, three migration times were extracted: at the beginning, at the apex and at the end of the peak at the baseline height. Identification of peaks was made by comparing reference UV spectra from Clarke's database and the recorded electropherograms. Difficulties can arise to manually identify peaks, especially when peaks co-migrate because the observed spectra are mixtures of "pure" spectra. An automated detection methodology using Independent Component Analysis (ICA) was then used [31]. ICA is generally able to extract the independent components corresponding to the compounds from a DAD-electropherogram. It is thus helpful to separate peaks from noise and drift, and to numerically separate co-migrating peaks to obtain a more accurate estimation of the time at their beginning, apex, and end. When a peak is detected, the program associates the respective UV-spectrum estimated by ICA and makes the identification easier. An example of components estimation using ICA is shown in Fig. 3.

(a)



**Figure 3.** (a) Electropherogram of the group 3 at 35°C, pH 10, 90 mM SDS, and 40% ACN.

(b)



**Figure 3.** (b) Example of ICA estimating the two components encircled in (a) by a red line.

### 3.1.4. Mathematical modeling and prediction

Using a similar methodology as the one originally proposed by Lebrun et al. for HPLC application [31], a statistical model was chosen using a stepwise regression to select the coefficients that best explain the electrophoretic behavior of the components. Eq. (1) represents the basic equation used by stepwise algorithm.

$$Y = \beta_0 + \beta_1.Temp + \beta_2.Temp^2 + \beta_3.pH + \beta_4.pH^2 + \beta_5.pH^3 + \beta_6.SDS + \beta_7.SDS^2 + \beta_8.ACN + \beta_9.ACN^2 + \beta_{10}.Temp.pH + \beta_{11}.Temp.SDS + \beta_{12}.Temp.ACN + \beta_{13}.pH.SDS + \beta_{14}.pH.ACN + \beta_{15}.SDS.ACN + \beta_{16}.Temp.pH.SDS + \beta_{17}.Temp.pH.ACN + \beta_{18}.Temp.SDS.ACN + \beta_{19}.pH.SDS.ACN + \varepsilon, \quad (1)$$

$$Y = \beta x + \varepsilon$$

where  $\beta = (\beta_0 \dots \beta_{19})$  are the estimated parameters of the model,  $x$  is the design matrix and  $\varepsilon$  is the estimated error of the model. In this study, the considered responses ( $Y$ ) are computed from the migration times at the beginning ( $t_B$ ), the apex ( $t_M$ ) and the end ( $t_E$ ):

$$\begin{aligned} Y_M &= \log(t_M), \\ Y_{w1} &= \log(t_M - t_B), \\ Y_{w2} &= \log(t_E - t_M). \end{aligned} \tag{2}$$

$Y_{w1}$  and  $Y_{w2}$  are the logarithms of left and right half-widths of each peak, respectively. Logarithmic transformation was applied to ensure positivity of the responses.

Considering the predictive uncertainty associated to the set of multiple linear regressions, this allows making assessments about the confidence in every single new result at various operating conditions included within the experimental domain. When a model might be not easy to adjust to the data, it is obvious to account for the model uncertainty. Generally speaking, one should not rely on the models mean responses but uncertainty should be assessed and used with any model, even when the fit is good.

### 3.1.5. Quality attributes and error propagation

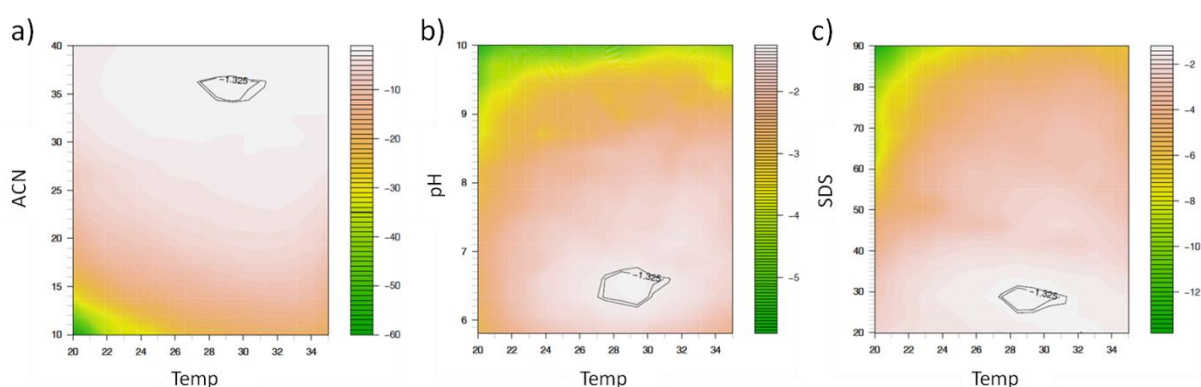
After the model fit, the migration times were predicted using Eq. (1) and the inverse of the set of transformations of Eq. (2). Next, assuming that the error for a new predicted response was distributed as a Student's t distribution [32], Monte-Carlo simulations were used to propagate this uncertainty of the predicted responses to the migration times and to any criteria computed from the migration times. A single critical quality criterion was selected to assess the quality of a separation. The separation criterion ( $S$ ) is defined as the difference between the beginning of the second peak and the end of the first peak of the critical pair ( $S_{crit} = t_{B,2} - t_{E,1}$ ). Basically, if  $S_{crit} \geq 0$ , the peaks of the critical pair are baseline-resolved.

Using the Monte-Carlo simulations, the distribution of  $S$  can be computed. With this complete distribution, one may choose to work on its quantile instead of its mean value, as generally proposed by statistical softwares. This would allow accounting for both the mean value of separation and the uncertainty around this mean estimates.

The 90% lower prediction interval computed on the separation was chosen as the criterion to optimize. Comparing the lower prediction interval to  $\lambda$ , a specification (say  $\lambda = 0$ ) allows to find where there are 90% guarantees that  $\lambda$  will be achieved. This is a more interesting result than the ones obtained using mean responses, where the guarantees about the mean estimates are only of 50%.

### 3.1.6. Method selectivity (final optimum conditions)

The lower predictive intervals of the separation were computed, on every part of the domain, using a grid search method. After the computations, the optimum was selected as the point of the grid giving the highest values. The optimal value of the lower interval of the separation was about  $-0.5$  min with the following MEKC conditions:  $Temp = 29^{\circ}C$ ,  $pH = 6.6$ ,  $SDS = 29$  mM, and  $ACN = 36\%$ . This means the method is not able to guarantee a baseline separation for all compounds with 90% guarantee, in the studied experimental domain. However, one may be confident that the provided “optimal” MEKC conditions should perform better than any others. A part of the experimental domain is presented on Fig. 4, showing a fine robustness of the method. Effectively, the white zone shows rather stable conditions regarding temperature, ACN percentage, pH, and SDS concentration.

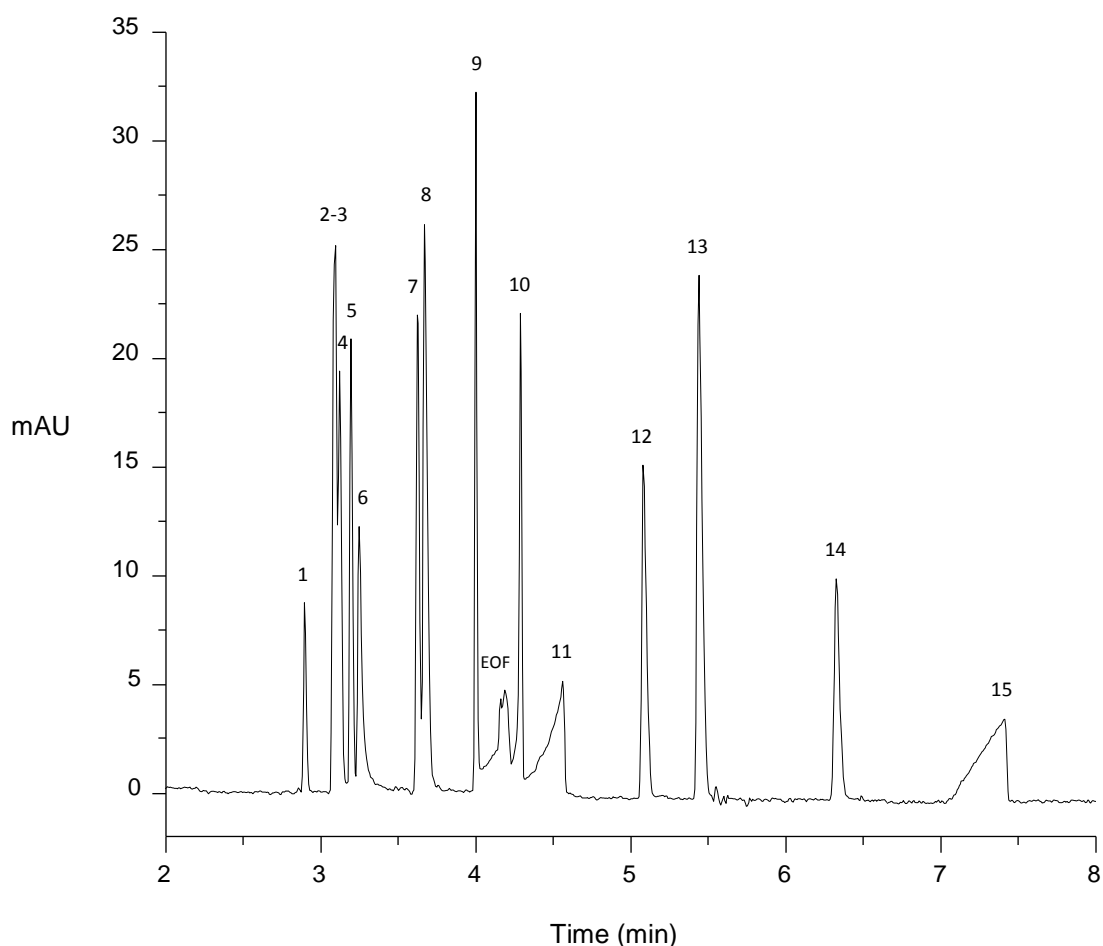


**Figure 4.** Surfaces of the lower predictive interval ( $\pi=90\%$ ) of the critical separation of the 15 compounds. (a) ACN (%) versus temperature ( $^{\circ}C$ ), (b) pH versus temperature ( $^{\circ}C$ ), (c) SDS (mM) versus temperature ( $^{\circ}C$ ). The DS are encircled by black lines. Optimal condition is  $Temp = 29^{\circ}C$ ,  $pH = 6.6$ ,  $SDS = 29$  mM, and  $ACN = 36\%$ .

These optimal conditions were experimentally verified and led to an acceptable separation of the 15 antimalarial drugs in a run time of 8 min (cf. Fig. 5). As can be seen in this figure, two compounds, artemether and artesunate, display triangular peak shape due to overloading effect. Indeed, as they do not absorb very much in UV, a high concentration was needed to detect them at 210 nm (5 mg/mL). The quantitation of these compounds does not seem to be impaired by this poor peak shape (cf. Section 3.2).

Two other compounds, pyrimethamine and piperazine, are close to the EOF. If the quantitation turns out to be difficult for this reason, adaptation of the sample composition is advice in order to reduce EOF peak (i.e. good results were obtained injecting pyrimethamine in ACN/ $H_3PO_4$  0.1% 80/20 (v/v) and piperazine in water).

Finally, three molecules, primaquine, cinchonine, and proguanil, co-migrate. Nevertheless, this method can be applied to quality control since pharmaceutical formulations generally contain one to three active compounds. To the best of our knowledge, primaquine, cinchonine, and/or proguanil are not associated in a same formulation and their identification can be performed by the examination of their UV spectra, which are sufficiently different.



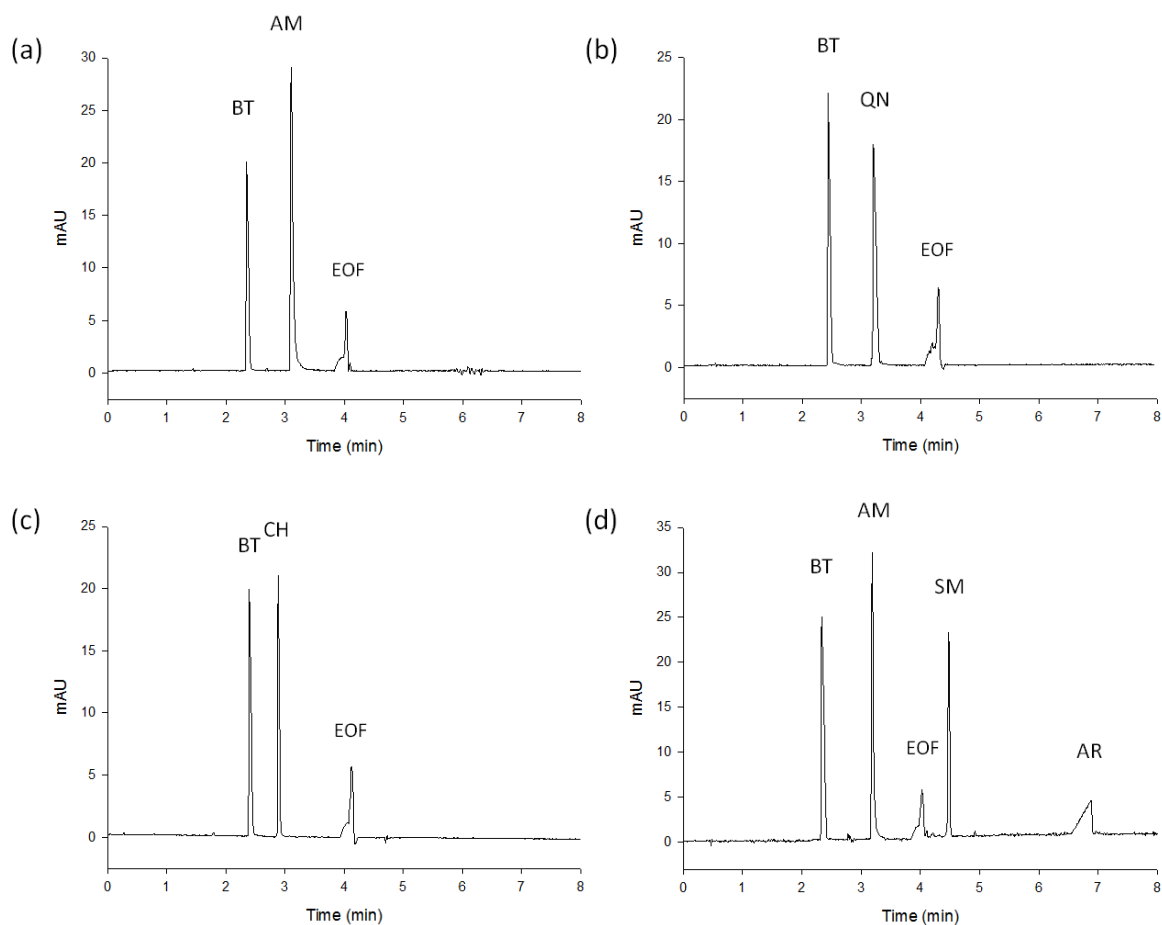
**Figure 5.** Experimental electropherogram of the 15 compounds at the optimal condition (Temp = 29°C, pH = 6.6, SDS = 29 mM and ACN = 36%). Peak identification: 1 = chloroquine, 2 = primaquine, 3 = cinchonine, 4 = proguanil, 5 = quinine, 6 = amodiaquine, 7 = mefloquine, 8 = pyrimethamine, 9 = halofantrine, 10 = piperazine, 11 = artemether, 12 = sulfalen, 13 = sulfadoxine, 14 = atovaquone, 15 = artesunate.



### 3.2. Analysis of antimalarial drugs

Four pharmaceutical formulations containing antimalarial drugs (Amodiaquine Suspension<sup>®</sup>, Quinine Sulfate Pharmaquick<sup>®</sup>, Chloroquine Phosphate<sup>®</sup>, and Sunat A Forte<sup>®</sup>) were collected on the African market. A qualitative and quantitative analysis was then performed according to the optimized method.

As shown in Fig. 6, the pharmaceutical formulations contain the expected antimalarial drugs.



**Figure 6.** Electropherograms of the four pharmaceutical formulations described in Table 3: (a) Amodiaquine Suspension<sup>®</sup>, (b) Quinine Sulfate Pharmaquick<sup>®</sup>, (c) Chloroquine Phosphate<sup>®</sup>, (d) Sunat A Forte<sup>®</sup>. AM, amodiaquine; BT, betahistine (IS); QN, quinine; CH, chloroquine; AR, artesunate; SM, sulfamerazine (IS).

For the quantitation of Quinine Sulfate Pharmaquick®, Chloroquine Phosphate®, and Sunat A Forte®, two standard solutions and three samples were independently prepared and injected in triplicate (cf. Section 2.3). The normalized peak area ratios (i.e. area divided by migration time) between the active compound and the IS were calculated, taking into account the theoretical and real weights, and the purity factor of the standards. The mean of the nine samples ratios was compared to the mean of the six standards ratios and the RSD was calculated from the nine samples ratios. The recovery values and the RSDs are given in Table 3.

For the quantitation of Amodiaquine Suspension®, the standard addition method was used to consider the matrix effect. Four solutions of growing concentrations were prepared 2 times independently and injected in triplicate (cf. Section 2.3). The line was plot by taking into account, for each injection, the IS, the migration times, the theoretical and real weights, and the purity factor of the standard. The equation was:  $y = 0.0092x + 1.2583$  and the  $R^2$  was: 0.9964. The value of recovery is given in Table 3.

**Table 3.** Recovery studies of antimalarial samples

Name of active compound	Type of formulation	Theoretical concentration	Recovery (%)	RSD (%) ( $n=9$ )
Amodiaquine Suspension® Amodiaquine	Syrup	10 mg/ml	91.18	/
Quinine Sulfate Pharmquick® Quinine (sulfate)	Tablets	300 mg	89.02	1.94
Chloroquine Phosphate® Chloroquine (phosphate)	Tablets	100 mg	97.56	1.79
Sunat A Forte® Amodiaquine	Tablets	612.4 mg	89.88	1.76
Artesunate		200 mg	89.55	3.51

Except for the chloroquine phosphate, the recovery values of the studied active compounds are in general around 90%. It confirms that a lot of pharmaceutical formulations are underdosed and this increases our desire to keep on the fight against counterfeiting by applying the present method to other medicines.

#### 4. Concluding Remarks

In the present study, a MEKC method was developed to simultaneously analyze 15 antimalarial drugs (artesunate, artemether, amodiaquine, chloroquine, piperazine, primaquine, quinine, cinchonine, mefloquine, halofantrine, sulfadoxine, sulfalen, atovaquone, proguanil, and pyrimethamine). Four parameters (pH, SDS concentration, ACN proportion, and temperature) were studied by means of a design of experiments and a CCD was applied. Mathematical modeling allowed the prediction of an optimal condition: pH 6.6, 29 mM SDS, 36% ACN, and 29°C. This condition was experimentally verified and led to the separation of 13 compounds in 8 min. This method was then successfully applied to the quality control of four antimalarial medicines from Africa. The next step of the study will consist in the application of the optimized MEKC method for the analysis of a large set of pharmaceutical formulations to fight against counterfeit medicines.

*The authors thank FNRS and the Léon Fredericq foundation for their financial supports.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

#### 5. References

- [1] Kaur, H., Goodman, C., Thompson, E., Thompson, K. A., Masanja, I., Kachur, S. P., Abdulla, S., PLoS One 2008, 3, e3403.
- [2] Amin, A. A., Kokwaro, G. O., J. Clin. Pharm. Ther. 2007, 32, 429–440.
- [3] Gaudin, K., Millet, P., Fawaz, F., Olliaro, P., White, N. J., Cassus-Coussère, C., Agbahoungha, U., Dubost, J.-P., J. Chromatogr. A 2010, 1217, 75–81.
- [4] Zhang, Q., Li, Y. F., Huang, C. Z., Talanta 2008, 76, 44–48.
- [5] Hodel, E. M., Zanolari, B., Mercier, T., Biollaz, J., Keiser, J., Olliaro, P., Genton, B., Decosterd, L. A., J. Chromatogr. B 2009, 877, 867–886.
- [6] Marini, R. D., Rozet, E., Montes, M. L. A., Rohrbasser, C., Roht, S., Rhème, D., Bonnabry, P., Schappler, J., Veuthey, J. L., Hubert, P., Rudaz, S., J. Pharmaceut. Biomed. 2010, 53, 1278–1287.
- [7] Green, M., Nettey, H., Rojas, O., Pamanivong, C., Khounsaknalath, L., Ortiz, M., Newton, P., Fernandez, F., Vongsack, L., Manolin, O., J. Pharmaceut. Biomed. 2007, 43, 105–110.
- [8] César, I. d. C., Nogueira, F. H. A., Pianetti, G. A., J. Pharmaceut. Biomed. 2008, 48, 223–226.
- [9] Ricci, C., Nyadong, L., Fernandez, F. M., Newton, P. N., Kazarian, S. G., Anal. Bioanal. Chem. 2006, 387, 551–559.
- [10] Ricci, C., Nyadong, L., Yang, F., Fernandez, F., Brown, C., Newton, P., Kazarian, S., Anal. Chimica Acta 2008, 623, 178–186.

- [11] Lai, C., Nair, N., Muniandy, A., Mansor, S., Olliaro, P., Navaratnam, V., *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 558–562.
- [12] Dua, V., Gupta, N., Sethi, P., Edwards, G., Dash, A., *J. Chromatogr. B* 2007, 860, 160–165.
- [13] Lindegardh, N., Tarning, J., Toi, P. V., Hien, T. T., Farrar, J., Singhasivanon, P., White, N. J., Ashton, M., Day, N. P. J., *J. Pharmaceut. Biomed.* 2009, 49, 768–773.
- [14] Annerberg, A., Singtoroj, T., Tipmanee, P., White, N., Day, N., Lindegardh, N., *J. Chromatogr. B* 2005, 822, 330–333.
- [15] Atemnkeng, M. A., De Cock, K., Plaizier-Vercammen, J., *Trop. Med. Intl. Health* 2006, 12, 68–74.
- [16] Onwujekwe, O., Kaur, H., Dike, N., Shu, E., Uzochukwu, B., Hanson, K., Okoye, V., Okonkwo, P., *Malaria J.* 2009, 8, 22.
- [17] Ioset, J. R., Kaur, H., *PLoS One* 2009, 4, e7270.
- [18] Bate, R., Coticelli, P., Tren, R., Attaran, A., *PLoS One* 2008, 3, e2132.
- [19] Debrus, B., Lebrun, P., Kindenge, J. M., Lecomte, F., Ceccato, A., Caliaro, G., Mbay, J. M. T., Boulanger, B., Marini, R. D., Rozet, E., Hubert, P., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5205–5215.
- [20] Zhang, L., Wang, R., Zhang, Y., Yu, Y., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1357–1363.
- [21] Elbashir, A. A., Suliman, F. E. O., Saad, B., Aboul-Enein, H. Y., *Biomed. Chromatogr.* 2009, 24, 393–398.
- [22] Lammerhofer, M., Zarbl, E., Franco, P., Petracs, M., Lindner, W., *Electrophoresis* 2001, 22, 3297–3307.
- [23] Taga, A., Du, Y. X., Suzuki, S., Honda, S., *J. Pharmaceut. Biomed.* 2003, 30, 1587–1593.
- [24] Tsimachidis, D., Česla, P., Hájek, T., Theodoridis, G., Jandera, P., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1130–1136.
- [25] Taylor, R. B., Reid, R. G., *J. Pharmaceut. Biomed.* 1993, 11, 1289–1294.
- [26] Amin, N. C., Blanchin, M. D., Ake, M., Fabre, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 58, 168–171.
- [27] Terabe, S., *Trac-Trend Anal. Chem.* 1989, 8, 129–134.
- [28] Otsuka, K., Terabe, S., *Encyclopedia of Chromatography*, Taylor & Francis, Florida, 2005.
- [29] Vindevogel, J., Sandra, P., *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Hüthig, Heidelberg 1992.
- [30] Silva, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 174–192.
- [31] Kutter, J. P., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1997, 69, 5165–5171.
- [32] Debrus, B., Lebrun, P., Ceccato, A., Caliaro, G., Govaerts, B., Olsen, B. A., Rozet, E., Boulanger, B., Hubert, P., *Talanta* 2009, 79, 77–85.



## Section 3

Séparation de biopharmaceutiques  
structurellement très proches



Après l'analyse de petites molécules médicamenteuses, la CE a été appliquée à l'analyse de molécules biopharmaceutiques.

Dans cette dernière partie, les spécialités à base d'insuline ont été choisies car elles sont également une cible privilégiée des contrefacteurs. Ce sont des médicaments de plus en plus utilisés et dont la production coûte cher. Des méthodes analytiques ont donc été développées dans le but de contrôler la qualité de ces formulations pharmaceutiques.

D'abord, notre priorité a été l'analyse simultanée de l'insuline humaine et de ses 5 analogues synthétiques commercialisés : lispro, aspart, glulisine, glargine et détémir. Ceux-ci sont utilisés, en fonction du besoin du patient, pour obtenir une durée d'action plus courte ou plus longue par rapport à l'insuline humaine. La substitution de l'une de ces molécules par une autre pouvant être néfaste pour la santé, il est important de pouvoir les distinguer.

Ensuite, nous avons jugé utile de pouvoir séparer les insulines humaine, bovine et porcine. En effet, les insulines animales, jadis isolées des pancréas de bœuf ou de porc, ne sont plus autorisées pour l'usage humain car, en plus de provoquer des réactions allergiques, elles n'ont pas le même pouvoir thérapeutique que l'insuline humaine.

Enfin, certaines formulations à base d'insuline contiennent un excipient appelé protamine, qui est en réalité un mélange de peptides. Il est utilisé pour augmenter la durée d'action de l'insuline. Par conséquent, l'identification de ces peptides est nécessaire pour garantir l'activité thérapeutique.

La principale difficulté rencontrée lors des trois études a été l'étroite ressemblance des molécules à séparer. Généralement, les protéines et peptides étudiés présentent des différences minimales, de quelques acides aminés seulement. Encore une fois, la MEKC s'est avérée très utile.





# 1. Insuline humaine et ses 5 analogues synthétiques

1<sup>er</sup> article



Spectra Analyse 2014, 298, 47-50

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES SÉPARATIVES  
POUR DÉTECTER LA CONTREFAÇON DE MOLÉCULES  
BIOSYNTHÉTIQUES COMME L'INSULINE ET LES GHRP

Caroline Lamalle, Emeline Baptiste, Roland Djang'Eing'A Marini,  
Jacques Crommen, Philippe Hubert, Anne-Catherine Servais, Marianne Fillet



## Résumé

La contrefaçon est un problème largement répandu dans le monde. Les médicaments, comme l'insuline ou les GHRP, nécessitent un contrôle strict de leur qualité. Des méthodes par électrophorèse capillaire et chromatographie liquide ont été développées pour analyser ces peptides. L'insuline humaine et ses différents analogues (lispro, aspart, glulisine, glargine et détémir) ont pu être séparés par MEKC en 15 minutes. Les GHRP-2 et -6 ont pu être séparés par HPLC en 15 minutes également. Des échantillons de GHRP-6 ont ensuite été analysés et plusieurs non-conformités ont été repérées. Ces résultats sont encourageants pour lutter contre la contrefaçon de tels médicaments.



## 1. Introduction

Un médicament contrefait est un médicament dont l'identité et/ou l'origine est/sont délibérément et frauduleusement falsifiée(s) (OMS, Genève, 1999). Cela peut reposer sur l'absence de principe actif, la présence d'un principe actif incorrect ou en mauvaise quantité, la présence d'impuretés ou de contaminants, une copie illégale du médicament original (par ex. un faux packaging).

Cette problématique concerne toutes les classes de médicaments, particulièrement ceux contre la dysfonction érectile, les analgésiques, les antirétroviraux contre le VIH, les hypolipémiants ou médicaments contre l'obésité, les antidiabétiques, les antipaludiques,... [1]. La falsification de médicaments est responsable d'augmentation de souches pharmaco résistantes, d'échec thérapeutique, d'aggravation de la maladie et parfois de mort. Selon l'OMS, près de 100 000 décès par an seraient liés à la contrefaçon de médicaments [2].

Malgré cela, la prévalence de ce phénomène augmente car, pour beaucoup, les produits vendus dans les pharmacies agréées sont d'un coût inabordable, ce qui conduit les patients à rechercher des médicaments moins chers. De plus, les points de vente non régulés (pharmacies en ligne, zone rurale dans les pays en développement) ne requièrent généralement pas de prescription. Pour les producteurs de médicaments contrefaits, c'est un commerce qui rapporte beaucoup et, malheureusement, les sanctions ne sont pas assez lourdes pour être dissuasives [2].

Les médicaments ciblés par la contrefaçon présentent généralement les caractéristiques suivantes : ils sont largement utilisés, soumis à prescription et souvent assez chers. C'est le cas des hormones et notamment de l'insuline et des Growth Hormone Releasing Peptides (GHRP). Il est donc primordial de contrôler la qualité de ces médicaments.

Dans cet article, des méthodes séparatives ont été développées pour identifier et quantifier rapidement ces deux classes de peptides. La technique d'électrophorèse capillaire (CE) et plus précisément la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) a été choisie pour l'insuline et ses analogues tandis que la technique de chromatographie liquide (HPLC) a été sélectionnée pour les GHRP.

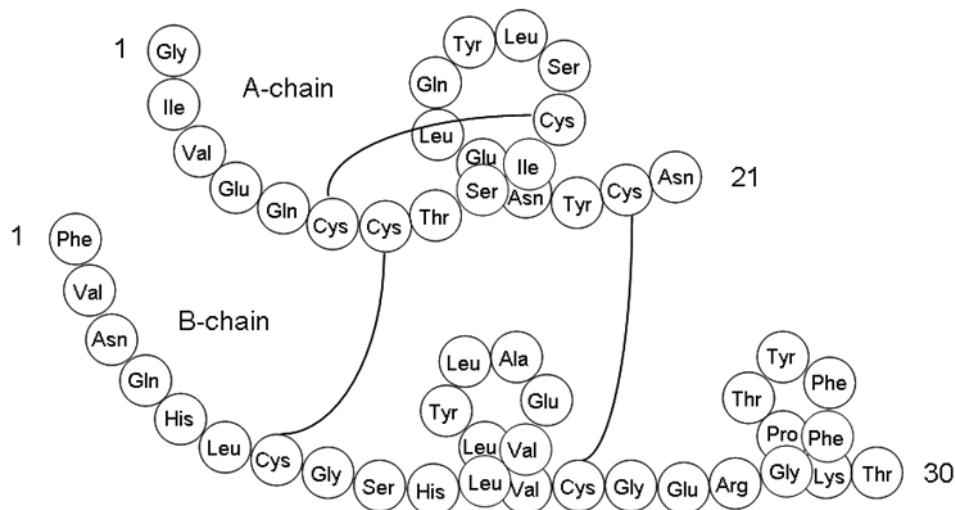
## 2. Analyse de l'insuline et de ses analogues

### 2.1. Contexte

L'insuline est une hormone impliquée dans le maintien de la concentration sanguine en glucose. Elle est couramment utilisée en injection sous-cutanée pour le traitement du diabète insulino-dépendant.



L'insuline humaine est constituée de 2 chaînes peptidiques (voir Figure 1). Différents analogues de cette hormone existent sur le marché belge : insuline *lispro*, *aspart*, *glulisine*, *glargine* et *détémir*. Ils ont été synthétisés pour augmenter ou diminuer la durée d'action et ils ne diffèrent entre eux que de 2 ou 3 acides aminés. Les excipients présents dans ces médicaments sont principalement le phénol et le méta-crésol, des agents conservateurs. La protamine est également présente dans certaines spécialités pour augmenter la durée d'action [3].



**Figure 1.** Structure de l'insuline humaine

## 2.2. Développement d'une méthode CE

### 2.2.1. Instrumentation

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'un appareil d'électrophorèse capillaire modèle HP<sup>3D</sup>CE et en utilisant le logiciel Chemstation (Hewlett-Packard, Waldbronn, Allemagne). Les capillaires utilisés (48,5 cm de longueur totale, 40 cm entre le point d'injection et de détection et 50 µm de diamètre interne) étaient en silice fondue non modifiée. Une pression de 50 mbar pendant 5 secondes a été appliquée pour les injections. Pendant l'analyse, le voltage appliqué était de 20 kV et la température maintenue à 20°C. La détection UV a été réalisée à 200 nm.

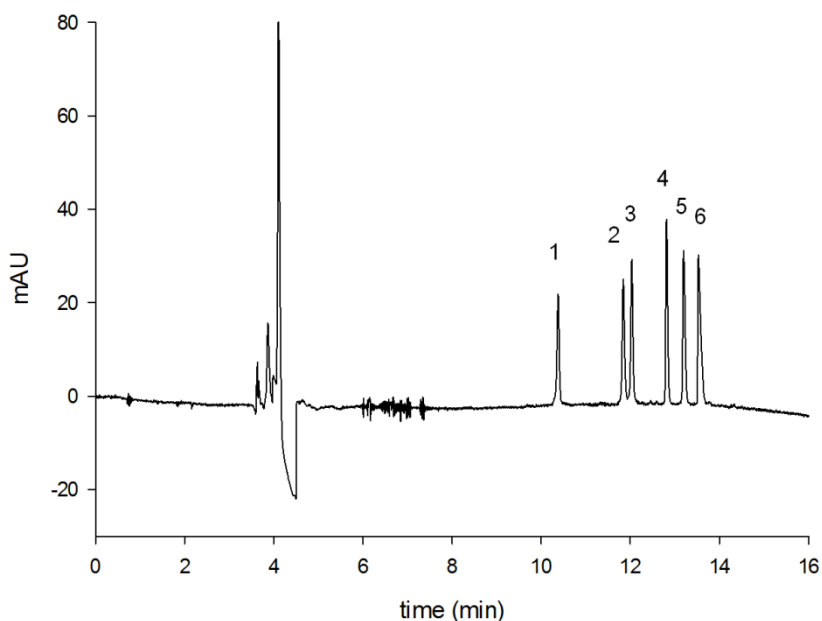
### 2.2.2. Préparation de l'échantillon

Le développement de la méthode s'est effectué avec des spécialités pharmaceutiques contenant l'insuline ou l'un de ses analogues. Les échantillons ont été préparés en diluant ces spécialités dans une solution d'HCl 10 mM (pour permettre la solubilisation de tous les analogues et excipients),

jusqu'à atteindre une concentration d'environ 50 µg/ml. Les spécialités sont dosées à 100 UI/ml, ce qui correspond pour la plupart à 3,5 mg/ml. Des solutions individuelles ainsi qu'une solution contenant l'insuline et ses analogues ont été préparées.

### 2.2.3. Sélection du tampon de séparation

Le tampon de séparation sélectionné est constitué d'une solution d'acétate d'ammonium 50 mM à pH 9. Avec ce tampon, l'insuline et ses analogues n'étaient pas séparés. L'ajout de différentes cyclodextrines (CD) ( $\beta$ -,  $\gamma$ -, carboxyméthyl- $\beta$ -, sulfobutyléther- $\beta$ -, triméthyl- $\beta$ -, diacétylsulfo- $\beta$ -CD, ...) n'a pas permis d'obtenir une bonne séparation. La chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) a donc été envisagée dans un deuxième temps. Différentes concentrations de perfluorooctanoate d'ammonium (PFOA) ont été testées, en présence ou non d'acétonitrile (ACN). La meilleure séparation a été obtenue avec 50 mM de PFOA et 5% d'ACN (voir Figure 2). En effet, l'insuline et ses 5 analogues ont pu être séparés en 15 minutes. L'analyse des solutions individuelles a ensuite permis d'identifier tous les pics. Aucune interférence n'a été observée entre les insulines et les excipients puisque le phénol et le méta-crésol migrent avec l'écoulement électro-osmotique.



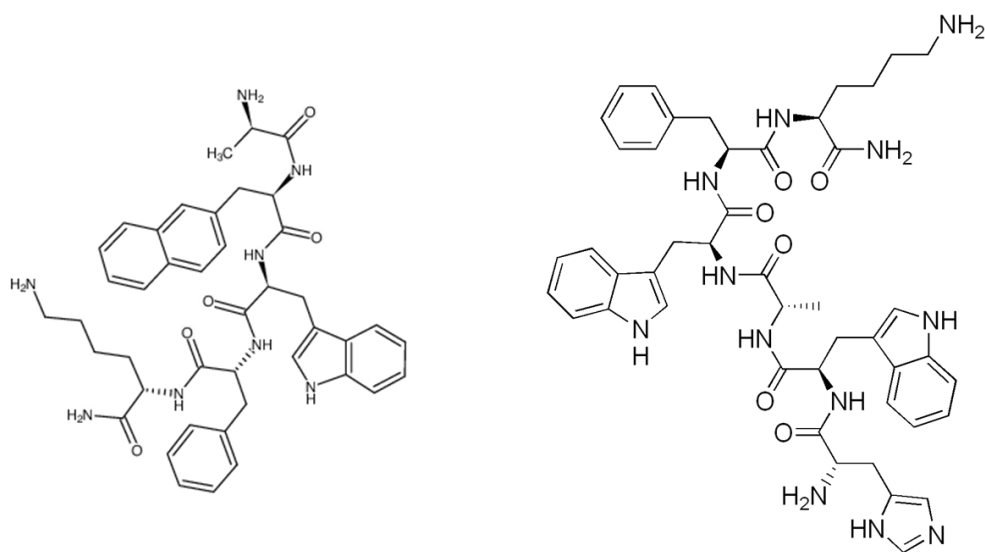
**Figure 2.** Électrophérogramme de six spécialités à base d'insuline.

Conditions : voir section 2.2. Pics: 1 = insuline aspart, 2 = insuline humaine, 3 = insuline lispro, 4 = insuline glulisine, 5 = insuline glargine, 6 = insuline détémir.

### 3. Analyse des GHRP-2 et -6

#### 3.1. Contexte

Les GHRP ou “*Growth Hormone Releasing Peptides*” sont des petits peptides qui ont, à l’origine, été synthétisés pour permettre la libération d’hormone de croissance [4]. Ils sont cependant peu sélectifs et ont beaucoup d’autres effets, comme celui de réguler la satiété et la dépense d’énergie [5]. Ils sont souvent achetés sur Internet par des personnes désirant augmenter leur masse musculaire bien que les études ne révèlent essentiellement qu’une diminution de la masse graisseuse [6]. Les GHRP-2 et -6, des hexapeptides (voir Figure 3), sont les plus utilisés à cette fin.



**Figure 3.** Structures des GHRP-2 et -6.

(GHRP-2 = D-Ala-D-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> ; GHRP-6 = His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>)

#### 3.2. Développement d’une méthode HPLC

##### 3.2.1 Instrumentation

Les expériences ont été réalisées sur un système HPLC série 1200 (Agilent Technologies) en utilisant le logiciel *Chemstation* (Hewlett-Packard). Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 nm. Le mode gradient a été choisi en faisant varier la proportion de ces phases mobiles : A = H<sub>2</sub>O/acide formique (FA) (100 : 0,1 v/v) et B = ACN/H<sub>2</sub>O/FA (90 : 10 : 0,1 v/v/v). Le choix des autres paramètres chromatographiques est expliqué au point III 2.3.

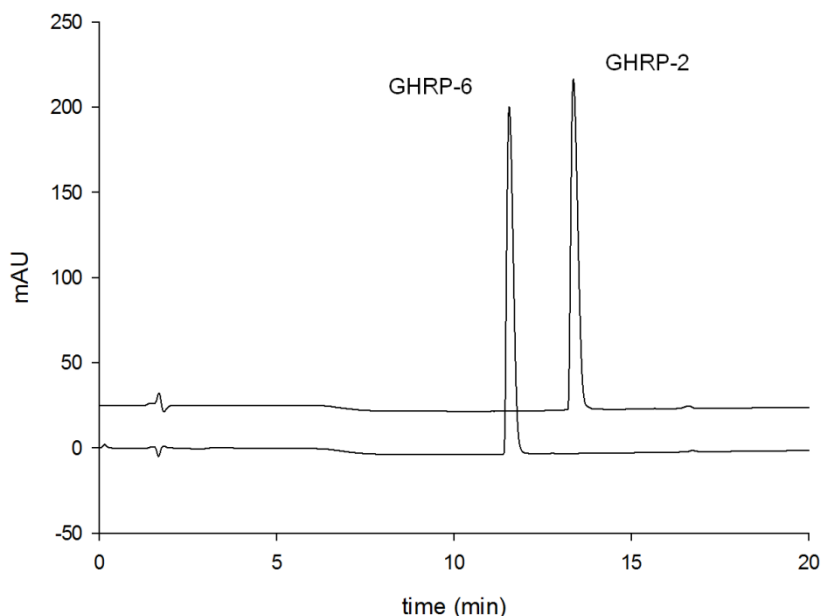
### 3.2.2 Préparation de l'échantillon

Les substances de référence de GHRP-2 et -6, ainsi que quatre échantillons suspects à analyser (nommés pour des raisons de confidentialité « échantillons 1, 2, 3 et 4 ») ont été solubilisés dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O/FA (20 : 80 : 0,1 v/v/v), à une concentration de 50 µg/ml. Ces solutions ont été analysées séparément.

### 3.2.3 Sélection des paramètres chromatographiques

Trois colonnes ont été testées : LichroCART C18 (250 mm x 4 mm ; 5 µm ; 100 Å), CC NUCLEOSIL C18 AB (125 mm x 4 mm ; 5 µm ; 100 Å) et ZORBAX 300 SB C18 (100 mm x 2,1 mm ; 3,5 µm ; 300 Å). Un débit de 1 ml/min a été fixé pour les deux premières colonnes, mais un débit plus faible (200 µl/min) a été choisi pour la dernière. Les analyses ont été effectuées avec un volume d'injection de 10 ou 40 µl. Deux gradients de phase mobile ont été testés : le pourcentage de phase mobile B allant de 0 à 60 en 15 minutes ou de 0 à 75 en 15 minutes.

Le meilleur résultat en termes d'efficacité a été obtenu avec la colonne ZORBAX (plus adaptée à l'analyse de peptides), un volume d'injection de 40 µl et un gradient de 0 à 75% de phase mobile B. Comme on peut le voir sur la figure 4, les deux GHRP ont des temps de rétention différents, ils peuvent donc être facilement identifiés.

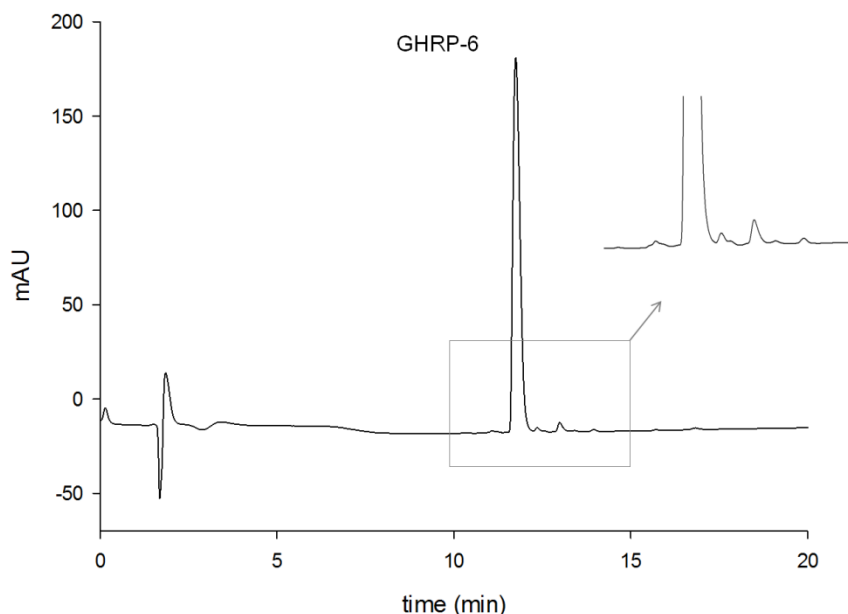


**Figure 4.** Chromatogrammes des GHRP-2 et -6.

Conditions: voir section 3.2.

### 3.2.4 Dosage de formes pharmaceutiques

L'échantillon 1 a été analysé selon la méthode développée ci-dessus (voir Figure 5) et il s'avère qu'il s'agit bien de GHRP-6, dosé à 93%. Il est intéressant de constater la présence d'un certain nombre de pics de faible intensité à côté du pic d'intérêt, provenant certainement d'une dégradation du GHRP-6. Il pourrait être utile d'identifier ces produits de dégradation par spectrométrie de masse en tandem.



**Figure 5.** Chromatogramme de l'échantillon 1 de GHRP-6.

Conditions : voir section 3.2.

En ce qui concerne les résultats du dosage des échantillons 2, 3 et 4, ils se sont avérés catastrophiques, c'est-à-dire une absence de principe actif (échantillon 2) ou un surdosage (échantillons 3 et 4 dosés à 240 et 513%, respectivement).

## 4. Conclusion et perspectives

Une méthode par MEKC a été développée pour contrôler des spécialités pharmaceutiques contenant de l'insuline humaine ou l'un de ses analogues. Cet article montre qu'une identification est facilement réalisable puisque toutes les insulines ont pu être séparées. De plus, l'analyse n'est pas longue (15 min) et les excipients n'interfèrent pas. Une validation de cette méthode pourrait être envisagée afin de pouvoir quantifier les différents types d'insuline au sein des spécialités.

Une deuxième méthode a été développée par HPLC en mode gradient pour analyser les GHRP-2 et -6. Les pics obtenus sont efficaces et séparés en 15 minutes. Des échantillons suspects ont pu être analysés et il en ressort pour la majorité des résultats très insatisfaisants. Des produits de dégradation peuvent également être détectés grâce à la même méthode.

## 5. Bibliographie

- [1] WHO, Medicines: spurious/false-labelled/falsified/counterfeit (SFFC) medicines, 2012.
- [2] SAMBIRA, J., Médicaments contrefaits : un problème de santé en Afrique, Afrique Renouveau, 2013, p 5-7.
- [3] MADSBAD, S., Insulin and New Insulin Analogues with Focus on Type 2 Diabetes, In Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments, 2007; p 53-65.
- [4] CAMANNI, F., et al., Growth hormone-releasing peptides and their analogs, Front Neuroendocrinol, 1998, 19, p 47-72.
- [5] GAILLARD, R. C., Sécrétines peptidiques de l'hormone de croissance : activités endo-crinienne et non endocrinienne, Revue Médicale Suisse, 2001, 59, p 382-386.
- [6] DESVIGNE, N., L'hormone de croissance : un dopant?, Science & Sports, 2005, 20, p 65-73.



# 1. Insuline humaine et ses 5 analogues synthétiques

2<sup>ème</sup> article





Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2015, 111, 344–350

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF INSULIN AND ITS ANALOGUES  
IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS  
BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Caroline Lamalle, Anne-Catherine Servais, Régis P. Radermecker,  
Jacques Crommen, Marianne Fillet



## Abstract

A simple and efficient MEKC method was developed to simultaneously determine human insulin, its five analogues, the main degradation products and the excipients usually present in injection formulations. A very fast method with a total analysis time of 3 min was then successfully validated for the analysis of human insulin and the quality control of commercial formulations was carried out.

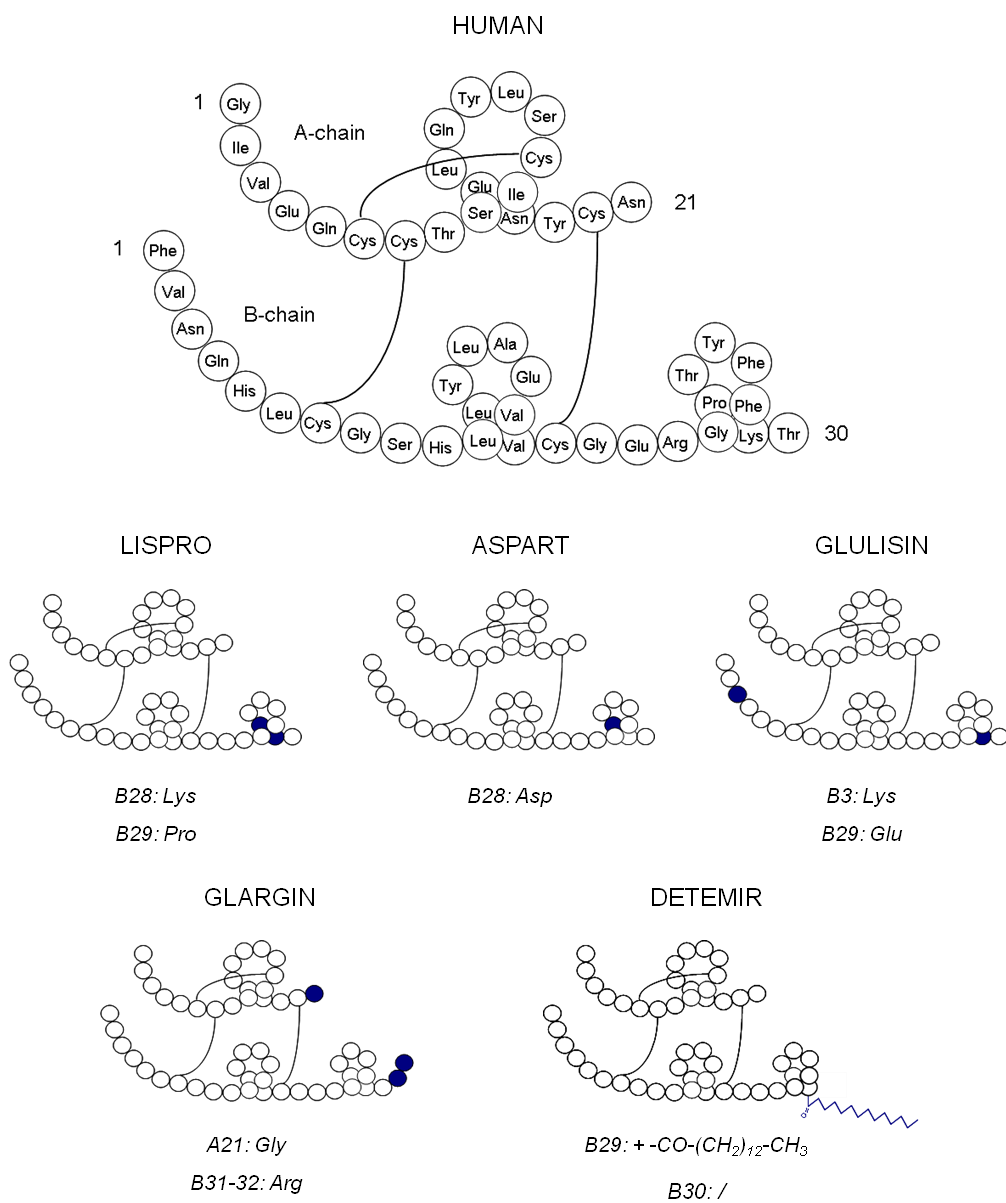


## 1. Introduction

Insulin is an important hormone secreted by pancreatic  $\beta$ -cells regulating principally glucose metabolism. Currently synthesized by recombinant DNA technology, this hormone is commonly administered by subcutaneous injection for the treatment of insulin-dependent diabetes mellitus. Human insulin consists of two peptide chains – A and B – containing 21 and 30 amino acid residues, respectively, and connected via two disulphide bridges (Fig. 1). As can be seen in this figure, the different insulin variants are quite similar since they differ only by one to three amino acids. Lispro, aspart and glulisin are rapid-acting analogues that mimic postprandial insulin secretion. Glargin and detemir are long-acting analogues that mimic basal insulin secretion. Protamine is sometimes associated with human insulin, lispro or aspart to provide an intermediate action profile [1]. The excipients of pharmaceutical injections are mainly meta-cresol and phenol.

Diabetes is one of the most common metabolic diseases in the world and the prevalence is increasing every year, especially for type 2 diabetes. A lot of insulin formulations are then produced; they are expensive and require a prescription. Therefore they are an important target for counterfeiting. Even if the proportion of counterfeit drugs is superior in developing countries, it is worth noting that it is affecting the whole world and more particularly thee-commerce in more economically developed countries. Counterfeited insulins contribute to therapeutic failures and in some cases can also lead to death. Therefore, it is essential for public health to strengthen the control of pharmaceutical products such as insulin formulations by developing efficient and easily applicable quality control methods.

The determination of insulin has been already described in the literature but most papers report immunochemical methods for the monitoring of biological samples [2–11]. Some instrumental analytical methods based on LC or CE were also developed for the analysis of pharmaceutical formulations but only for human insulin quantification in formulations without protamine [12–15]. Recently, CE and MEKC were applied to the separation of various insulin analogues [16–18]. Indeed, CE is an attractive technique with its well-known advantages such as simplicity, high separation efficiency, short analysis time and low sample and solvent consumption. It is considered as a powerful alternative to HPLC and is frequently used for the separation of large biomolecules [19,20]. The aim of this work was to develop an easy and fast MEKC method for the simultaneous determination of human insulin, its five analogues and the excipients usually present in commercial formulations. A stability study was also performed and degradation products could be separated with the same method. The method was shortened, adjusted and was then fully validated for human insulin analysis. It was also applied to the quality control of pharmaceutical formulations, including those containing protamine.



**Fig. 1.** Structure of human insulin and its analogues.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Acetic acid, ammonia, HCl (37%), ACN, SDS and ZnCl<sub>2</sub> were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Protamine, sodium benzoate, glycerol, phenol and meta-cresol were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).  $\gamma$ -CyD was from Sigma-Aldrich. OS- $\gamma$ -CyD was kindly provided by Professor G. Vigh (Texas A&M University, TX, USA). CM- $\beta$ -CyD, TM- $\beta$ -CyD and HDMS- $\beta$ -CyD were purchased from Cyclolab (Budapest, Hungary). SBE- $\beta$ -CyD was from CyDex Pharmaceuticals (Lenexa, KS, USA) and HDAS- $\beta$ -CyD was obtained from Antek Instruments (Houston, TX, USA). Human insulin standard was obtained from Sigma-Aldrich. Different pharmaceutical formulations were also used: Humuline NPH<sup>®</sup> (human insulin) and Humalog<sup>®</sup> (insulin lispro) were obtained from Eli-Lilly (Indianapolis, IN, USA). Novomix 30<sup>®</sup> (insulin aspart) and Levemir<sup>®</sup> (insulin detemir) were purchased from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). Insuman Rapid<sup>®</sup> (human insulin), Apidra<sup>®</sup> (insulin glulisin) and Lantus<sup>®</sup> (insulin glargin) were obtained from Sanofi Aventis (Bridgewater, NJ, USA). Actrapid<sup>®</sup> and Mixtard<sup>®</sup> (human insulins) were collected on the internet. Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA) and Chromafil<sup>®</sup> syringe filters (0.20  $\mu$ m) were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

### 2.2. Buffer and BGE

The buffer was prepared by adding a solution of 50 mM acetic acid to a solution of 50 mM ammonia in order to reach pH 9.0. In the final conditions, the BGE was made by dissolving 20 mM SDS in the buffer. Then, it was mixed with ACN (13% v/v) and the solution was filtered through a syringe filter. To prepare BGE with other reagents mentioned in the study, the steps were similar as mentioned above.

### 2.3. Sample preparation

#### 2.3.1. BGE optimization and stability study

Pharmaceutical formulations containing 100 IU/ml of insulin were used for method development. This corresponds to 3.50 mg/ml for human, lispro, aspart and glulisin insulins, 3.64 mg/ml for glargin insulin and 14.20 mg/ml for detemir insulin. Human, lispro, aspart, glulisin and glargin formulations were diluted 80 fold in 0.01 M HCl to obtain a concentration of approximately 50  $\mu$ g/ml (43.75 or 45.50  $\mu$ g/ml). Unless otherwise mentioned, detemir formulation was diluted 160 fold in the same solvent (88.75  $\mu$ g/ml). The mixture of the 6 insulin variants was also prepared as described above.



Sodium benzoate was selected as IS and was prepared in 0.01 M HCl. All analysis were performed in duplicate.

### 2.3.2. Validation

Calibration and validation standards of human insulin were prepared in 0.01 M HCl, with 100 µg/ml IS and 10% ACN. Calibration standards were prepared without excipients while the excipients (phenol, meta-cresol, glycerol, ZnCl<sub>2</sub> and protamine) were added in the validation standards. Three quantification levels were investigated (80, 100 and 120%), the target level of 100% corresponding to 4 IU/ml ( $m = 3$ ). Four replicates were prepared at each level and three independent series were carried out ( $k = 3$ ;  $n = 4$ ). Calibration standards were used to set up the calibration model for the method while trueness, precision, accuracy and linearity were estimated using the validation standards.

### 2.3.3. Quality control

Standard solutions were prepared exactly like calibration standards. Four sample solutions were prepared by dissolution of the pharmaceutical formulation in 0.01 M HCl to obtain a concentration of 4 IU/ml, taking into account the addition of IS and ACN ( $n = 4$ ). Formulations containing human insulin (Actrapid®, Insuman Rapid®) and human insulin with protamine (Mixtard®, Humuline NPH®) contain 100 IU/ml.

## 2.4. Instrumentation

All the experiments were carried out on a HP<sup>3D</sup>CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, an on-column DAD and a temperature control system (15–60°C ± 0.1°C). Chemstation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) was used for instrument control, data acquisition and data analysis. Fused silica capillaries were provided by ThermoSeparation Products (San Jose, CA, USA).

### 2.4.1. BGE optimization and stability study

Electrophoretic separations were carried out in uncoated fused silica capillaries with 50 µm i.d. and 48.5 cm total length (40 cm effective length). At the beginning of each working day, the capillary was washed with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH and water for 10 min each. Before each injection, the capillary was successively washed with with 1 M NaOH for 2 min, water for 1 min and was then equilibrated

with the BGE for 4 min. After each run, the capillary was washed with 0.01 M HCl for 5 min and water for 1 min. Capillary wash cycles were performed at a pressure of approximately 1 bar. Injections were made by applying a pressure of 50 mbar for a period of 5 s. During the run, the applied voltage was 20 kV and the capillary was thermostated at 20°C. Electropherograms were recorded at 200 nm.

#### 2.4.2. Validation and quality control

To reduce analysis time, the injection was made at the short capillary end (8.5 cm effective length). Moreover, the outlet electrode was immersed in 0.01 M HCl after each injection. Validation data were processed using the e.noval® 3.0 software (Arlenda, Liege, Belgium).

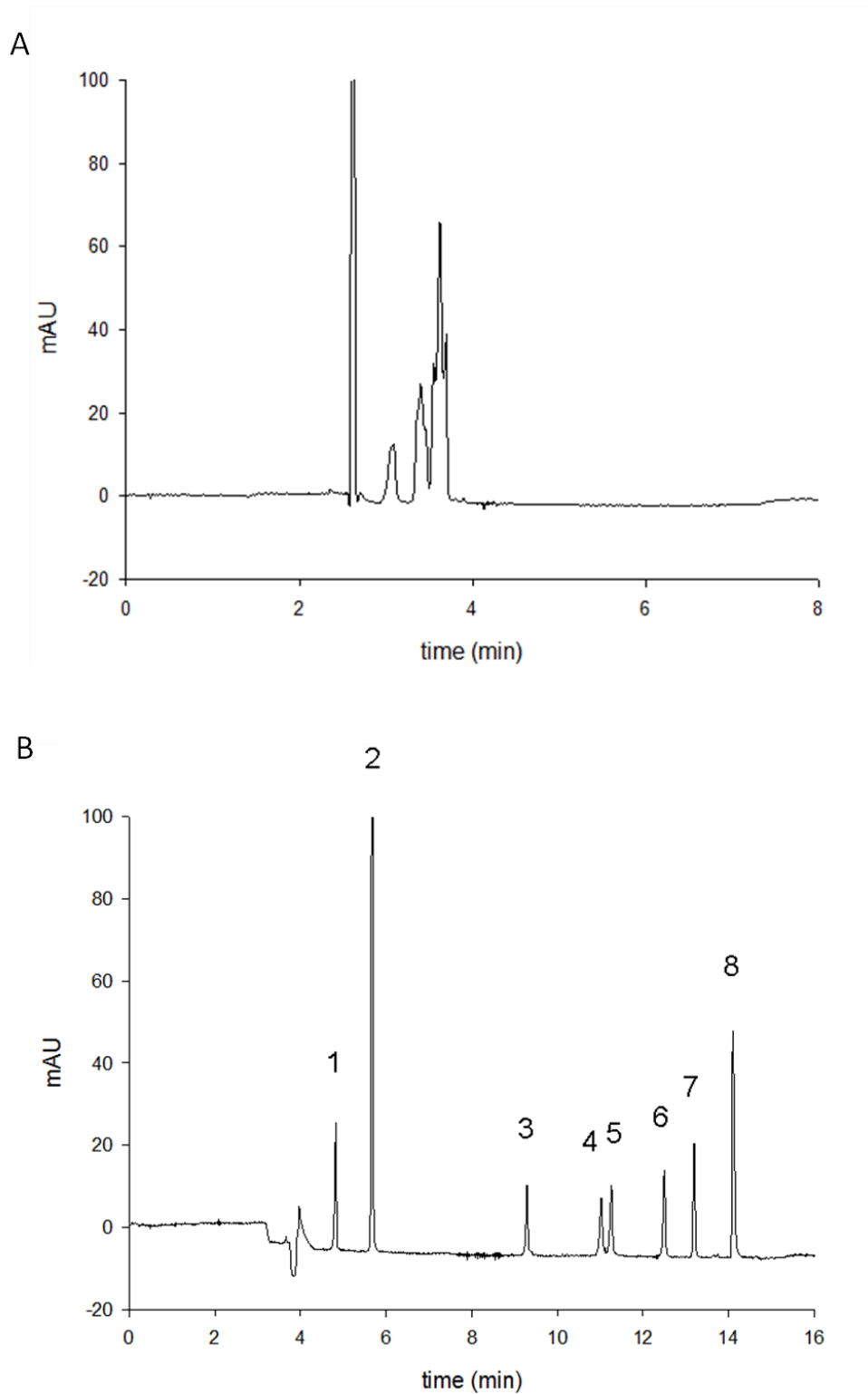
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preliminary studies

A basic buffer composed of 50 mM ammonium acetate (pH 9.0) was selected because it induced an important and stable EOF and it provided better peak shape than acidic buffers. As some formulations contained protamine, the sample dissolution medium was also optimised. Indeed, protamine is a basic and aliphatic protein which forms with insulin and zinc a complex insoluble at neutral pH. An acidic pH was then required to solubilise protamine, but also glargin. A solution made of 0.01 M HCl was finally chosen as dissolution and dilutionsolvent.

#### 3.2. BGE optimization for the separation of human insulin and its analogues

Fig. 2A shows the electropherogram of the mixture containing six pharmaceutical formulations (human insulin and its five analogues) under the conditions mentioned in the preliminary studies. As can be seen in this figure, all the analogues were not separated. As their molecular weights (~5800 Da) and pIs (~5.5) are quite similar, they have almost identical electrophoretic mobilities and their separation by conventional CE is not easy. Therefore, some additives were used to improve the separation.



**Fig. 2.** Electropherogram of the six insulin formulations. (A) BGE: 50 mM ammonium acetate pH 9.0.

(B) BGE: 50 mM ammonium acetate pH 9.0 + 50 mM SDS + 15%ACN.

Other conditions are described in Section 2.3.1. Peaks: 1 = phenol, 2 = m-cresol,

3 = aspart, 4 = human, 5 = lispro, 6 = glulisin, 7 = glargin, 8 = detemir.

First, different CyD were chosen to investigate their selectivity towards insulins according to their size and their different sub-stituents:  $\gamma$ -CyD, OS- $\gamma$ -CyD, CM- $\beta$ -CyD, TM- $\beta$ -CyD, HDMS- $\beta$ -CyD, SBE- $\beta$ -CyD and HDAS- $\beta$ -CyD. The CyD concentrations tested (15 and 30 mM) are in agreement with those commonly used in our laboratory. The migration profile was modified by some of them but this was not sufficient to obtain a complete resolution (data not shown).

MEKC was then investigated. SDS is the most commonly used surfactant and was tested at different concentrations (35 and 50 mM) in the presence – or not – of an organic modifier (0–20% ACN).

The addition of 50 mM SDS led to the separation of the two major excipients, phenol and meta-cresol, but not of all insulins. The same observation was made with 10% ACN v/v added to the SDS system. Good results were obtained with 15% ACN since the six insulins were completely separated within 15 min (see Fig. 2B). It is worth noting that a multivariate approach could not be applied in this study because of too extreme responses (with on/off effects) when a factor was modified.

These results are in accordance with previous reports which indicated that small peptides could be successfully separated by MEKC [21–24] and that the addition of organic solvent was required to separate closely related peptides with more than 20 amino acid residues [25,26]. Indeed, proteins strongly interact with surfactants and tend to form complexes. The organic solvent added to the micellar solution can prevent this interaction.

The optimized condition led to the following insulins migration order: aspart, human, lispro, glulisin, glargin and detemir. Indeed, with its C14 fatty acid chain, detemir is the most hydrophobic analogue and thus interacts more strongly with the surfactant. For the other compounds, a MEKC system with an organic modifier makes the interpretation very complex as a lot of parameters are involved in the migration behaviour [27]. Indeed the interactions depend on the log P and the charge of the analyte (possible ion-pair formation). However, the presence of ACN in the BGE reduces the interactions with the micelles and the migration behaviour can be significantly modified from one analyte to the others [27]. Attention can be paid to the resolution obtained between human and lispro insulins which differ only by the inversion of two amino acids (Fig. 1). This suggests that the secondary structure of the protein could also play an essential role in the interaction with the surfactant, probably because of different expositions of hydrophobic sites. The separation of human and lispro insulins was also achieved thanks to the high peak efficiency ( $N \approx 150\,000$ ).

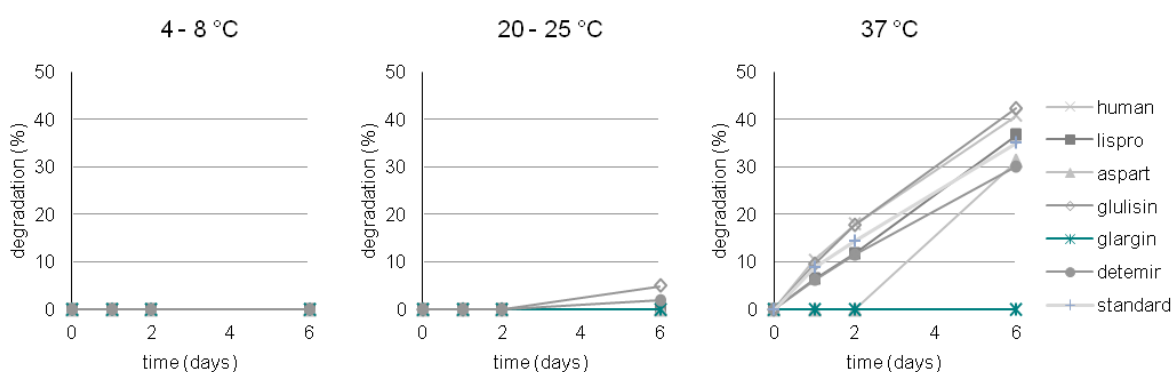
### 3.3. Stability study

A stability study was carried out on the pharmaceutical formulations stored in a refrigerator (4–8°C), at room temperature (20–25°C) and at 37 ± 1°C during 3, 7, 14, 21 and 28 days. The percentage of degradation was estimated by calculating the peak area ratio between the possible degradation product and the sum of the insulin and the possible degradation product. No degradation was detected after 28 days irrespective of the temperature (data not shown).

The insulin stability was also investigated in formulations diluted in 0.01 M HCl and stored 24 h, 48 h and 6 days at the three previously mentioned temperatures (see Fig. 3). No degradation was observed for the samples kept in refrigerator. A small degradation was detected for glulisin and detemir stored at room temperature but only after 6 days. For the samples stored at 37°C, degradation was already observed after 24 h for all insulins except aspart and glargin. This suggests that an acidic pH and a rather high temperature promote degradation. Degradation increased after 48 h for the same insulins and increased again after 6 days for all insulins except glargin. This exception can be explained by the fact that the main degradation of insulin originates from deamidation at residue A-21 [28]. At this position, glargin has the amino acid Gly instead of Asn (Fig. 1). Therefore, A-21 deamidation could not occur for glargin insulin. Fig. 4 demonstrates the selectivity of the method for impurity detection.

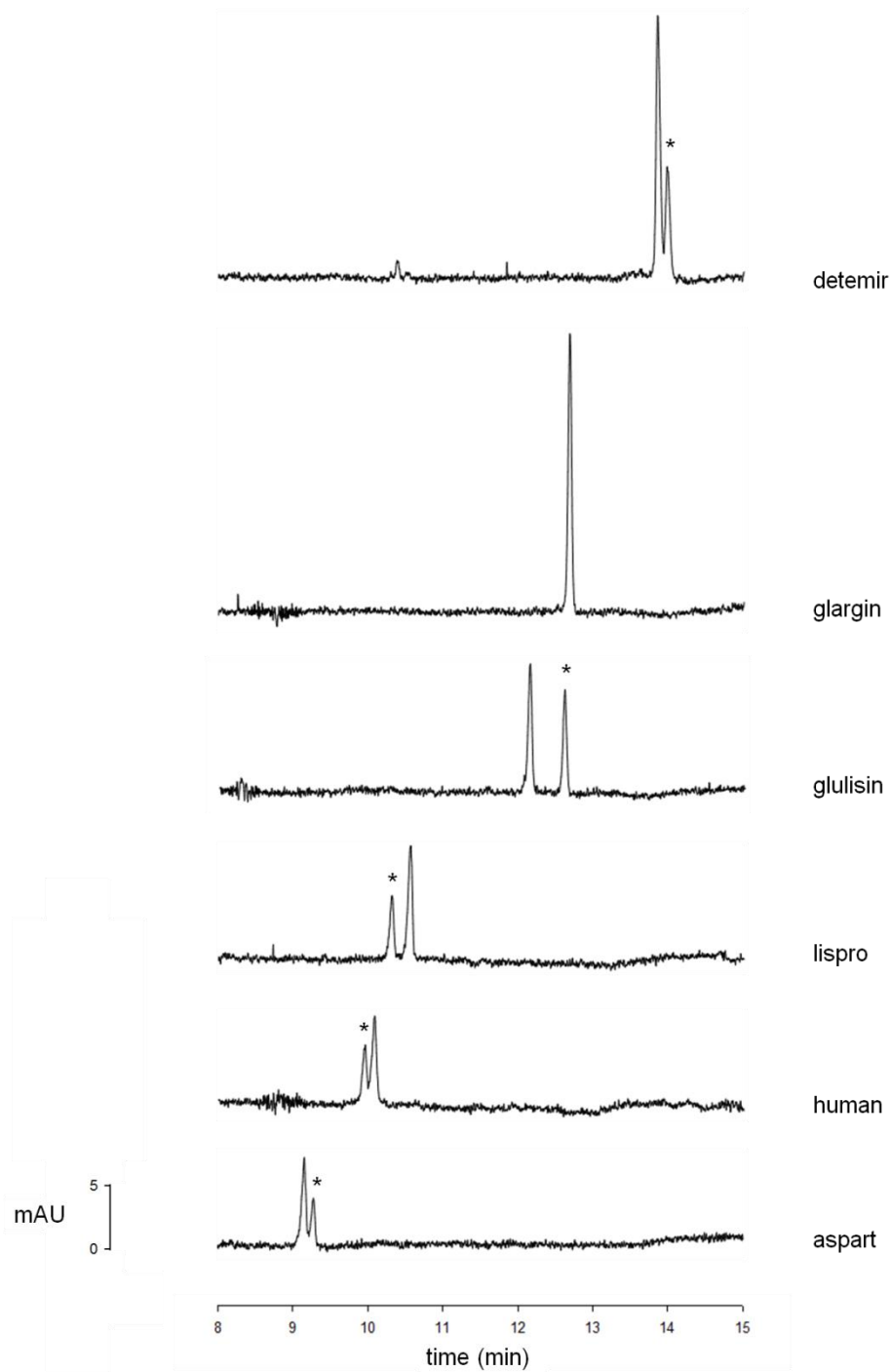
The stability of human insulin standard was also studied after dilution in 0.01 M HCl and storage for 24 h, 48 h and 6 days at the three previously mentioned temperatures. Despite the absence of preservatives, the degradation profile of human insulin standard looked quite similar compared to that of the formulation (see Fig. 3).

In summary, samples seem to remain stable after 24 or 48 h if stored at a maximal temperature of 25°C.



**Fig. 3.** Stability studies showing the percentage of degradation as a function of time.

Pharmaceutical formulations diluted in 0.01 M HCl.



**Fig. 4.** Effect of 6 days storage in HCl 0.01 M and at 37°C on the six insulin formulations.

BGE: 50 mM ammonium acetate pH 9.0 + 50 mM SDS + 15% ACN.

Other conditions are described in Section 2.3.1. Peaks: \* = degradation product.

### 3.4. Method validation for routine quality control of formulations containing human insulin

To demonstrate the applicability of our approach for routine analysis, a method validation was carried out for the quantification of human insulin.

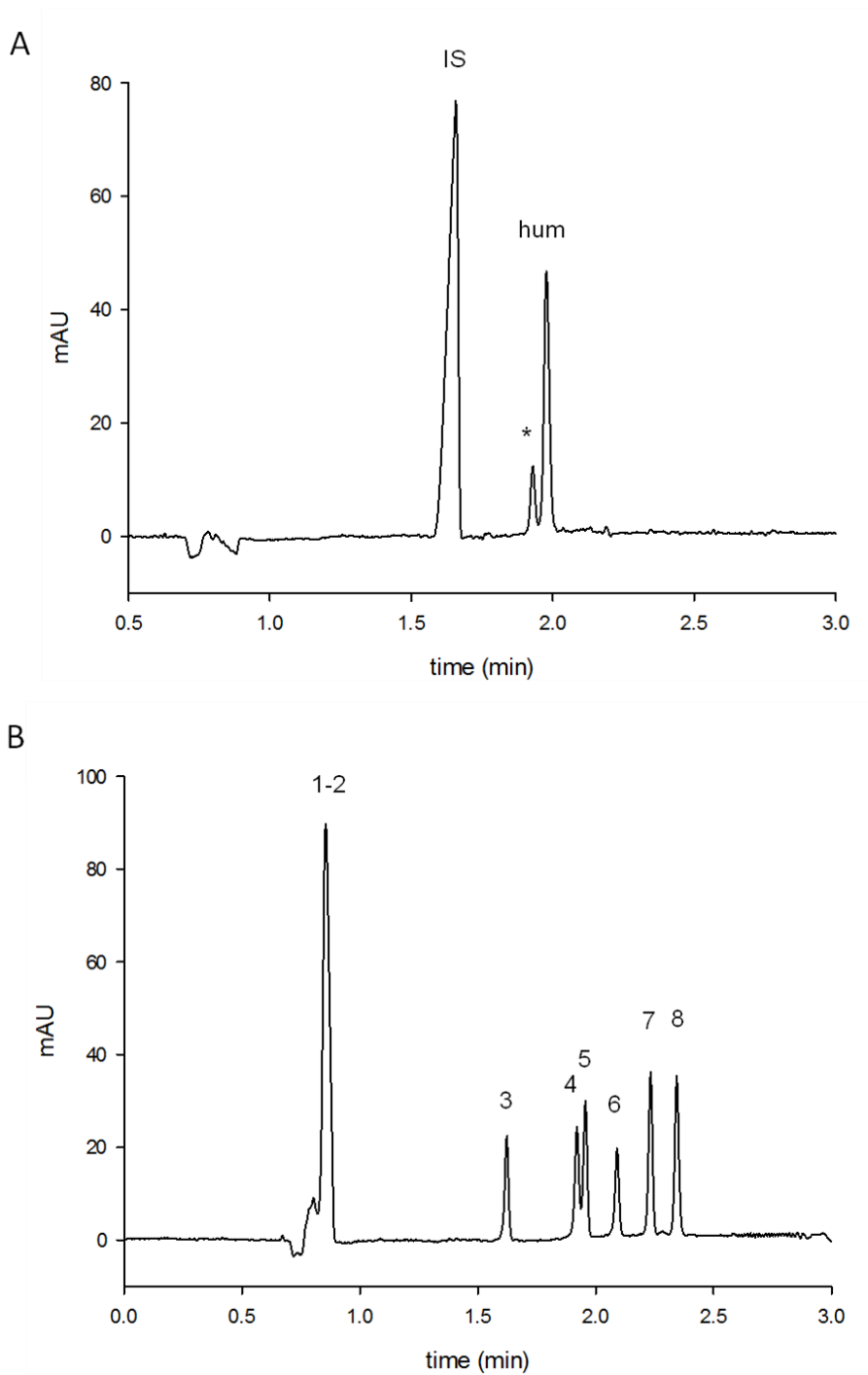
Before the validation and to reduce analysis time for routine quality control, the previously developed method was shortened. The injection was made at the short capillary end leading to a 5-fold reduction of the analysis time. Small adjustments of the BGE composition (20 mM SDS and 13% ACN) were provided in order to obtain satisfactory selectivity with the degradation product (cf. Fig. 5A). 10% ACN was also added to the samples to guarantee the stability of insulin and prevent its adsorption.

It is worth noting that in those conditions, the separation of the 6 insulins within 3 min was also very good except that between human insulin and lispro (Fig. 5B). It was considered sufficient to perform identification, however, the initial method could be easily applied to confirm the identification if in doubt. Selectivity of the analytical method was assessed by analyzing reconstituted blank solution (containing the excipients included protamine but without insulin). No endogenous source of interference was observed at the migration time of human insulin.

In order to quantify one of these insulins, sodium benzoate was chosen as IS. The normalized peak area ratios (i.e. areas divided by migration times) between the active compound and the IS were calculated.

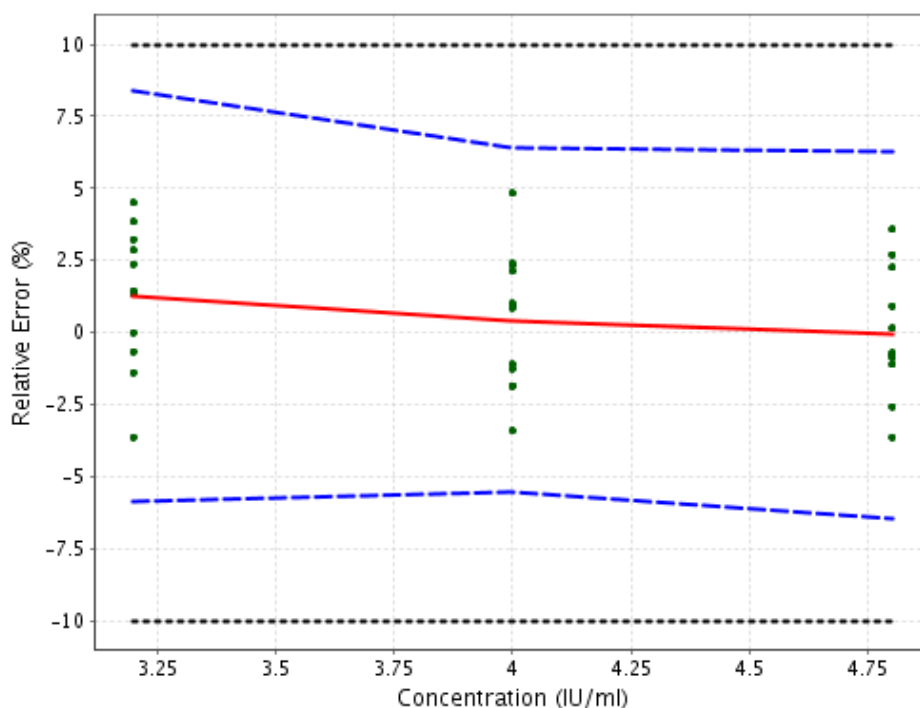
#### 3.4.1. Selection of the calibration model

The acceptance limits were set at  $\pm 10\%$  (cf. requirement of the European Pharmacopea for Human Insulin preparations) and the maximum risk ( $1-\beta$ ) to obtain results outside these acceptance limits was set at 5%. Different regression models were fitted to the calibration standards and linear regression was chosen as the most appropriate response function (Fig. 6).



**Fig. 5.** (A) Electropherogram of human insulin with its degradation product (2 days storage in HCl 0.01 M and at 37°C). Peaks: IS = sodium benzoate (IS), \* = degradation product, hum = human insulin. (B) Electropherogram of the six insulin formulations obtained after analysis at the short capillary end. BGE: 50 mM ammonium acetate pH 9.0 + 20 mM SDS + 13% ACN. Peaks: 1 = phenol, 2 = m-cresol, 3 = aspart, 4 = human, 5 = lispro, 6 = glulisin, 7 = glargin, 8 = detemir. Other conditions are described in Section 2.3.1.





**Fig. 6.** Accuracy profile of human insulin obtained by considering linear regression (range: 3.2–4.8 IU/ml). Plain line: relative bias, dashed lines:  $\beta$ -expectation tolerance limits, dotted curves: acceptance limits and dots: relative back-calculated concentrations.

### 3.4.2. Other validation criteria

Table 1 presents the validation results of human insulin. Trueness of the method was excellent as the upper relative bias of the method was 1.272%. The RSD values for repeatability and intermediate precision were satisfactory (below 3%), demonstrating a good precision. The method was accurate since the lower and upper tolerance limits did not exceed the acceptance limits of 10% over the considered concentration range. For all series, a regression line was fitted to the back-calculated concentrations of the validation standards as a function of the introduced concentrations. The results attesting the method linearity, namely the regression equation corresponding to that relationship with the coefficient of determination, are presented in Table 1. The LOD was estimated at 0.43 IU/ml using the intercept of the calibration model and the residual variance of the regression. In this case, the LOQ was the lowest concentration level, 3.2 IU/ml.

**Table 1.**Validation results of human insulin ( $k = 3$ ;  $m = 3$ ;  $n = 4$ ).

	Day 1	Day 2	Day 3
<b>Response function</b>			
Slope	0.1643	0.1594	0.1559
Intercept	-0.04498	-0.01421	-0.005656
$r^2$	0.9795	0.9739	0.9883
	Level 1	Level 2	Level 3
<b>Trueness</b>			
Relative bias (%)	1.272	0.4236	-0.06906
<b>Precision</b>			
Repeatability (RSD, %)	1.838	2.140	1.665
Intermediate precision (RSD, %)	2.534	2.426	2.275
<b>Accuracy</b>			
$\beta$ -expectation tolerance limits (%)	-5.877/8.421	-5.542/6.389	-6.445/6.307
<b>Linearity</b>			
Range (IU/ml)	3.2-4.8		
Slope	0.9725		
Intercept	0.1282		
$r^2$	0.9814		
LOD (IU/ml)	0.43		
LOQ (IU/ml)	3.2		

$k$ : number of days of experiments (series),  $m$ : number of concentration levels,  $n$ : number of replicates per concentration level and per series.

### 3.5. Quality control of human insulin formulations

A qualitative and quantitative analysis of four different pharmaceutical formulations (Actrapid®, Mixtard®, Humuline NPH® and Insuman Rapid®) was carried out according to the validated method. Four standard solutions at each level (80, 100 and 120%) and four samples of each formulation at 4 IU/ml were independently prepared. To make the conversion from IU to mg and therefore to know which weight of the standard is needed, the assay in IU/mg and the loss on drying of this standard must be taken into account.

The regression equation was used to calculate the concentration of the samples and then the percentage of the claimed content. The mean of the percentages and the RSDs are given in Table 2. All the tested formulations were inside the limits of 90–110%.

**Table 2.**

Analytical results for the quantification of human insulin in pharmaceutical formulations.

Pharmaceutical formulations	Concentration found (IU/ml)	Percentage of the claimed content (%)	Repeatability (RSD, %)
Actrapid®	3.90	97.3	1.34
Mixtard®	4.16	103.9	1.05
Humuline NPH®	4.29	107.2	0.91
Insuman Rapid®	4.02	100.5	3.84

#### 4. Concluding remarks

In the present study, MEKC was used to simultaneously analyse human insulin and its five analogues (lispro, aspart, glulisin, glargin and detemir). A method was developed using the following BGE: 50 mM ammonium acetate pH 9.0, 50 mM SDS and 15% ACN. The six insulins and the two major excipients of pharmaceutical formulations could be separated within 15 min. This method also exhibited selectivity regarding their principal degradation products, so that the samples stability could be studied as a function of time and temperature of the storage.

A fast method with an analysis time of 3 min was obtained by injecting at the short capillary end and by using the following BGE: 50 mM ammonium acetate pH 9.0, 20 mM SDS and 13% ACN. This method was fully validated for human insulin over the concentration range of 3.2 and 4.8 IU/ml, with acceptance limits of 10% and a risk of 5%. Then, the quality control of formulations containing human insulin, including those with protamine, was successfully achieved. These investigations demonstrate the interesting ability of capillary electrophoresis for quantification of intact biomolecules.

*Many thanks are due to the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium) and the Fonds Léon Fredericq (Liege, Belgium) for their financial support.*

#### 5. References

- [1] S. Madsbad, Insulin and new insulin analogues with focus on type 2 diabetes, in: C.E. Mogensen (Ed.), *Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments*, Springer, US, 2007, pp. 53–65.
- [2] W. Tong, E.S. Yeung, Determination of insulin in single pancreatic cells by capillary electrophoresis and laser-induced native fluorescence, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 685 (1996) 35–40.

- [3] I. German, R.T. Kennedy, Rapid simultaneous determination of glucagon and insulin by capillary electrophoresis immunoassays, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 742 (2000) 353–362.
- [4] V. Solinova, V. Kasicka, D. Koval, T. Barth, A. Ciencialova, L. Zakova, Analysis of synthetic derivatives of peptide hormones by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet-absorption and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 808 (2004) 75–82.
- [5] I. Le Potier, G. Franck, C. Smadja, S. Varlet, M. Taverna, In-capillary derivatization approach applied to the analysis of insulin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 271–276.
- [6] S. Descroix, I. Le Potier, C. Niquet, N. Minc, J.L. Viovy, M. Taverna, In-capillary non-covalent labeling of insulin and one gastrointestinal peptide for their analyses by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 203–209.
- [7] M. Thevis, A. Thomas, P. Delahaut, A. Bosseloir, W. Schanzer, Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for doping control purposes, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3579–3585.
- [8] C. Guillo, M.G. Roper, Two-color electrophoretic immunoassay for simultaneous measurement of insulin and glucagon content in islets of Langerhans, *Electrophoresis* 29 (2008) 410–416.
- [9] J.F. Dishinger, K.R. Reid, R.T. Kennedy, Quantitative monitoring of insulin secretion from single islets of Langerhans in parallel on a microfluidic chip, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3119–3127.
- [10] C. Guillo, T.M. Truong, M.G. Roper, Simultaneous capillary electrophoresis competitive immunoassay for insulin, glucagon, and islet amyloid polypeptide secretion from mouse islets of Langerhans, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4059–4064.
- [11] C. Hess, A. Thomas, M. Thevis, B. Stratmann, W. Quester, D. Tschöepe, B. Madea, F. Musshoff, Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1813–1822.
- [12] A. Kunkel, S. Günter, C. Dette, H. Wätzig, Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Method comparison and validation, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 445–455.
- [13] P. Moslemi, A.R. Najafabadi, H. Tajerzadeh, A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 45–51.

- [14] B. Deng, Z. Liu, G. Luo, H. Ma, M. Duan, Rapid quantitative determination and assessment of insulin in oil formulation by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 73–80.
- [15] A. Staub, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Schappler, Multiple injection technique for the determination and quantitation of insulin formulations by capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8041–8047.
- [16] K. Ortner, W. Buchberger, M. Himmelsbach, Capillary electrokinetic chromatography of insulin and related synthetic analogues, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2953–2957.
- [17] M. Haunschmidt, K. Ortner, K. Hainz, E. Bradt, L. Sternbauer, W. Buchberger, C.W. Klampfl, Investigations on the migration behavior of insulin and related synthetic analogues in CZE, MEKC and MEEKC employing different surfactants, *Electrophoresis* 31 (2010) 1560–1564.
- [18] H.H. Yeh, H.L. Wu, C.Y. Lu, S.H. Chen, Simultaneous determination of regular insulin and insulin aspart by capillary zone electrophoresis and application in drug formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 145–150.
- [19] N.F. Visser, M. van Harmelen, H. Lingeman, H. Irth, On-line SPE-CE for the determination of insulin derivatives in biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 451–462.
- [20] A. Staub, D. Guillarme, J. Schappler, J.L. Veuthey, S. Rudaz, Intact protein analysis in the biopharmaceutical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 810–822.
- [21] H.J. Liu, R.E. Strong, I.S. Krull, S.A. Cohen, Homogeneous preparation of fluorescent-derivatized insulin and its application to competitive chromatographic immunoassays, *Anal. Biochem.* 298 (2001) 103–111.
- [22] H. Nishi, S. Terabe, Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 3–27.
- [23] B. Stanley, K.A. Mehr, T. Kellock, J.D. Van Hamme, K.K. Donkor, Separation and determination of closely related lantibiotics by micellar electrokinetic chromatography, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2993–3000.
- [24] Y. Wu, J. Xie, F. Wang, Z. Chen, Separation of small molecular peptides with same amino acid composition but different sequences by capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 437–440.
- [25] T. Yashima, A. Tsuchiya, O. Morita, S. Terabe, Separation of closely related large peptides by micellar electrokinetic chromatography with organic modifiers, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2981–2984.
- [26] C. Arcelloni, L. Falqui, S. Martinenghi, A.E. Pontiroli, R. Paroni, Capillary electrophoresis for simultaneous quantification of human proinsulin, insulin and intermediate forms, *Electrophoresis* 19 (1998) 1475–1477.

[27] C. Lamalle, A.C. Servais, I. Fradi, J. Crommen, M. Fillet, Micellar electrokinetic chromatography systems for the separation of mixtures of charged and uncharged compounds, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1933–1939.

[28] J. Brange, L. Langkjaer, Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH, *Acta Pharm. Nord.* 4 (1992) 149–158.



## 2. Insulines humaine, bovine et porcine





Electrophoresis 2015. *Short communication*

SEPARATION OF HUMAN, BOVINE AND PORCINE INSULINS,  
THREE VERY CLOSELY RELATED PROTEINS,  
BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Caroline Lamalle, Diane Roland, Jacques Crommen, Anne-Catherine Servais,  
Marianne Fillet



## Abstract

Human, bovine and porcine insulins are small proteins with very closely related amino acid sequences, which makes their separation challenging. In this study, we took advantage of the high-resolution power of capillary electrophoresis, and more particularly of micellar electrokinetic chromatography, to separate those biomolecules. Among several surfactants, perfluorooctanoic acid ammonium salt was selected. Then, using a design of experiments approach, the optimal BGE composition was found to consist of 50 mM ammonium acetate pH 9.0, 65 mM PFOA and 4 % MeOH. The three insulins could be separated within 12 minutes with a satisfactory resolution. This method could be useful to detect possible counterfeit pharmaceutical formulations. Indeed, it would be easy to determine if human insulin was replaced by bovine or porcine insulin.

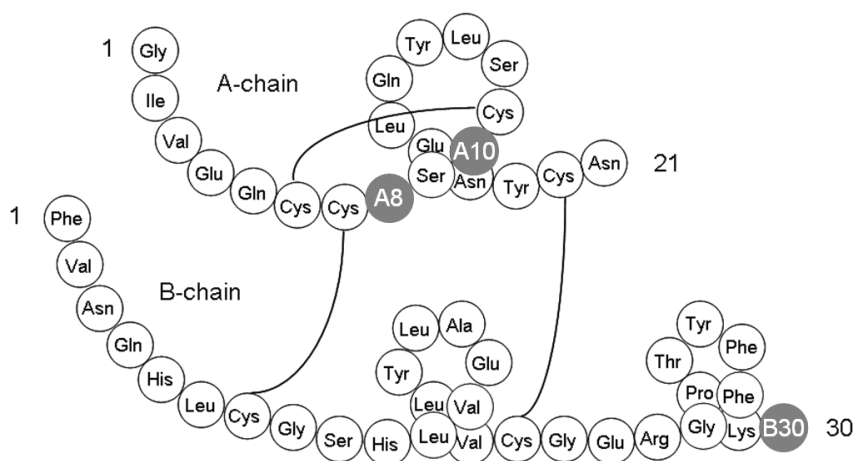


The initial sources of insulin for clinical use were bovine and porcine pancreases. However, due to occasional transmission of pathogens and allergic reactions, insulin and analogues (aspart, lispro, glulisin, glargin, detemir) have been later synthesised by recombinant DNA technology. Beside potential allergy, animal insulins do not guarantee an appropriate treatment of diabetes mellitus and could also lead to insulin resistance [1]. In this study, a method for the separation of human, bovine and porcine insulins was developed in order to be able to detect counterfeit insulin formulations in short analysis time using a simple CE-UV equipment.

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was shown to be a promising technique for the separation of closely related peptides [2-4]. Recently, some MEKC methods were developed to separate human insulin and its analogues [5-7]. To our knowledge, no CE method has been published so far for the separation of human, bovine and porcine insulins. In the nineties, a method was described for the electrophoretic separation of insulins from bovine, porcine, equine and ovine origins but not in mixture with human insulin [3]. In the latter method, the BGE was made of 50 mM borate buffer (pH 8.5) containing 50 mM SDS and 15% ACN.

The three insulins of interest in this study are difficult to separate because of their very closely related structures (Fig. 1). On one hand, human and porcine insulins only differ from each other by the nature of one amino acid. Porcine insulin comprises alanine in position B30 while human insulin contains threonine, which only differs from alanine by an additional hydroxymethyl group [8]. On the other hand, human and bovine insulins differ from each other by three amino acids. Bovine insulin contains alanine instead of threonine in positions A8 and B30, and valine instead of isoleucine in position A10 [8]. Isoleucine has an additional methyl group compared to valine. Since the structures of these insulins are very similar, their sizes (5807.7 - 5777.6 - 5733.6 Da) and pI (around 5.35) are also very close [1, 9-11]. It is thus really challenging to separate these three small proteins.

Acetic acid, ammonia, hydrochloric acid (HCl) (37%), methanol (MeOH), ACN and SDS were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium hydroxide (NaOH) and isopropanol were from VWR (Leuven, Belgium). Perfluorooctanoic acid ammonium salt (PFOA), polysorbate 20 (Tween® 20) and human insulin standard were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bovine and porcine insulin standards came from NIBSC (Potters Bar, England). Insulatard® was purchased from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA) and Chromafil® syringe filters (0.20 µm) were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany).



	A8	A10	B30
Human insulin	Thr ( $R=CH_2OHCH_3$ )	Ile ( $R=CH(CH_3)CH_2CH_3$ )	Thr ( $R=CH_2OHCH_3$ )
Porcine insulin	Thr ( $R=CH_2OHCH_3$ )	Ile ( $R=CH(CH_3)CH_2CH_3$ )	Ala ( $R=CH_3$ )
Bovine insulin	Ala ( $R=CH_3$ )	Val ( $R=CH(CH_3)_2$ )	Ala ( $R=CH_3$ )

**Figure 1.** Structural differences between human, bovine and porcine insulins.

R = structural differences between the amino acids.

All the experiments were carried out on a HP<sup>3D</sup>CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, an on-capillary DAD and a temperature control system (15-60 °C ± 0.1 °C). Chemstation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) was used for instrument control, data acquisition and data analysis. Fused silica capillaries were provided by ThermoSeparation Products (San Jose, CA, USA). Electrophoretic separations were carried out in uncoated fused silica capillaries with 50 µm i.d. and 48.5 cm total length (40 cm effective length). At the beginning of each working day, the capillary was washed with 1 M NaOH and water for 10 min each. Before each injection, the capillary was successively washed with 1 M NaOH for 2 min, water for 1 min and was then equilibrated with the BGE for 4 min. After each run, the capillary was washed with 10 mM HCl for 5 min and water for 1 min. Capillary wash cycles were performed at a pressure of approximately 1 bar. Injections were made by applying a pressure of 50 mbar for a period of 5 s. Electropherograms were recorded at 200 nm.

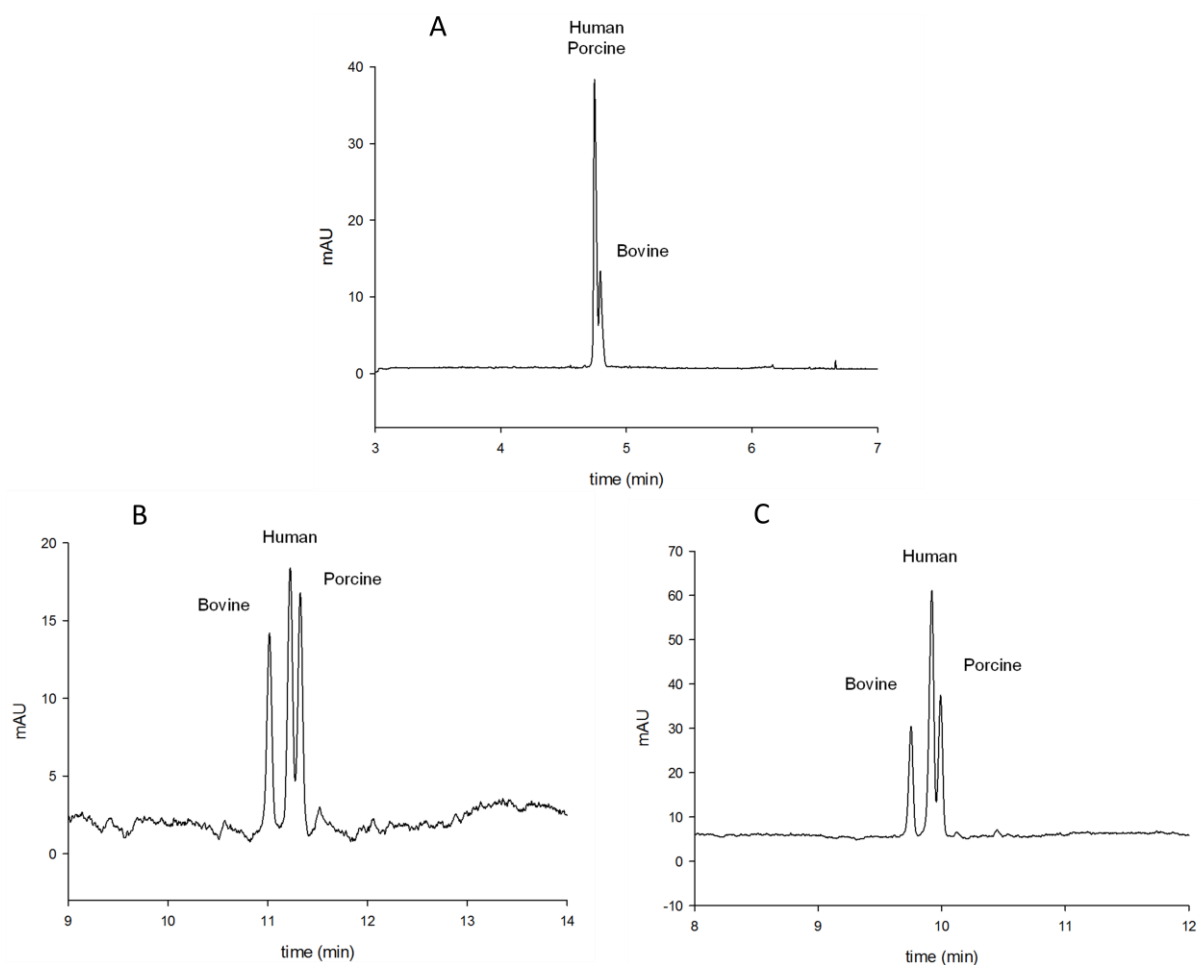
Initial conditions for human, bovine and porcine insulins separation were those previously optimized developed for the separation of human insulin and its pharmaceutical analogues [7]. In this recent work, the sample solutions were prepared by dissolving insulins in 10 mM HCl to reach a concentration of 50 µg/ml. The optimized BGE was made up of 50 mM ammonium acetate (pH 9.0), 50 mM SDS and 15% ACN. When these conditions were tested in the present study, the three insulins were found to co-migrate (data not shown).

In order to improve selectivity, other surfactants were then investigated. The combination of polysorbate 20 and SDS seemed to show some potentially interesting results. Therefore, different concentrations of SDS and polysorbate 20 as well as several percentages of ACN were tested. Unfortunately, the best separation (obtained with 30 mM SDS and 15 mM polysorbate 20) was not satisfactory. In those conditions, bovine insulin migrated a bit slower than human and porcine insulins. These last two insulins, which only differ from each other by one amino acid, were still comigrating (Fig. 2A).

Further investigations were focused on the use of perfluorooctanoic acid ammonium salt (PFOA), a micellar agent already used for the separation of synthetic insulin analogues [5, 12]. A partial but promising separation of the three insulins was obtained with PFOA in a BGE made up of 50 mM ammonium acetate (pH 9.0). Several organic modifiers (ACN, MeOH and isopropanol) were tested at different percentages and encouraging results were obtained with MeOH. Different buffer concentrations, voltages and temperatures were tested and it was decided to settle them at 50 mM, 30 kV and 25 °C, respectively.

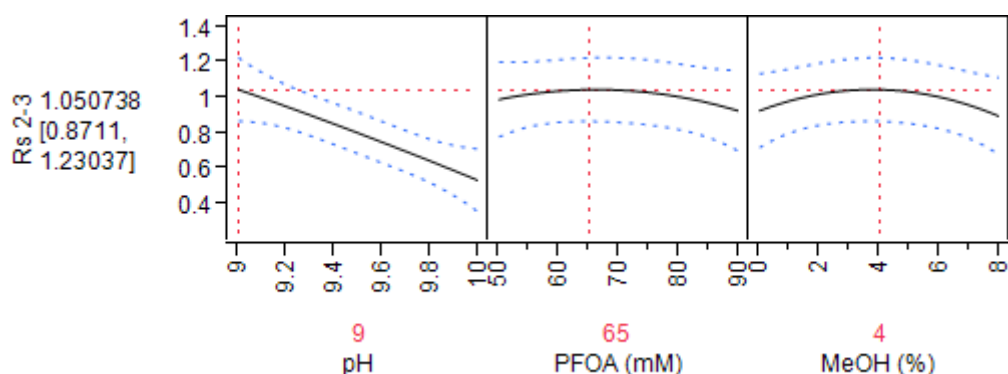
A design of experiments (DoE), namely a central composite design (CCD), was then carried out to optimize the separation. Three factors were optimized: the BGE pH, the PFOA concentration and the MeOH proportion. The effect of the BGE pH was evaluated between 9.0 and 10.0 because a lower pH gave rise to substantial baseline noise and a higher pH led to a decrease in peak efficiency. The range of PFOA concentration was studied between 50 and 90 mM and the MeOH proportion between 0 and 8%. The CCD comprised 15 experimental conditions. The central point was repeated thrice and the other conditions twice, leading to a total of 32 experiments. As the resolution between peaks 1 and 2 was always higher than that between peaks 2 and 3 ( $R_s$  2-3),  $R_s$  2-3 was chosen as the response to maximize.





**Figure 2.** (A) Separation of human, bovine and porcine insulins standard mixture. BGE = 50 mM ammonium acetate pH 9.0 + 30 mM SDS + 15 mM polysorbate 20. Voltage = 20 kV, temperature = 20°C, other electrophoretic conditions described in the text. (B) Separation of human, bovine, and porcine insulins standard mixture. BGE = 50 mM ammonium acetate pH 9.0 + 65 mM PFOA + 4% MeOH. Voltage = 30 kV, temperature = 25°C, other electrophoretic conditions described in the text. (C) Insulatard® (human insulin) spiked with standard mixture. Other electrophoretic conditions described in B.

Figure 3 shows the prediction profiles for the optimization of the BGE composition acquired using JMP software version 10.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). As can be seen in this figure, the predicted Rs 2-3 is the highest in the following BGE conditions: pH 9.0, 65 mM PFOA and 4 % MeOH. It is worth noting that small variations of PFOA concentration or MeOH proportion do not modify considerably the resolution. On the contrary, the BGE pH should be preferably kept at 9.0.



**Figure 3.** Prediction profiles for the optimization of the BGE composition for maximum resolution between peaks 2 and 3. Dashed lines: confidence intervals.

The optimal conditions were experimentally tested and led to the separation of bovine, human and porcine insulins within 12 minutes (Fig. 2B). As predicted, the resolution between human and porcine insulins was not complete (experimental  $R_s$  2-3 = 1.10; predicted  $R_s$  2-3 = 1.05 +/- 0.18) but sufficient to identify these three very closely related proteins. It is important to know that in MEKC the stability of the migration times can be problematic. To decrease migration times variability, we noticed that it is preferable to use a fresh BGE for each injection. The RSD values for six consecutive injections for the migration time and the resolution were 0.7 and 2.7%, respectively.

As can be seen in Fig. 2A, B, it is interesting to note that PFOA and the mixture SDS-polysorbate offer different selectivities toward the three insulins of interest since bovine insulin migrates first with PFOA system and last with the SDS-polysorbate combination. In this study, we confirmed that PFOA could be considered as an attractive surfactant in MEKC for the analysis of small proteins. Moreover, this surfactant is MS-compatible, as well as the other components of the optimized BGE.

To evaluate the selectivity toward pharmaceutical formulations under the final conditions, Insulatard<sup>®</sup>, a pharmaceutical formulation containing human insulin and different excipients (including phenol, meta-cresol and protamine), was analysed. No interference was observed within the insulin migration time window. This confirms the interest of the developed method for the analysis of possible counterfeit insulins purchased from African and Asian countries or on the Internet. However, to avoid a wrong assignment due to very close migration times of the insulins of interest, we recommend the standard addition method by spiking the pharmaceutical formulation with insulines standard mixture (cf. Fig. 2C). Since the peak of human insulin is around two times higher than the others, we can confirm the presence of human insulin in Insulatard<sup>®</sup>.

Many thanks are also due to the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) and the Léon Fredericq foundation for their financial supports.

The authors have declared no conflict of interest.

## References

- [1] Prasad, N. K., *Downstream Process Technology: A New Horizon In Biotechnology*, PHI Learning Private Limited, New Delhi 2010, pp. 53-59.
- [2] Wu, Y., Xie, J., Wang, F., Chen, Z., *J Sep Sci* 2009, *32*, 437-440.
- [3] Yashima, T., Tsuchiya, A., Morita, O., Terabe, S., *Anal Chem* 1992, *64*, 2981-2984.
- [4] Nishi, H., Terabe, S., *J Chromatogr A* 1996, *735*, 3-27.
- [5] Ortner, K., Buchberger, W., Himmelsbach, M., *J Chromatogr A* 2009, *1216*, 2953-2957.
- [6] Yeh, H. H., Wu, H. L., Lu, C. Y., Chen, S. H., *J Pharm Biomed Anal* 2010, *53*, 145-150.
- [7] Lamalle, C., Servais, A. C., Radermecker, R. P., Crommen, J., Fillet, M., *J Pharm Biomed Anal* 2014.
- [8] Brange, J., Langkjoer, L., *Pharm Biotechnol* 1993, *5*, 315-350.
- [9] Sambamurthy, K., *Pharmaceutical Biotechnology*, New Age International, New Delhi 2006, pp. 164-168.
- [10] Wintersteiner, O., Abramson, H. A., *J. Biol. Chem.* 1933, *99*, 741-753.
- [11] Conway-Jacobs, A., Lewin, L. M., *Anal Biochem* 1971, *43*, 394-400.
- [12] Lamalle, C., Baptiste, E., Marini, R. D., Crommen, J., Hubert, P., Servais, A. C., Fillet, M., *Spectra Analyse* 2014, *298*, 58-61.





### 3. Protamine



*Article en préparation*

ANALYSIS OF PROTAMINE PEPTIDES IN INSULIN PHARMACEUTICAL  
FORMULATIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Caroline Lamalle, Anne-Catherine Servais, Jacques Crommen, Marianne Fillet





## Abstract

Protamine is a group of highly basic peptides which is sometimes added to insulin formulations to prolong the pharmacological action. In this study, different methods were investigated in order to identify protamine in insulin formulations. CE in aqueous and non-aqueous media was tested using various BGE and additives in order to optimize the separation of these peptides with very close amino acid sequences. Finally, a method using a capillary of 120 cm effective length and an aqueous BGE made of 100 mM phosphate pH 2 and 50 mM Thesit<sup>®</sup> gave the best results, providing the separation of the four major protamine peptides within 25 minutes.



## 1. Introduction

Protamine is the generic name of highly basic peptides with an average molecular mass of approximately 5000 Da, isolated from fish sperm. For clinical use, protamines are usually commercially available as sulfate or, to a lesser extent, as chlorhydrate, extracted and purified from salmon (*Salmonidae* or *Clupeidae*) [1]. The first insulin preparations with protamine sulfate were commercialized in the mid-1930s to extend the action of insulin by co-precipitation. Beside its use in diabetes mellitus therapy, protamine is currently used in severe overdose or bleeding caused by heparin [2] and can be employed as gel in treatment of paradontopathy [3]. More recently, it also became a promising agent in gene therapy for enhancing the transfection of genes and the delivery of antisense oligonucleotides [4, 5].

In diabetes mellitus therapy, several insulin analogues with different duration of action are used. Lispro, aspart and glulisin are rapid-acting analogues, while glargin and detemir are long-acting analogues. In commercial formulations containing human insulin, lispro or aspart, protamine is sometimes added with small quantities of zinc and phenol or meta-cresol to form an insoluble complex at neutral pH. This complex must be dissociated by protaminases before the effect of insulin can occur so that these formulations provide an intermediate action profile. Since the time-action profile of insulin depends on the presence of protamine, it is important to develop analytical methods to identify this excipient in pharmaceutical formulations. In salmon protamine, four major peptides have been characterized by Hoffmann et al. [6]. They are made up of 30-32 aliphatic amino acids whose 21-22 residues consist of arginine (representing about 70% of the proteic sequence) (see Table 1). These peptides are very closely related since they only differ from each other by one to five amino acids and they have high and nearly identical isoelectric points ( $pI \approx 12$ ) [7]. Moreover, as protamine peptides consist solely of aliphatic amino acids, their UV absorbance is very low.

All these reasons make their analysis difficult. Colorimetry, fluorescence spectroscopy [8] and high performance liquid chromatography (HPLC) [3, 6, 9, 10] have been applied to study protamine as reference standard or in drug formulations. To our knowledge, no capillary electrophoresis (CE) method has been developed so far to analyze protamine in insulin formulations. One CE method was developed for the analysis of human protamine [11] and another one for the analysis of milt protein in food [12]. Coated capillaries (with polyacrylamide or polyvinylalcohol, respectively) and acidic buffers (20 mM citric acid pH 3 or 120 mM phosphate buffer pH 2.5) were used in these methods. In the best conditions, three protamine related peptides could be detected.

Table 1. Amino acid sequences of the four major protamine peptides. Bold letters represent heterologous regions. Deletions are indicated by a dash (-) in place of an amino acid.

---

PRRRRR**SSSR**P IRRRRRPRASRRRRRGGRRRR  
 PRRRR\_SSRRPVRRRRRPRV**SSRRRR**GGRRRR  
 PRRRR\_SSSRPVRRRRRPRV**SSRRRR**GGRRRR  
 PRRRR\_ASRR\_I**RRRRR**PRV**SSRRRR**GGRRRR

---

With P: proline, R: arginine, S: serine, A: alanine,  
I: isoleucine, V: valine and G: glycine

In our study, protamine sulfate reference standard was analyzed as well as an insulin formulation containing protamine sulfate. Method development was performed by CE in aqueous and non-aqueous media (NACE). CE is an attractive technique with well-known advantages such as simplicity, high separation efficiency, short analysis time and low sample and solvent consumption. On one hand, non-aqueous solvents offer a wide range of dielectric constants, polarity, viscosity and autoprotolysis constants [13]. Another advantage of non-aqueous media is their lower conductivity. On the other hand, aqueous media offer better possibilities to adapt the BGE pH and to work in the micellar electrokinetic chromatography (MEKC) mode, with different kinds and concentrations of surfactants which are important in order to optimise selectivity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and Reagents

Hydrochloric acid (HCl) (37%), acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), tetrahydrofuran (THF), sodium dihydrogen phosphate and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Protamine sulfate, ammonium formate, sodium deoxycholate, Tween 20<sup>®</sup>, Thesit<sup>®</sup>, ammonium perfluorooctanoate (PFOA) and fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) and butanol were from Acros Organics (NJ, USA). Sodium hydroxide (NaOH), phosphoric acid and isopropanol were purchased from VWR (Leuven, Belgium). Humuline NPH<sup>®</sup> was obtained from Eli-Lilly (Indianapolis, IN, USA). Ultra-pure water was supplied by a Milli-Q equipment (Millipore, Bedford, MA, USA) and Chromafil<sup>®</sup> syringe filters (0.20 μm) were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

## 2.2. Sample preparation

For the analysis of the reference standard, protamine sulfate was dissolved in 10 mM HCl to obtain a concentration of 250 µg/ml. For the analysis of the insulin formulation, 120 µl of Humuline NPH® was acidified by 5 µl of 6 M HCl.

## 2.3. Buffer and BGE

In aqueous CE, the buffer was prepared by adding a solution of 100 mM sodium dihydrogen phosphate to a solution of 100 mM phosphoric acid in order to reach pH 2.0. In the final conditions, the aqueous BGE was made by dissolving 50 mM Thesit® in the buffer. For NACE experiments, the BGE was prepared by dissolving 50 mM ammonium formate in MeOH and adding formic acid in order to reach 0.5 M. Finally, 50 mM PFOA was dissolved in this methanolic buffer solution.

## 2.4. Instrumentation

All experiments were carried out on a HP<sup>3D</sup>CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, an on-capillary DAD and a temperature control system (15-60 °C ± 0.1 °C). Chemstation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) was used for instrument control, data acquisition and data analysis. Fused silica capillaries were provided by ThermoSeparation Products (San Jose, CA, USA). Electrophoretic separations were carried out in uncoated fused silica capillaries with 50 µm i.d. and 48.5 cm total length (40 cm effective length) or 128.5 cm total length. At the beginning of each working day, the capillary was washed with 1 M NaOH and water for 10 min each in the case of aqueous BGE and with MeOH for 15 min in the case of non-aqueous BGE. In the case of aqueous BGE, before each injection the capillary was successively washed with 1 M NaOH for 2 min, water for 1 min and was then equilibrated with the BGE for 4 min and after each run the capillary was washed with 10 mM HCl for 5 min and water for 1 min. In the case of non-aqueous BGE, the capillary was washed with MeOH for 2 min and then equilibrated with the BGE for 2 min before each injection. Capillary wash cycles were performed at a pressure of approximately 1 bar. Injections were made by applying a pressure of 50 mbar for a period of 2 s in the case of aqueous BGE and 5 s in the case of non-aqueous BGE. During the run, the applied voltage was 20 kV or 30 kV in the case of aqueous BGE and 30 kV in the case of non-aqueous BGE. The capillary was thermostated at 25 °C or 35 °C in the case of aqueous BGE and at 25 °C in the case of non-aqueous BGE. The electropherograms were recorded at 200 nm.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Initial considerations

In insulin formulations containing protamine, these two molecules form with zinc an insoluble complex at neutral pH. An acidic pH was then required to solubilise protamine. As already proposed in a recent work related to insulin quantification in formulations, a solution made of 10 mM HCl was chosen as dissolution and dilution solvent [14].

The use of a very acidic BGE (below pH 2.5) was also critical in this application in order to prevent the adsorption of the positively charged protamine peptides on the capillary wall of bare fused silica capillaries.

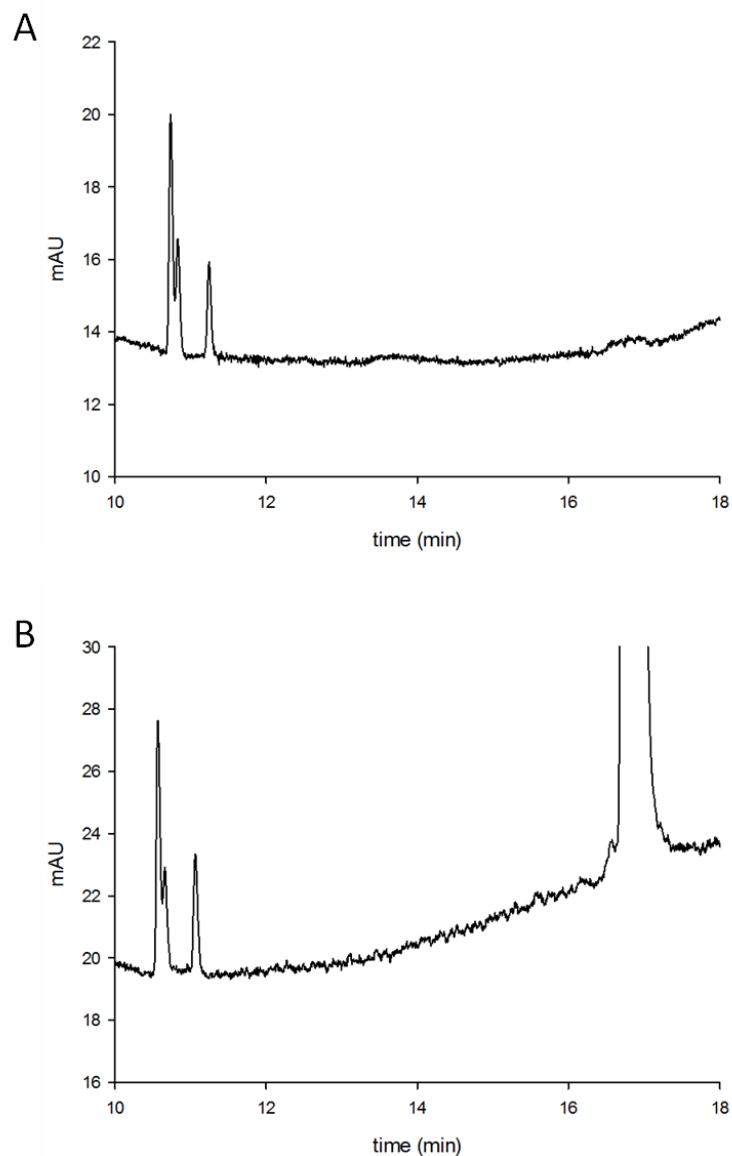
As protamine is made up of aliphatic amino acids, a derivatization step with fluorenylmethyloxycarbonyl (FMOC) reagent was first considered to enhance the detectability of protamine but this solution was rapidly abandoned because of poor repeatability and the large number of derivatized peptides formed (data not shown). Finally, the absorption wavelength of 200 nm was chosen since the peptide bonds of protamine peptides provide a sufficient UV absorbance at a sample concentration of 250 µg/ml.

#### 3.2. Method development in non-aqueous medium (NACE)

The first experiments were performed in MeOH with 10 mM ammonium formate acidified by 0.75 M formic acid, as described in a previous work using non-aqueous BGEs [15]. Only one peak could be observed. An increase of ammonium formate concentration and the replacement of formic acid with TFA was found to be beneficial since two peaks could be detected. A BGE made of 50 mM ammonium formate and 0.5 M TFA gave the highest resolution between these two peaks. The first peak was higher than the second, suggesting a co-migration of different peptides. Indeed, the four major protamine peptides should be in similar proportions, as showed by Hoffmann et al. [6]. Under these conditions, several surfactants were then tested in order to try to separate additional peptides. For example, with SDS, the separation between the two peaks was somewhat improved; with sodium deoxycholate or Thesit<sup>®</sup>, the first peak showed a beginning of separation; with Tween 20<sup>®</sup>, three peaks appeared but the baseline was really not acceptable, while with PFOA, three peaks could be detected within 11 minutes. Figure 1A shows the electropherogram of protamine with 50 mM ammonium formate, 0.5 M TFA and 50 mM PFOA in MeOH. The first peak is still higher than the two others and the resolution is not complete between the first two peaks. Unfortunately, different concentrations of PFOA, the combination of PFOA with other surfactants, the combination of MeOH with other organic solvents (butanol, ACN, THF, isopropanol) could not lead to any improvement. A

capillary with an effective length of 120 cm was also tested but no peak was observed within 100 minutes.

However, the detection of these three peaks can already be considered as characteristic peak profile for protamine. This method was therefore applied to Humuline NPH<sup>®</sup>, a human insulin formulation containing protamine. The three peaks were detected at the corresponding migration times of those from protamine reference standard and no interference from the insulin formulation was observed (the peak of insulin appeared at 17 minutes) (Figure 1B).



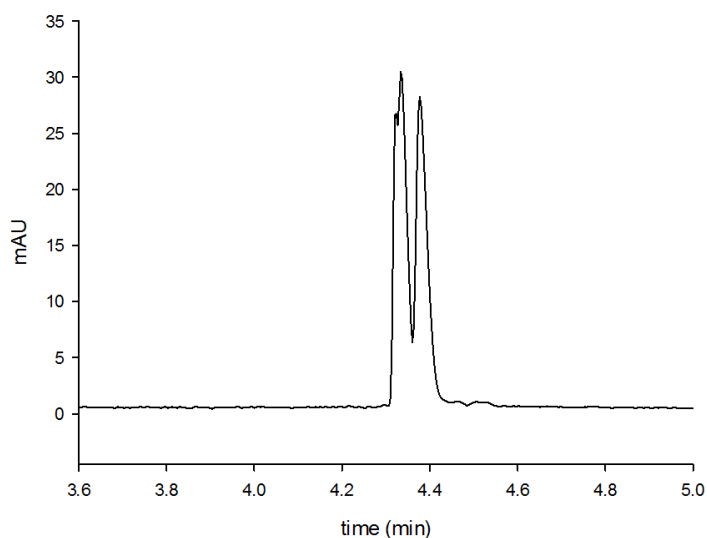
**Figure 1.** Electropherograms of protamine (A) and insulin formulation (B).  
BGE: 50 mM ammonium formate + 0.5 M TFA + 50 mM PFOA in MeOH.  
Other conditions: see in Materials and methods.



### 3.3. Method development in aqueous medium

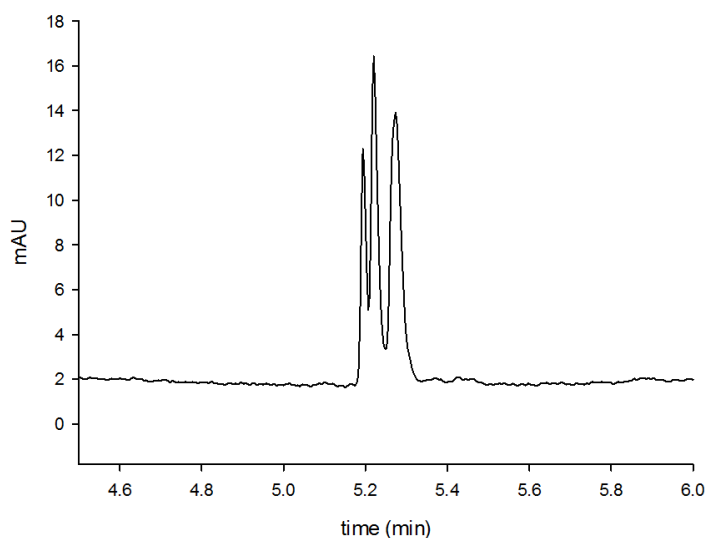
The first experiments in aqueous medium were performed with a BGE similar to the one used in non-aqueous medium. The BGE salt concentration was decreased to provide acceptable conductivity and a doublet peak could be observed with a BGE containing 10 mM ammonium formate, 10 mM TFA and 10% ACN.

A more acidic BGE (phosphate buffer adjusted at pH 2) was then investigated to ensure the protonation of the silanols and thus enhance peak efficiency. Phosphate buffer has already been used in the literature for the analysis of protamines [6, 9, 10, 12]. With 100 mM phosphate buffer (pH 2), three peaks were detected in about 4 minutes but the first two peaks were only slightly resolved (Figure 2). The modification of the buffer concentration did not lead to any improvement. Therefore different organic solvents and surfactants were tested to try to improve the separation. The addition of ACN, MeOH and isopropanol did not lead to any improvement. By addition of SDS, no peak could be detected even at very low concentrations (0,5 mM) and after addition of ACN (10%), which means that protamine certainly interacted strongly with the negative charges of the micelles. By addition of PFOA, the same problem occurred.



**Figure 2.** Electropherogram of protamine. BGE: 100 mM phosphate buffer (pH 2). Effective length 40 cm, 20 kV, 25 °C, other conditions: see in Materials and methods.

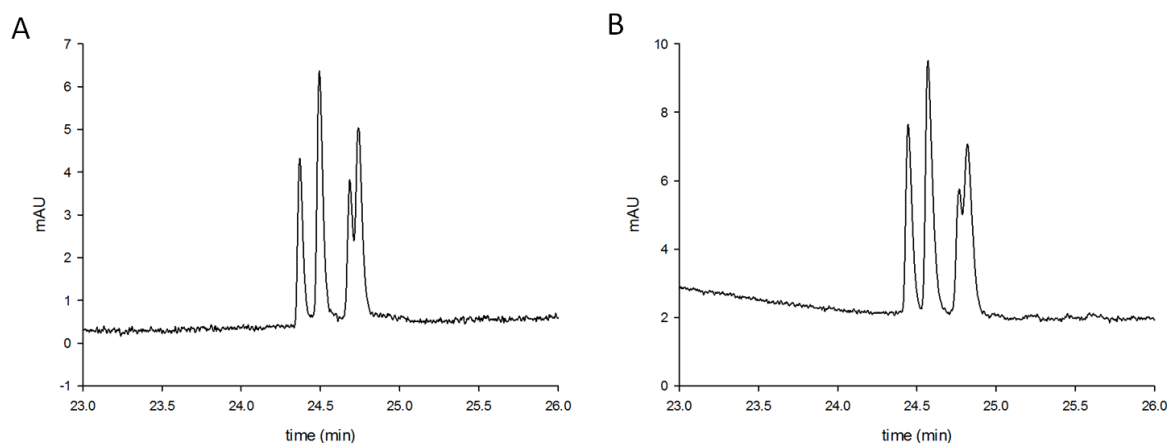
Neutral surfactants were therefore investigated. The addition of Thesit® or Tween 20® gave rise to a slight increase in resolution but the use of Tween 20® led again to a poor baseline. The increase of Thesit® concentration improved resolution but current failures occurred at high concentrations (100-200 mM). A 50 mM concentration was thus chosen as the best compromise (Figure 3). The addition of organic solvent (ACN or MeOH) did not lead to any improvement.



**Figure 3.** Electropherogram of protamine. BGE: 100 mM phosphate buffer (pH 2) + 50 mM Thesit®. Effective length 40 cm, 20 kV, 25 °C, other conditions: see in Materials and methods.

A capillary with an effective length of 120 cm was also used and as expected the migration times increased. Interestingly, a shoulder appeared on the last peak. To reduce the analysis time, the voltage was then increased to 30 kV and the temperature to 35 °C. The four peaks migrated within 25 minutes (Figure 4A). The resolution was now complete between the first two peaks but only partial between the last two. However, as already explained in the previous section, it can be considered as sufficient to identify protamine.

Humuline NPH® was then analyzed in the final conditions. The peaks were detected at the corresponding migration times of protamine reference standard (about 25 minutes) and no interference from the insulin formulation was observed (no additional peak was detected within 50 minutes) (Figure 4B).



**Figure 4.** Electropherograms of protamine (A) and insulin formulation (B).

BGE: 100 mM phosphate buffer (pH 2) + 50 mM Thesit®.

Effective length 120 cm, 30 kV, 35 °C other conditions: see in Materials and methods.

#### 4. Conclusion

CE methods were developed in order to identify protamine in insulin formulations. A method with a non-aqueous BGE (made of 50 mM ammonium formate, 0.5 M TFA and 50 mM PFOA in MeOH) enabled the detection of three protamine peaks within 11 minutes. Another method was developed using an aqueous BGE (100 mM phosphate pH 2 with 50 mM Thesit®), a capillary of 120 cm effective length, a voltage of 30 kV and a temperature of 35 °C, enabling the detection of four peaks within 25 minutes. These methods were then successfully applied to identify protamine in Humuline NPH®, an insulin formulation.

The method in non-aqueous medium as well as the intermediary conditions of aqueous medium can be appropriate to rapidly identify protamine, but the last method with the aqueous BGE is preferable since it provides the best resolution. Moreover, no capillary coating was necessary, which led to a very simple CE method.

Finally, it is worth noting that the profiles of the electropherograms obtained with aqueous and non-aqueous BGE were not similar. Indeed, the two peptides which were not separated in non aqueous BGE concerned the first peak while they concerned the last peak in aqueous BGE. Therefore, it would be interesting to identify each protamine peak in order to observe the migration order and to confirm the complementarity of these two methods.

Many thanks are due to the FNRS and the Léon Fredericq foundation for their financial support.

## 5. References

- [1] *European Pharmacopeia 6.0*.
- [2] in: Dart, R. C. (Ed.), *Medical toxicology 2004*, pp. 243-244.
- [3] A. Snyckerski, J. Dudkiewicz-Wilczynska, J. Tautt, Determination of protamine sulphate in drug formulations using high performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 1998, 18, 907-910.
- [4] T. Boulikas, F. Martin, Histones, protamine, and polylysine but not poly(E:K) enhance transfection efficiency, *Int J Oncol* 1997, 10, 317-322.
- [5] M. Junghans, J. Kreuter, A. Zimmer, Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles, *Nucleic Acids Res* 2000, 28, E45.
- [6] J. A. Hoffmann, R. E. Chance, M. G. Johnson, Purification and analysis of the major components of chum salmon protamine contained in insulin formulations using high-performance liquid chromatography, *Protein Expr Purif* 1990, 1, 127-133.
- [7] in: Press, A. (Ed.), *Advances in protein chemistry*, New York 1961.
- [8] D. Lochmann, S. Stadlhofer, J. Weyermann, A. Zimmer, New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagent, *Int J Pharm* 2004, 283, 11-17.
- [9] A. Hvass, B. Skelbaek-Pedersen, Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 2005, 37, 551-557.
- [10] D. Awotwe-Otoo, C. Agarabi, P. J. Faustino, M. J. Habib, S. Lee, M. A. Khan, R. B. Shah, Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate, *J Pharm Biomed Anal* 2012, 62, 61-67.
- [11] J. Zhang, H. Chen, T. Zhou, R. Fei, A new capillary electrophoresis method for analysis of human sperm protamine, *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* 2001, 21, 323-324.
- [12] M. Hirokado, Y. Shimamura, K. Nakajima, H. Ozawa, K. Kimura, K. Yasuda, M. Nishijima, Methods for determination of milt protein and epsilon-polylysine in food additive preparations and processed foods by capillary zone electrophoresis, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2001, 42, 79-83.
- [13] A. Psurek, G. K. Scriba, Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: comparison of methanol and aqueous buffers, *Electrophoresis* 2003, 24, 765-773.

[14] C. Lamalle, A. C. Servais, R. P. Radermecker, J. Crommen, M. Fillet, Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 2014, *111*, 344-350.

[15] L. Chankvetadze, A. C. Servais, M. Fillet, A. Salgado, J. Crommen, B. Chankvetadze, Comparative enantioseparation of talinolol in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis and study of related selector-selectand interactions by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Chromatogr A* 2012, *1267*, 206-216.





## CHAPITRE IV

# CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES





Cette thèse décrit différentes applications de l'électrophorèse capillaire (CE), et plus particulièrement de la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), à l'analyse de médicaments dans le contexte de la contrefaçon.

La première partie du travail nous a permis de mieux comprendre la MEKC avant de l'appliquer au contrôle de qualité de médicaments.

Elle a consisté à étudier l'influence du milieu de séparation (ou BGE) sur la migration des analytes. De cette étude, nous devons retenir que la concentration en surfactant et la proportion en modificateur organique sont des paramètres qui influencent fortement le comportement des analytes et qui doivent donc être investigués lors du développement d'une méthode par MEKC. Les interactions avec les micelles formées de dodécyl sulfate de sodium (SDS) sont importantes pour les composés neutres, grâce à la formation de liaisons hydrophobes, ainsi que pour les cations qui sont également attirés par les charges négatives du SDS. En principe, les anions ne se lient pas aux micelles car les charges négatives des deux entités se repoussent. Leurs mobilités devraient donc rester constantes. Toutefois, nous avons observé une légère modification de la mobilité des anions, proportionnelle à leur hydrophobicité. Ceci est d'ailleurs aussi le cas pour les cations et les molécules neutres. En règle générale, l'augmentation de la concentration en SDS intensifie les interactions, jusqu'à un plateau, alors que l'augmentation de la proportion en acétonitrile (ACN) diminue les interactions, jusqu'à retourner à des mobilités semblables à celles observées en électrophorèse capillaire de zone (CZE). Le pH du BGE est également un paramètre à bien optimiser puisqu'il détermine l'état de charge des composés. Cette étude a confirmé l'intérêt de la MEKC, et l'importance de l'optimisation de ses paramètres, pour la séparation de mélanges complexes de molécules, qu'elles soient neutres ou chargées.

La deuxième section a concerné l'application de la MEKC à l'analyse d'un mélange de 15 petites molécules médicamenteuses appartenant à la classe des antipaludiques (artésunate, artéméther, amodiaquine, chloroquine, pipéraquline, primaquine, quinine, cinchonine, méfloquine, halofantrine, sulfadoxine, sulfalène, atovaquone, proguanil et pyriméthamine).

Un plan d'expérience a été entrepris pour prendre en compte l'effet de la température, du pH du BGE, de la concentration en SDS et de la proportion en ACN. Une modélisation mathématique nous a ensuite permis de prédire une condition optimale qui a conduit à la séparation, en seulement 8 minutes, de la majorité des composés. En effet, la primaquine, la cinchonine et le proguanil co-migrent. Cependant, puisqu'ils ne sont pas associés dans des formulations pharmaceutiques, leur identification reste possible par la prise de leurs spectres UV qui sont différents. L'Afrique étant

fortement touchée par la contrefaçon des antipaludiques, la méthode a été appliquée à l'analyse de quatre spécialités provenant du marché africain. Le contrôle qualitatif a donné des résultats conformes mais trois des quatre spécialités étaient légèrement sous-dosées en principe actif (valeur proche de 90%).

La dernière partie a porté sur l'analyse des biomolécules contenues dans les formulations pharmaceutiques à base d'insuline. Plus exactement, elle avait pour cible la séparation de ces petites protéines structurellement très proches par MEKC.

A l'origine, l'insuline était isolée du pancréas bovin ou porcin. A l'heure actuelle, l'insuline humaine est synthétisée par la technologie de l'ADN recombinant. A côté de cette insuline humaine recombinante, différents analogues synthétiques ont été commercialisés dans le but d'accélérer ou retarder l'absorption et donc l'action de l'insuline (insulines lispro, aspart et glulisine, ou glargine et détémir). De plus, un excipient est parfois ajouté dans certaines formulations à action rapide pour obtenir une durée d'action intermédiaire entre celle de l'insuline humaine et celle des insulines à action lente. Il s'agit de la protamine, qui est un mélange de plusieurs peptides proches.

Dans ce travail, toutes ces biomolécules ont été étudiées et des méthodes électrophorétiques ont été développées pour les séparer.

Deux méthodes par MEKC (utilisant, avec de l'ACN, du perfluorooctanoate d'ammonium (PFOA) ou du SDS) ont été présentées pour séparer l'insuline humaine de ses 5 analogues synthétiques. La deuxième est cependant à privilégier car, en 15 minutes, elle permet en plus de séparer les produits de dégradation principaux et les excipients (phénol et méta-crésol). Le temps d'analyse de cette méthode a ensuite été diminué à 3 minutes en réalisant l'analyse sur le petit côté du capillaire. La validation de cette méthode a été menée avec succès pour la quantification de l'insuline humaine. Quatre formulations à base d'insuline humaine (deux belges et deux achetées sur internet) ont été contrôlées et leurs dosages se sont révélés être conformes (entre 90 et 110%).

Une méthode par MEKC a également été proposée pour distinguer l'insuline humaine des insulines bovine et porcine. En effet, en utilisant les méthodes développées pour les analogues synthétiques, ces trois peptides avaient exactement la même mobilité. Une condition optimale (utilisant du PFOA et du méthanol) a finalement été trouvée pour séparer ces trois insulines en 12 minutes, et la méthode a été appliquée à une spécialité contenant de l'insuline humaine.

Enfin, deux pistes ont été suggérées pour séparer les peptides majoritaires de la protamine : la CE en milieu aqueux ou non-aqueux (NACE). Bien que la protamine soit composée uniquement d'acides aminés aliphatiques, la détection UV a été possible à 200 nm. En NACE, un milieu méthanolique contenant notamment du PFOA a permis de séparer trois pics en 12 minutes. En milieu aqueux, du

Thesit® a été utilisé comme surfactant et a donné lieu à une séparation des quatre peptides majoritaires en 25 min. Une spécialité pharmaceutique contenant de la protamine a été analysée par ces méthodes. Les temps de migration étaient identiques et les pics avaient les mêmes proportions que ceux de la protamine standard. En outre, aucune interférence n'a été détectée avec les excipients ou l'insuline.

Séparément ou conjointement, toutes ces méthodes peuvent être utilisées selon les besoins pour réaliser le contrôle qualité de formulations à base d'insuline et détecter d'éventuelles contrefaçons.

Le mode de séparation par MEKC s'est donc révélé essentiel et convaincant dans le cadre de nos applications. Il a permis la séparation d'un mélange complexe de petites molécules pharmaceutiques et la séparation de petites protéines et de peptides structurellement très proches. Grâce à l'optimisation d'un grand nombre de paramètres (nature et concentration du BGE, pH, nature et concentration du surfactant, nature et proportion du modificateur organique,...), la sélectivité peut être maximisée en fonction des molécules étudiées, ce qui rend le domaine d'application très vaste. De plus, les méthodes développées sont généralement simples, rapides, efficaces et assez peu coûteuses.

Les thèmes abordés dans cette thèse permettent d'envisager de nombreuses perspectives.

Premièrement, le travail analytique pourrait être poursuivi en validant les méthodes pour tous les analytes étudiés.

Ensuite, une application de nos méthodes pourrait être envisagée dans des laboratoires de contrôle impliqués dans la recherche de contrefaçons. Ces méthodes pourraient aussi être testées sur l'appareillage CE bon marché, développé particulièrement pour les pays en développement. Cette démarche aurait un impact plus concret sur la lutte contre la contrefaçon médicamenteuse dans ces pays.

Dans le cadre de l'analyse des formulations à base d'insuline, il serait important d'étudier l'agrégation de cette protéine puisque les agrégats ne sont généralement plus actifs. De plus, ils entraînent un inconfort pour les patients suite à la formation de dépôts aux sites d'injection.

Enfin, après l'analyse de petites molécules, de peptides d'une trentaine d'acides aminés et de petites protéines d'une cinquantaine d'acides aminés, l'analyse de plus grosses molécules serait une suite logique de ce travail. Il faudrait être encore plus vigilant face aux phénomènes d'adsorption, mais la CE est une technique qui pourrait assurément convenir à l'analyse de molécules intactes de grande taille, comme les protéines, les anticorps, voire les vaccins.



## CHAPITRE V

### RÉSUMÉ DE LA THÈSE



La contrefaçon médicamenteuse est une réalité bien plus présente qu'on ne le pense généralement. Elle touche de nombreux pays et concerne diverses classes pharmacologiques. La consommation de ces produits contrefaits pouvant entraîner de sérieux problèmes de santé, il est important de lutter contre ce fléau. Une des actions à promouvoir est le contrôle plus strict des médicaments à toutes les étapes de distribution. Des techniques analytiques appropriées doivent être sélectionnées et des méthodes analytiques performantes doivent ensuite être optimisées afin de contrôler leur qualité.

Dans ce travail, l'électrophorèse capillaire (CE), et plus particulièrement la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), a été appliquée à l'analyse de molécules pharmaceutiques et biopharmaceutiques particulièrement visées par les contrefacteurs.

La première partie de ce travail s'intéresse aux petites molécules médicamenteuses issues de la synthèse chimique. Une méthode a été développée pour analyser simultanément 15 antipaludiques (artésunate, artéméther, amodiaquine, chloroquine, pipéraquline, primaquine, quinine, cinchonine, méfloquine, halofantrine, sulfadoxine, sulfalène, atovaquone, proguanil et pyriméthamine). Elle a ensuite été utilisée pour contrôler des spécialités provenant du marché africain.

La deuxième partie de ce travail s'intéresse à de plus grosses molécules et plus particulièrement à l'analyse de formulations à base d'insuline. Une méthode par MEKC a mené à la séparation des 6 insulines pouvant être présentes dans ces formulations (insulines humaine, lispro, aspart, glulisine, glargine et détémir). Une autre méthode a également permis de séparer l'insuline humaine des insulines bovine et porcine. Et enfin, une méthode a été proposée pour identifier la protamine, un excipient de certaines formulations composé de plusieurs peptides proches. Quelques spécialités ont ainsi pu être contrôlées en utilisant ces différentes méthodes.

Par ce travail, nous avons donc confirmé l'intérêt de la MEKC dans la séparation d'une série de molécules (bio)pharmaceutiques, de petite ou de grande taille, structurellement différentes ou au contraire très proches.





## CHAPITRE VI

### THESIS SUMMARY



Drug counterfeiting is an important concern nowadays. It affects a lot of countries and diverse pharmacological classes. As the consumption of these counterfeited products can lead to serious health problems, it is important to fight against this scourge. One action to promote is a more rigorous control of the medicines during all the distribution steps. In this context, appropriate analytical techniques have to be chosen and relevant analytical methods have to be optimized in order to control their quality.

In this work, capillary electrophoresis (CE), and more particularly micellar electrokinetic chromatography (MEKC), was applied to the analysis of pharmaceutical and biopharmaceutical molecules which are noticeably affected by counterfeiting.

The first part of the work deals with small drug molecules. A method was developed to simultaneously analyse 15 antimalarials (artesunate, artemether, amodiaquine, chloroquine, piperazine, primaquine, quinine, cinchonine, mefloquine, halofantrine, sulfadoxine, sulfalen, atovaquone, proguanil and pyrimethamine). It was then used to control pharmaceutical products coming from African market.

The second part of the work involves bigger molecules, and more particularly the analysis of insulin-based formulations. A MEKC method led to the separation of the 6 insulins which can be present in these formulations (human, lispro, aspart, glulisin, glargin and detemir insulins). Another method was developed to separate human insulin from bovine and porcine insulins. Finally, analytical conditions were proposed to identify protamine, an excipient present in several insulin formulations and composed of closely related peptides. Some pharmaceutical products were then controlled by using these different methods.

With this work, we have thus confirmed the interest of MEKC for the separation of a series of (bio)pharmaceutical molecules, small or large-sized, structurally different or closely related.



## CHAPITRE VII

### LISTE DES PUBLICATIONS



## 1. Articles scientifiques

### 1.1. Publications en premier auteur

- Micellar electrokinetic chromatography systems for the separation of mixtures of charged and uncharged compounds, C. Lamalle, A-C. Servais, I. Fradi, J. Crommen, M. Fillet, *J. Sep. Sci.*, 2012, 35 (15), 1933-39.
- Development of a generic micellar electrokinetic chromatography method for the separation of 15 antimalarial drugs as a tool to detect medicine counterfeiting, C. Lamalle, R.D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, J. Crommen, P. Hubert, A-C. Servais, M. Fillet, *Electrophoresis*, 2012, 33 (11), 1669-78.
- Développement de méthodes séparatives pour détecter la contrefaçon de molécules biosynthétiques comme l'insuline et les GHRP, C. Lamalle, E. Baptiste, R.D. Marini, J. Crommen, P. Hubert, A-C. Servais, M. Fillet, *Spectra Analyse*, 2014, 298, 58-61.
- Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography, C. Lamalle, A-C. Servais, R. Radermecker, J. Crommen, M. Fillet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, 111, 344-50.
- Separation of human, bovine and porcine insulins, three very closely related proteins, by micellar electrokinetic chromatography, C. Lamalle, D. Roland, J. Crommen, A-C. Servais, M. Fillet, *Electrophoresis*, 2015, accepted for short communication.
- Analysis of protamines in insulin pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis, C. Lamalle, J. Crommen, A-C. Servais, M. Fillet, *in preparation*.

### 1.2. Publications en co-auteur

- Chemo- and enantio-selective method for the analysis of amino acids by capillary electrophoresis with in-capillary derivatization, I. Fradi, A-C. Servais, C. Lamalle, M. Kallel, M. Abidi, J. Crommen, M. Fillet, *J. Chromatogr. A*, 2012, 1267, 121-6.
- In-capillary derivatization with (-)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate as chiral labeling agent for the electrophoretic separation of amino acids, I. Fradi, E. Farcas, A.B. Saïd, M.L. Yans, C. Lamalle, G.W. Somsen, A. Prior, G.J. de Jong, M. Kallel, J. Crommen, A-C. Servais, M. Fillet, *J. Chromatogr. A*, 2014, 1363, 338-47.



## 2. Communications orales

- Séparation d'antimalariques par MEKC, C. Lamalle, R.D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, A-C. Servais, J. Crommen, Ph. Hubert, M. Fillet, young scientists forum, CIRM, 2011, Liège, Belgium.
- Development of a generic MEKC method for the separation of 16 antimalarial drugs by a design space approach, C. Lamalle, R.D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, A-C. Servais, J. Crommen, Ph. Hubert, M. Fillet, Forum for pharmaceutical sciences, 2011, Spa, Belgium.
- Développement d'une méthode MEKC pour le contrôle qualité de spécialités à base d'insuline, C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, young scientists forum, CIRM, 2013, Liège, Belgium.
- Simultaneous determination of insulin and analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography (MEKC), C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, Forum for pharmaceutical sciences, 2013, Spa, Belgium.

## 3. Posters

- A design space approach to develop a generic CE method for the separation of 16 antimalarial drugs, C. Lamalle, R.D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, A-C. Servais, J. Crommen, Ph. Hubert, M. Fillet, 9th International Symposium on Drug Analysis - 22th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, Antwerp, Belgium.
- Development of a Generic MEKC Method for the Separation of 15 Antimalarial Drugs by a Design Space Approach, C. Lamalle, R.D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, A-C. Servais, J. Crommen, Ph. Hubert, M. Fillet, 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2011, Budapest, Hungary.
- Generic MEKC method for the separation of 15 antimalarial drugs, C. Lamalle, R.D. Marini, B. Debrus, P. Lebrun, A-C. Servais, J. Crommen, Ph. Hubert, M. Fillet, Recent Development in Pharmaceutical Analysis, 2011, Pavia, Italy.
- Migration behaviour study of charged and uncharged compounds in micellar electrokinetic chromatography systems containing various proportions of SDS micelles and acetonitrile as organic modifier, C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, 27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, 2012, Geneva, Switzerland.

- Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) systems for the separation of mixtures of charged and uncharged compounds, C. Lamalle, A-C. Servais, I. Fradi, J. Crommen, M. Fillet, 19th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques (ITP), 2012, Baltimore, USA.
- L'électrophorèse capillaire micellaire pour la détermination simultanée de l'insuline et de ses analogues dans des formulations pharmaceutiques, C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, 10th Francophone congress on separative sciences, 2013, Paris, France.
- Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography (MEKC), C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, Bologna, Italy.
- Micellar electrokinetic chromatographic method as a tool to detect counterfeiting of insulin formulations, C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, 10th International Symposium on Drug Analysis - 25th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, Liège, Belgium.
- Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography, C. Lamalle, A-C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, 42<sup>nd</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2015, Geneva, Switzerland.



Références des photos utilisées pour la couverture :

[http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c\\_31293/fr/le-fleau-des-faux-medicaments](http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_31293/fr/le-fleau-des-faux-medicaments)

[http://www.memoireonline.com/06/09/2177/m\\_Communication-et-controle-de-la-trypanosomose-animale-africaine--etude-de-cas-des-inte33.html](http://www.memoireonline.com/06/09/2177/m_Communication-et-controle-de-la-trypanosomose-animale-africaine--etude-de-cas-des-inte33.html)

<http://bakuba.eklablog.com/pharmacies-a-lubumbashi-a104079796>

<http://www.lecongolais.cd/produits-medicaux-contrefaits-en-afrique-la-rdc-sengage-a-renforcer-la-lutte-contre-les-crimes-pharmaceutiques/>

<http://theclawsonchronicles.com/2013/03/21/a-week-in-the-bush/>

<http://www.linternaute.com/voyage/ganvie-la-venise-africaine/la-pharmacie-sur-pilotis.shtml>

<http://vanille63.centerblog.net/rub-afrique-du-sud--3.html>

<https://www.robertharding.com/blog/2015/01/22/essaouira-morocco/>

<http://www.saharaatlastours.com/practicalities/>

<http://sofa.travelblog.fr/520825/PHARMACIE/>

<http://tignon.andre.free.fr/report.php?id=525>

<http://www.sheepsheadbites.com/2011/07/local-pharmacists-bilked-medicare-out-of-3-million/>

[http://www.tripadvisor.com/LocationPhotoDirectLink-g298174-i24901828-Yokosuka\\_Kanagawa\\_Prefecture\\_Kanto.html](http://www.tripadvisor.com/LocationPhotoDirectLink-g298174-i24901828-Yokosuka_Kanagawa_Prefecture_Kanto.html)

<http://www.panoramio.com/photo/108091398>

[http://carlson-mn.com/Uganda/Uganda\\_Pictures.html](http://carlson-mn.com/Uganda/Uganda_Pictures.html)

<https://www.pinterest.com/pin/356347389237111639/>

<http://www.telegraph.co.uk/news/health/expat-health/8737945/Expat-guide-to-Brazil-health-care.html>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Ayurveda>





## Abbreviations (Abréviations)

ACN	acetonitrile (acétonitrile)
BGE	background electrolyte (milieu de séparation)
BHA	butylhydroxyanisol (butylhydroxyanisole)
BHT	butylhydroxytoluène (butylhydroxytoluène)
CCD	central composite design (plan composite centré)
CE	capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire)
CZE	capillary zone electrophoresis (électrophorèse capillaire de zone)
DAD	diode array detector (détecteur à barrettes de diodes)
DS	design space (espace de conception)
EOF	electroosmotic flow (écoulement électroosmotique)
FDA	Food and Drug Administration (agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux)
GHRP	growth hormone releasing peptides (peptides libérant l'hormone de croissance)
HPLC	high performance chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
IEF	isoelectric focusing (focalisation isoélectrique sur gel)
IS	internal standard (standard interne)
MEKC	micellar electrokinetic chromatography (chromatographie électrocinétique micellaire)
MeOH	methanol (méthanol)
MS	mass spectrometry (spectrométrie de masse)
N	number of theoretical plates (nombre de plateaux théoriques)
NACE	non-aqueous capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire en milieu non-aqueux)
NaOH	sodium hydroxide (hydroxyde de sodium)
PA	active substance (principe actif)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)
PEG	polyethylene glycol (polyéthylène glycol)
PFOA	ammonium perfluorooctanoate (perfluorooctanoate d'ammonium)
pI	isoelectric point (point isoélectrique)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodécylsulfate de sodium)
$t_{eo}$	migration time of the electroosmotic flow (temps de migration de l'écoulement électroosmotique)
TFA	trifluoroacetic acid (acide trifluoroacétique)
THF	tetrahydrofuran (tétrahydrofurane)
$t_{mc}$	migration time of the micelles (temps de migration des micelles)
WHO/OMS	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)