



HAL
open science

Méthodes d'analyses innovantes et peu polluantes pour le contrôle qualité des médicaments essentiels : application aux antipaludiques

Moussa Yabre

► **To cite this version:**

Moussa Yabre. Méthodes d'analyses innovantes et peu polluantes pour le contrôle qualité des médicaments essentiels : application aux antipaludiques. Autre. Université de Bordeaux; Université Joseph Ki-Zerbo (Ouagadougou, Burkina Faso), 2020. Français. NNT : 2020BORD0246 . tel-03188396

HAL Id: tel-03188396

<https://theses.hal.science/tel-03188396v1>

Submitted on 2 Apr 2021

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

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

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ET DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH KI-ZERBO

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES (ED SC)

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET SANTE (ED2S)

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Moussa YABRE

**Méthodes d'analyses innovantes et peu polluantes pour le contrôle
qualité des médicaments essentiels : application aux
antipaludiques**

Sous la direction de Karen GAUDIN
et de Touridomon Issa SOME

Soutenue le 7 décembre 2020

Membres du jury :

M. BATTU, Serge	Professeur, Université de Limoges	Président et rapporteur
M. VAN ANTWERPEN, Pierre	Professeur, Université Libre de Bruxelles	Rapporteur
Mme NEPVEU, Françoise	Professeur émérite, Université Paul Sabatier	Examinatrice
Mme BONZI, Yvonne	Professeur, Université Joseph Ki-Zerbo	Examinatrice
Mme GAUDIN, Karen	Professeur, Université de Bordeaux	Codirectrice
M. SOME, Touridomon Issa	Professeur, Université Joseph Ki-Zerbo	Codirecteur
Mme FERREY, Ludivine	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Invitée

Titre : Méthodes d'analyses innovantes et peu polluantes pour le contrôle qualité des médicaments essentiels : application aux antipaludiques

Résumé

Le contrôle qualité des médicaments est une étape essentielle de la chaîne de distribution des médicaments. Il garantit leurs fiabilités avant leurs utilisations et contribue à la lutte contre les médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. Il est conventionnellement réalisé selon les méthodes des monographies des pharmacopées. Ces méthodes se caractérisent souvent par la complexité de leur mise en œuvre et des temps longs consacrés à leurs réalisations. Surtout, ces méthodes nécessitent souvent l'utilisation de réactifs et solvants toxiques pour le personnel de laboratoire et l'environnement.

L'objectif de ce travail est de contribuer à l'amélioration du contrôle qualité des médicaments à travers le développement de méthodes d'analyses peu polluantes et de mise en œuvre facile et faisable dans les laboratoires dont ceux à ressources limitées. Il s'est agi en particulier de développer des méthodes de chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée avec des phases mobiles à base d'éthanol qui est l'un des solvants les plus verts. Pour faire la preuve de la pertinence de cette approche, des formulations d'antipaludiques à base d'artésunate et d'amodiaquine d'une part, et d'artéméther et de luméfántrine d'autre part, ont été choisis.

La première partie du travail a commencé par une étude de criblage utilisant l'éthanol comme solvant organique afin d'évaluer l'effet de différents paramètres critiques tels que le pH et la nature de la phase stationnaire sur le comportement chromatographique des molécules en termes de symétrie de pic, de rétention et de détection. L'association artésunate/amodiaquine a été choisie comme preuve de concept car il s'agit d'un modèle intéressant impliquant une molécule à caractère acide avec peu de groupements chromophores et une molécule à caractère basique. Les résultats du criblage ont permis d'optimiser différentes méthodes en phase inverse vertes à base d'éthanol permettant d'analyser l'artésunate, l'amodiaquine et leurs impuretés. L'approche « Quality by Design » recommandée par les autorités réglementaires pharmaceutiques et permettant d'obtenir des méthodes plus flexibles et robustes, a été choisie

comme stratégie de développement. Les méthodes ont été ensuite validées selon le guide ICH Q2 (R1), en utilisant la stratégie du profil d'exactitude.

La deuxième partie du travail a consisté à démontrer le potentiel d'un spectromètre proche infrarouge portable et à bas prix, en association avec les outils chimiométriques, dans la détection de médicaments falsifiés. L'analyse a porté sur l'association artémether/luméfantrine qui est l'un des médicaments antipaludiques les plus falsifiés. Malgré sa zone spectrale réduite et sa faible résolution comparativement aux appareils classiques, le spectromètre portable a permis de détecter des médicaments falsifiés ne contenant aucune substance active et d'identifier spécifiquement les différentes marques de comprimés. Les résultats obtenus ont démontré le grand potentiel de ces nouveaux équipements proche infrarouge innovants et à bas prix pour leur utilisation en première ligne dans la détection et la lutte contre les faux médicaments. Afin de mieux interpréter les résultats de l'analyse proche infrarouge, une méthode de chromatographie liquide en phase inverse, verte et rapide a été aussi développée pour doser l'artémether et la luméfantrine dans les comprimés.

Ces différentes approches ont montré qu'il est possible de mettre en œuvre le concept de chimie analytique verte pour le contrôle qualité sans nécessité d'acquisition de nouveaux équipements pour obtenir des méthodes performantes qui respectent la réglementation pharmaceutique.

Mots clés : Contrôle qualité pharmaceutique, chimie analytique verte, chromatographie liquide verte, spectromètre proche infrarouge portable, antipaludiques.

Title: Innovative and green analytical methods for quality control of essential medicines: application to antimalarial drugs

Abstract

The quality control of pharmaceutical products is a key issue in the medicine supply chain. It guarantees the reliability before consumption and contribute to fight against substandard and falsified drugs. It is conventionally performed according to pharmacopeias in which methods are most often long and use harmful reagents for the technical staff and environment.

The objective of this work was to improve the quality control of drugs through the development of green analytical methods easy to implement in laboratories including those with limited resources. It was consisted, particularly, to develop reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods with mobile phases based on ethanol which is one of the best green solvents. Analyzes were applied to the antimalarial combination therapies such as artesunate/amodiaquine and artemether/lumefantrine.

The first part of the study started by a screening phase where impacts of critical parameters, such as mobile phase pH and stationary phase, on compound peak symmetry, retention and detection were investigated. Artesunate/amodiaquine combination therapy, which includes an acidic compound with few chromophores and a basic compound was chosen as proof of concept. Several pH modifiers selected for their ecofriendly character and stationary phases were screened. Based on the screening results, different green RP-HPLC methods using ethanol as organic solvent and allowing to analyze artesunate, amodiaquine and their related impurities were developed. Quality by Design approach, recommended by the pharmaceutical regulatory authorities and allowing to obtain robust methods, was chosen as development strategy. Developed methods were validated according ICH Q2 (R1) guideline by using accuracy profile methodology.

The second part of the study consisted in investigating the qualitative performance of a low-cost handheld near infrared spectrophotometer associated to chemometric tools as screening tool in the identification of falsified drugs. Analysis was performed on artemether/lumefantrine tablets which are one of the most falsified drugs. Despite its limited spectral range and low resolution compared to bench top devices, the handheld device allowed

to detect falsified drugs with no active ingredients and to identify specifically a tablet brand name. This innovated low-cost handheld near infrared spectrophotometer offers a promising performance and could be used as a first line screening tool in the detection and fight against falsified drugs. For a better interpretation of the near infrared results, a green and fast HPLC method was also developed, validated, and used to analyze artemether and lumefantrine in the tablets.

These different approaches demonstrated that green analytical methods could be implemented in the pharmaceutical quality control field without the need of new equipment and with analytical performances in accordance with pharmaceutical requirements.

Keywords: Pharmaceutical quality control, green analytical chemistry, green liquid chromatography, handheld near infrared spectrometer, antimalarial drugs.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encadré, soutenu, encouragé et/ou ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à l'évaluation de cette thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux Professeurs Karen Gaudin et Touridomon Issa Somé, qui ont été les artisans de la conception de ce projet de thèse. Ils ont suivi mes pas depuis mes études de pharmacie en passant par le master jusqu'à la direction de cette thèse. Malgré toutes les difficultés et les incertitudes quant à l'aboutissement de ce travail, ils n'ont ménagé aucun effort pour qu'il soit mené à bien. Je voudrais profiter de l'aboutissement de cette thèse pour leur témoigner toute ma gratitude pour tout ce qu'ils m'ont apporté scientifiquement et humainement.

J'adresse mes sincères remerciements à la Fondation Pierre Fabre pour m'avoir octroyé une bourse d'étude qui a permis de mener à bien ce projet et de contribuer à la formation d'un spécialiste en analyse chimique des médicaments et qui, à l'issue de la thèse, pourra intégrer le corps des enseignants chercheurs du Burkina. Mes remerciements vont également à l'ambassade de France au Burkina pour m'avoir octroyé une bourse de couverture sociale.

Je remercie les Professeurs Serge Battu, Pierre Van Antwerpen et Boubié Guel pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteur malgré leurs multiples occupations.

Je remercie les Professeures Françoise Nepveu et Yvonne Bonzi pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et de contribuer à l'évaluation de ce travail en qualité d'examinatrice.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Ludivine Ferey pour sa participation à l'encadrement de cette thèse. Je lui exprime ma profonde gratitude pour son investissement personnel, ses précieux conseils et sa disponibilité permanente depuis le début de ce projet jusqu'à son aboutissement.

Je remercie le Docteur Abdoul Karim Sakira pour ses précieux conseils et les corrections apportées au manuscrit.

J'adresse mes profonds remerciements à toute l'équipe ChemBioPharm et plus particulièrement à l'équipe du laboratoire de chimie analytique pour m'avoir bien accueilli et fait bénéficier de leurs diverses expériences et compétences durant ces 3 années.

A Christian et Sonia Bouquet, je ne saurais assez leur montrer toute ma gratitude pour tous ces soutiens multiples et multiformes qu'ils m'ont apporté sans ménagement et sans lesquels je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Merci pour la confiance et les encouragements dans mes moments de doutes. Je les remercie également pour leur précieuse relecture du manuscrit.

A Adèle, merci pour tes encouragements, ton soutien et ta patience durant ces 3 années. Trouve dans ce travail l'expression de tout ce que tu représentes pour moi.

Enfin, j'exprime ma profonde reconnaissance à toute ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille et leur encouragement.

Valorisation scientifique de la thèse

Publications

1. Green Reversed-Phase HPLC Development Strategy: Application to Artesunate and Amodiaquine Analysis, **M. Yabré**, L. Ferey, T. I. Somé, O. Mercier, K. Gaudin, *Journal of separation science*, (accepté le 09 octobre 2020). <https://doi.org/10.1002/jssc.202000732>
2. Development of a Green HPLC Method for the Analysis of Artesunate and Amodiaquine Impurities Using Quality by Design, **M. Yabré**, L. Ferey, T.I. Somé, G. Sivadier, K. Gaudin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2020), **90**, 113507. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113507>
3. Green Analytical Methods of Antimalarial Artemether-Lumefantrine Analysis for Falsification Detection Using a Low-Cost Handled NIR Spectrometer with DD-SIMCA and Drug Quantification by HPLC, **M. Yabré**, L. Ferey, A.K. Sakira, C. Bonmatin, C. Fauré, T.I. Somé, K. Gaudin, *Molecules*, (2020), **25**. <https://doi.org/10.3390/molecules25153397>
4. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis, **M. Yabré**, L. Ferey, I.T. Somé, K. Gaudin, *Molecules*, (2018), **23**, 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules23051065>

Communications orales

1. Journées Scientifiques et Portes Ouvertes (JSPO) (Ouagadougou, Burkina Faso, 28-30 novembre 2019), **M. Yabré**, L. Ferey, T. I. Somé, K. Gaudin, Utilisation de l'approche Quality By Design pour le développement d'une méthode RP-HPLC verte et robuste d'analyse de médicaments essentiels : cas de l'association amodiaquine / artésunate.
2. 1^{ère} Ecole thématique du Club Jeunes de l'Association Francophone des Sciences Séparatives (AFSEP), (Saint-Martin-de-Londres, France, 12 – 15 mai 2019), **M. Yabré**, L. Ferey, I. T. Somé, K. Gaudin, Développement par Quality By Design d'une méthode RP-HPLC verte et robuste pour l'essai des substances apparentées de la combinaison thérapeutique amodiaquine / artésunate.
3. 11th edition of the Young Scientist Symposium (Pessac, France, 24-25 May 2018), **M. Yabré**, L. Ferey, I. T. Somé, K. Gaudin, Development of green chromatographic methods for the quality control of co-formulated amodiaquine/artesunate drugs.

Communications par voie d'affiches

1. Chimie 2020 (Liège, Belgique, 28-29 janvier 2020), **M. Yabré**, A. K. Sakira, L. Ferey, P-Y Sacré, R. D. Marini, K. Gaudin, I. T. Somé, Identification of falsified antimalarial drugs using an innovative low-cost portable near infrared spectrophotometer.

2. 13^e Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP (Paris, France. 25 -28 mars 2019), **M. Yabré**, L. Ferey, I. T. Somé, K. Gaudin, Développement en chromatographie verte pour le contrôle qualité des médicaments essentiels : cas de l'association artésunate / amodiaquine. (Flash Poster).

Table des matières

Table des matières.....	xi
Liste des figures	xv
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des abréviations.....	xix
Introduction générale	23
Chapitre 1 : Partie bibliographique	27
I. Contrôle qualité des médicaments	27
1. Définition.....	27
2. Contexte réglementaire.....	27
2.1. Pharmacopées	27
2.2. Lignes directrices ICH.....	28
3. Phénomène des médicaments falsifiés et de qualité inférieure	29
4. Cycle de vie des méthodes analytiques	30
4.1. Sélection d'une méthode.....	30
4.2. Développement d'une méthode	31
4.3. Validation d'une méthode.....	33
II. Le paludisme	40
1. Description.....	40
2. Cycle du paludisme	41
3. Les médicaments antipaludiques	42
4. Contrôle qualité des antipaludiques.....	46
III. Méthodes analytiques vertes	48
III-A. Chimie verte et chimie analytique verte	48
III-B. Techniques de spectroscopie vibrationnelle.....	52
III-C. Les différentes approches pour rendre les méthodes de CLHP vertes.....	55

1. Utilisation de méthodes sans étape de préparation d'échantillons	55
2. Réduction de la consommation de solvants.....	56
2.1. Chromatographie liquide à vitesse élevée	56
2.2. Systèmes miniaturisés de chromatographie liquide.....	58
3. Utilisation de solvants alternatifs (article 1).....	62
1. Introduction	64
2. Alternative organic solvents in RP-HPLC	65
3.1 Ethanol	66
3.2. Propylene Carbonate	74
3.3. Other solvents	75
4. Aqueous mobiles phases	76
5. Micellar liquid chromatography.....	78
6. Ionic liquids as green mobile phase additives.....	83
7. Conclusions	83
References	84
Conclusion du chapitre 1.....	96
Références bibliographiques	97
Chapitre 2 : Stratégie de développement de méthode de CLHP verte : application au dosage d'artésunate et d'amodiaquine.....	111
Contexte du chapitre 2	113
Article 2.....	114
1. Introduction	115
2. Materials and methods.....	117
2.1. Chemicals and reagents	117
2.2. Instrumentation	118
2.3. Analytical conditions	118
2.4. Sample preparations.....	121

2.5. Software.....	122
3. Results and discussion	122
3.1. Screening phase	123
3.2. Application to artesunate and amodiaquine quantification in tablets	129
3.3. Method greenness assessment	133
3.4. Tablet analysis	134
4. Concluding remarks.....	136
References	136
Supporting information	141
Conclusion du chapitre 2.....	144
Chapitre 3 : Développement d'une méthode de CLHP verte d'analyse des impuretés d'artésunate et d'amodiaquine par Quality by Design	147
Contexte du chapitre 3	149
Article 3.....	151
1. Introduction	152
2. Materials and methods.....	155
2.1. Chemicals and reagents	155
2.2. Instrumentation	155
2.3. Analytical conditions	155
2.4. Sample preparation	156
2.5. Software.....	158
3. Results and discussion	159
3.1. Method development and optimization	159
3.2. Method validation.....	167
3.3. Applications.....	172
4. Conclusion	172
References	173

Supplementary data.....	177
Conclusion du chapitre 3.....	182
Chapitre 4 : Approches analytiques vertes pour le contrôle qualité de comprimés antipaludiques à base d'artémether et de luméfantrine.....	185
Contexte du chapitre 4	187
Article 4.....	188
1. Introduction	189
2. Materials and methods.....	190
2.1. Chemicals and reagents	190
2.2. Near-infrared analysis.....	191
2.3. HPLC method	193
3. Results and discussion	195
3.1. Near-infrared analysis.....	195
3.2. HPLC analysis	198
4. Conclusions	206
References	207
Conclusion du chapitre 4.....	212
Conclusion générale et perspectives	215
1. Conclusion générale	215
2. Perspectives	217
Annexe	221

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Cycle de vie des méthodes analytiques suivant l'approche Quality By Design	33
Figure 2. Profil d'exactitude	39
Figure 3. Cycle biologique du Plasmodium.....	42
Figure 4. Pictogramme NEMI.....	50
Figure 5. Pictogramme GAPI	51
Figure 6. Spectromètre proche infrarouge portable et à bas prix.....	54

Chapitre 2

Figure 1. UV spectra; A : HPLC solvents; B : AQ at 0.005 mg/mL in 10 mM formic acid and AS at 0.1 mg/mL in 10 mM formic acid in EtOH.....	117
Figure 2. Comparison of pH modifiers solubilized in water; A : UV spectra; B : Blanks of gradient elution.	125
Figure 3. A : Symmetry factor; B : retention times at different pH values.....	126
Figure 4. PCA of asymmetry factor values at pH 2.7 and 3.2 obtained on the different columns.	128
Figure 5. Chromatograms on the three columns	131
Figure 6. Accuracy profiles for AQ (A, B and C) and AS (D, E and F) on the three selected columns.	133

Chapitre 3

Figure 1. Chemical structures of (a) AS and its main impurities (A, B and C), (b) AQ and its main impurities (1, 2, 3 and 4).	154
Figure 2. Ishikawa diagram for an HPLC method	160
Figure 3. Defect rate maps as function of pH and temperature for different gradient slope ranges.....	164
Figure 4. Chromatograms recorded at the working point	166

Chapitre 4

Figure 1. Artemether-lumefantrine (AL) preprocessed spectra in the 1085–1601 nm range.....	196
Figure 2. Results of the principal component analysis (PCA) applied on the preprocessed data.	197
Figure 3. Data driven soft independent modeling of class analogy (DD-SIMCA) plots..	198
Figure 4. Chemical structures of lumefantrine and artemether.....	199
Figure 5. Chromatograms. (a) Excipient mixture, (b) artemether and lumefantrine at 0.1 and 0.6 mg/mL, respectively. (c) Lumefantrine at 0.012 mg/mL.....	201
Figure 6. National Environmental Methods Index (NEMI) greenness profile of the developed method..	202
Figure 7. Accuracy profile. (a) Artemether. (b) Lumefantrine.....	204
Figure 8. Representative photos of falsified (a) versus genuine (b) Combiart® samples.	206

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Critères de validation selon l'objectif visé par la méthode.....	34
Tableau 2. Les molécules antipaludiques.....	43
Tableau 3. Propriétés physico-chimiques de l'artésunate et de l'artémether	45
Tableau 4. Propriétés physico-chimiques de l'amodiaquine et de la lumefantrine	45
Tableau 5. Les 12 principes de la chimie verte	49
Tableau 6. Les 12 principes de la chimie analytique verte	49
Tableau 7. Quelques exemples de méthodes de CLUHP appliqués à l'analyse pharmaceutique	60
Tableau 8. Quelques exemples de méthodes de chromatographie liquide miniaturisée appliqués à l'analyse pharmaceutique.....	61

Chapitre 2

Table 1. pH values tested during the screening study and composition of green pH modifiers in mobile phases.....	119
Table 2. Stationary phases tested during column screening	120
Table 3. Greenness assessment of the developed method and other HPLC methods reported in the literature for the analysis of artesunate and amodiaquine in pharmaceutical formulations by Analytical Eco-scale, NEMI, and GAPI approaches	135
Table 4. Results of AS and AQ content (%) in tablets.	136

Chapitre 3

Table 1. Coefficients of determination (R^2), p-values to test model significance (ANOVA) and lack of fit of the multiple linear regressions for the 8 CMAs.	163
Table 2. Experimental verification results at the border of the MODR.....	164
Table 3. Validation results of AS impurities.....	169
Table 4. Validation results of AQ impurities	170
Table 5. Column inter-batch repeatability of resolutions	171

Table 6. Column inter-batch repeatability of peak areas	171
---	-----

Chapitre 4

Table 1. Artemether-Lumefantrine (AL) tablets	191
Table 2. Chromatographic parameters of artemether and lumefantrine according to the columns.	200
Table 3. Eco-scale evaluation of the developed method.....	202
Table 4. Validation results of artemether and lumefantrine.....	204
Table 5. Results of the HPLC analysis of AL tablets.	205

Liste des abréviations

AA : acetic acid

ACN : acetonitrile

AcNH₄ : ammonium acetate

ADEAMP : 4-acetamido-2-diethylaminomethylphenol

AL : artemether and lumefantrine

API : active pharmaceutical ingredients

AQ : amodiaquine

AQbD : analytical Quality by Design

AS : artesunate

As : symmetry factor

ATP : analytical target profile

CAD : corona charged aerosol detector

CHMP : centre humanitaire des métiers de la pharmacie

CHPAQ : 7-chloro-4-(4-hydroxyphenylamino)quinolone

CL : chromatographie liquide

CLHP : chromatographie liquide à haute performance

CLHT : chromatographie liquide à haute température

CLUHP : chromatographie liquide à ultra-haute performance

CMA : critical method attributes

CMP : critical method parameters

CQ : chloroquine

CTA : combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine

CTAB : cetyltrimethylammonium bromide

DAD : diode-array detector

DD : data driven

DHA : dihydroartemisinin

DoE : design of experiment

DS : Design Space

EHS : environmental, health, and safety

EPA : United States environmental protection agency

EtOH : Ethanol
FA : formic acid
FID : flame ionization detector
GAC : Green analytical chemistry
GAPI : Green Analytical Procedure Index
HPLC : high-performance liquid chromatography
HTLC : high temperature liquid chromatography
ICH : international conference on harmonisation
ILs : ionic liquids
LC : liquid chromatography
LCA : life cycle assessment
LLOQ : lower limit of quantification
MeOH : methanol
MLC : micellar liquid chromatography
MODR : method operable domain region
MS : mass-spectrometry
MSC : multiplicative scatter correction
NEMI : national environmental methods index
NIR : near-infrared
ODS : octadecylsilyl
OMS : organisation mondiale de la santé
PBT : persistent, bio accumulative, and toxic
PC : principal component
PC dans article 1 : Propylene carbonate
PCA : principal component analysis
PEG : polyethylene glycol
PIR : proche infrarouge
PS-DVB : polystyrene-divinylbenzene
QbD : Quality by Design
QC : quality control
RP : reversed-phase
Rs : resolution

RSD : relative standard deviation

S/N : signal to noise ratio

SDS : sodium dodecyl sulfate

SHWC : superheated water chromatography

SIMCA : soft independent modeling of class analogy

SFSTP : société française des sciences et techniques pharmaceutiques

SPIR : spectroscopie proche infrarouge

SSG : solvent selection guides

SWC : subcritical water chromatography

TEA : triethylamine

UHPLC : ultra-high performance liquid chromatography

ULOQ : upper limit of quantification

WHO : world health organization

Introduction générale

Le contrôle qualité des médicaments est une étape essentielle de la chaîne de distribution des médicaments pour garantir leur fiabilité avant leur utilisation et contribue à la lutte contre les médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. Il est conventionnellement réalisé selon des protocoles analytiques des pharmacopées appelées monographies et des dossiers d'autorisation de mise sur le marché.

Cependant, les méthodes généralement utilisées dans le contrôle qualité des médicaments sont caractérisées souvent par leur long temps d'exécution et la multiplicité de réactifs et solvants toxiques utilisés. Ainsi, elles présentent des risques notables aussi bien pour le personnel de laboratoire que pour l'environnement. En plus de l'usage des réactifs toxiques, ces méthodes se caractérisent souvent par leur complexité de mise en œuvre notamment dans les laboratoires à ressources limitées comme ceux des pays en voie de développement. Pourtant ces pays ont grandement besoin d'un niveau élevé de capacité de contrôle qualité car, sans unités de production de médicaments disponibles, ils importent la très grande majorité de leurs médicaments, de différents circuits de distribution accroissant ainsi le risque d'avoir des médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. L'objectif de cette thèse est de contribuer à l'amélioration du contrôle qualité en développant des méthodes d'analyses vertes, donc peu polluantes, et facilement implantables dans les laboratoires à ressources limitées pour le contrôle des médicaments.

L'utilisation de méthodes analytiques vertes reste limitée dans le domaine pharmaceutique, particulièrement en contrôle qualité. Cela pourrait s'expliquer par le manque de connaissance ou d'expérience dans le développement de méthodes vertes et le coût élevé du renouvellement des équipements pour atteindre des performances élevées. Cependant, les méthodes vertes peuvent être développées même avec des appareils classiques sans requérir à des équipements ou technologies coûteuses, permettant en plus d'obtenir des méthodes moins chères.

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et plus particulièrement la phase inverse est la technique la plus utilisée dans le contrôle qualité aussi bien des matières premières que des formulations pharmaceutiques (identification et dosage des substances actives, caractérisation et quantification des substances apparentées, détermination des produits de dégradation dans le cadre des études de stabilité). Cependant, c'est aussi l'une des techniques

les plus consommatrices de solvants organiques toxiques et génératrices de déchets difficiles à traiter. Cette thèse se focalise essentiellement sur le développement de méthodes de CLHP vertes facilement implantables dans les laboratoires sans qu'aucun changement d'équipement ne soit requis. La stratégie adoptée a consisté à remplacer les solvants organiques classiquement utilisés en CLHP par l'éthanol qui, en plus d'être l'un des solvants les plus verts, est facilement disponible. Le développement a été effectué conformément à la réglementation pharmaceutique afin de montrer l'adéquation des méthodes développées avec les exigences du contrôle qualité pharmaceutique.

Cette approche a été appliquée sur des médicaments essentiels utilisés dans le traitement du paludisme. Ces médicaments sont généralement des bithérapies dont la quantification implique souvent l'usage d'au moins deux méthodes. Le but a été aussi de développer des méthodes uniques permettant d'effectuer l'analyse de ces bithérapies. En outre, les médicaments antipaludiques sont l'une des classes les plus falsifiées notamment dans les pays en voie de développement. Le fait donc de développer des méthodes vertes transférables dans les laboratoires, y compris ceux à ressources limitées, pour le contrôle qualité des médicaments antipaludiques peut contribuer à la lutte contre les médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. Aussi, la capacité d'un spectromètre proche infrarouge, innovant portable et à bas prix, à détecter des médicaments falsifiés, a été évaluée au cours de ce travail.

Ce document de thèse présente l'ensemble des travaux réalisés ainsi que les résultats obtenus. Il comprend 4 chapitres.

Le chapitre 1 est une revue bibliographique et est subdivisé en 3 parties. La première partie aborde le contrôle qualité pharmaceutique avec ses exigences réglementaires et les différentes étapes du cycle de vie des méthodes analytiques. Dans la deuxième partie, le paludisme, les médicaments antipaludiques, et ainsi que la problématique du contrôle qualité de ces médicaments sont décrits. La troisième partie de ce chapitre aborde le concept de la chimie analytique verte et plus particulièrement les différentes stratégies pour rendre une méthode de CLHP plus respectueuse de l'environnement.

Le chapitre 2 est essentiellement une étude de criblage des paramètres critiques pour le développement de méthodes de CLHP vertes. Les analyses portent sur de l'association antipaludique artésunate / amodiaquine. Dans ce chapitre, l'effet de différents paramètres comme le pH de la phase mobile et la nature de la phase stationnaire sur le comportement chromatographique des composés principalement en termes de symétrie de pic et de rétention

est évalué en utilisant l'éthanol comme solvant organique. Différentes phases stationnaires et modificateurs de pH, choisis pour leur caractère vert, sont criblés. Des méthodes sont ensuite optimisées et validées en utilisant l'approche du profil d'exactitude afin de quantifier l'amodiaquine et l'artésunate dans des comprimés.

Dans le chapitre 3 portant également sur l'association artésunate / amodiaquine, l'applicabilité de cette approche de CLHP verte dans une problématique plus délicate du contrôle qualité pharmaceutique à savoir l'essai des substances apparentées, est évaluée. En raison du nombre de molécules à analyser et de leur similarité chimique, le développement a été effectué selon l'approche « *Quality by Design* » (QbD) qui permet d'obtenir des méthodes plus flexibles et robustes.

Dans le chapitre 4, le potentiel d'un spectromètre proche infrarouge (PIR) portable et à bas prix, en association avec les outils chimiométriques, est évalué dans la détection de médicaments falsifiés. L'analyse a porté sur des comprimés à base d'artémether et de luméfantine qui est l'un des médicaments antipaludiques les plus falsifiés. Afin de valider les résultats de l'analyse PIR, une méthode de CLHP verte avec une phase mobile à base d'éthanol a été aussi développée, validée et utilisée pour quantifier l'artémether et la luméfantine dans les comprimés.

Ce document se termine par une conclusion générale qui permet de dresser un bilan des travaux réalisés et de présenter des perspectives.

Chapitre 1 : Partie bibliographique

I. Contrôle qualité des médicaments

1. Définition

Selon la Directive européenne 65/65, un médicament est défini comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. Toute substance ou composition pouvant être administrée à l'homme en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques chez l'homme est également considérée comme médicament » [1]. L'industrie pharmaceutique est l'une des industries les plus réglementées au monde, car les produits pharmaceutiques doivent être sûrs, efficaces et de bonne qualité. Les médicaments doivent être strictement contrôlés et répondre aux spécifications exigées par les autorités de réglementation pharmaceutique [2].

Le contrôle qualité des médicaments est une étape essentielle de la chaîne de distribution des médicaments pour garantir leur fiabilité avant leur utilisation. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), il se définit comme étant la somme de toutes les procédures entreprises pour garantir l'identité et la pureté d'un produit pharmaceutique particulier tout au long de sa production, et au-delà, tout au long de son cycle de vie [3]. Les contrôles effectués sont d'ordres pharmaco-techniques (tests d'uniformité de masse, de friabilité, de désagrégation, de dissolution, viscosité, etc), physicochimiques (essais d'identification, de dosage des substances actives, de détermination des impuretés et produits de dégradation aussi bien dans les matières premières que dans les produits finis) et microbiologiques [4]. Le contrôle qualité étant une exigence réglementaire, sa mise en œuvre est régie par des textes réglementaires parmi lesquels figurent les pharmacopées et les lignes directrices de la Conférence internationale sur l'harmonisation (ICH).

2. Contexte réglementaire

2.1. Pharmacopées

De façon pratique, le contrôle qualité consiste à vérifier la conformité du produit fini et des matières premières qui le composent avec les spécifications définies dans la/les pharmacopée(s) de référence(s). Les pharmacopées sont des ouvrages réglementaires définissant les critères de pureté des matières premières entrant dans la fabrication des

médicaments, des produits finis, et ainsi que les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer le contrôle [5]. Ces pharmacopées fournissent des protocoles analytiques appelés monographies à respecter scrupuleusement. Il existe différentes pharmacopées selon les pays. Les plus importantes sont la pharmacopée européenne applicable aux pays de l'Union européenne, la pharmacopée américaine, la pharmacopée japonaise et la pharmacopée chinoise [6–9]. Leur suivi est indispensable à la fabrication et à la commercialisation des médicaments sur un territoire donné. De plus, il faut respecter les exigences réglementaires du pays où le médicament est exporté.

A côté de ces pharmacopées, il y a la pharmacopée internationale éditée par l'OMS [10]. La pharmacopée internationale est un recueil de recommandations concernant les normes de qualité et les méthodes pour le contrôle des matières premières et des produits finis pharmaceutiques. Il a pour objectif de donner un cadre commun de référence pour aider à l'élaboration de traitements et à la fixation de normes pour les pays qui ne possèdent pas leur propre pharmacopée. Il est destiné à servir de référence par tout Etat membre de l'OMS qui souhaite établir des exigences pharmaceutiques et peut être adapté au contexte de chaque pays [10]. La pharmacopée internationale repose principalement sur les médicaments inclus dans la liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels [11]. Les médicaments essentiels sont définis comme étant des médicaments qui répondent aux besoins de santé prioritaires d'une population [12]. Ils sont sélectionnés en fonction de la prévalence des maladies, de l'innocuité, de l'efficacité et d'une comparaison des rapports coût-efficacité. Dans la pharmacopée internationale, une priorité est donnée aux médicaments essentiels des pays à revenu faible ou intermédiaire (cas des médicaments utilisés dans le traitement du paludisme, de la tuberculose ou du VIH/Sida), qui peuvent ne figurer dans aucune autre pharmacopée, y compris les formes posologiques adaptées aux enfants.

2.2. Lignes directrices ICH

Avec la mondialisation et l'internationalisation des entreprises, l'industriel doit répondre à autant d'aspects réglementaires que de pays et cela peut mener à une multiplication des contrôles [6]. Cette problématique a engendré des discussions entre les différentes instances réglementaires afin de pouvoir développer des normes de qualité pharmaceutique similaires [13]. Cela a abouti à la création du Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH). Il s'agit d'une structure internationale fondée par les autorités de réglementation et les représentants de l'industrie pharmaceutique d'Europe, du Japon et des États-Unis pour discuter des aspects

scientifiques et techniques de l'enregistrement des médicaments [14]. Depuis sa création, en 1990, l'ICH a peu à peu évolué pour s'adapter à la mondialisation croissante du développement des médicaments, sa mission étant de parvenir à une meilleure harmonisation à l'échelle mondiale, dans le but d'assurer le développement et l'enregistrement de médicaments sûrs, efficaces et de haute qualité [13]. Cette harmonisation s'est concrétisée par l'élaboration de lignes directrices ou *guidelines* ICH. Ces lignes directrices font office de recommandations que les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de suivre pour le développement ou la fabrication de leurs médicaments. De nombreuses lignes directrices sont en lien avec la qualité des produits pharmaceutiques parmi lesquels nous pouvons citer les directives ICH Q2 (R1) sur la validation des méthodes analytiques, Q3 sur l'analyse des impuretés des substances actives, Q4 sur l'harmonisation des pharmacopées européenne, américaine et japonaise, Q7 sur les bonnes pratiques de fabrication, Q8 sur le développement pharmaceutique et dans lequel est introduit l'approche de développement systématique appelée « *Quality by Design* » ou qualité par la conception [15].

3. Phénomène des médicaments falsifiés et de qualité inférieure

Le contrôle qualité contribue à la lutte contre le phénomène des médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. Les médicaments de qualité inférieure, aussi appelés produits « non conformes aux spécifications », sont des produits autorisés par l'autorité de réglementation mais qui ne répondent pas aux normes ou spécifications de qualité [16]. Ils résultent d'un défaut de respect des bonnes pratiques de fabrication. Les médicaments falsifiés, quant à eux, sont définis comme étant des produits dont l'identité, la composition ou la source est représentée de façon trompeuse, que ce soit délibérément ou frauduleusement [16]. La falsification peut concerner à la fois les produits de marque et les produits génériques.

Le phénomène des médicaments falsifiés ou de qualité inférieure constitue une sérieuse menace pour la santé publique à l'échelle mondiale, mais surtout pour les pays en voie de développement dans lesquels les systèmes mis en place et les moyens de détection et d'analyse sont peu performants [17]. En effet, un (1) médicament sur dix (10) est de qualité inférieure ou falsifié dans les pays en voie de développement, selon l'OMS [18]. Les moyens de lutte contre ce phénomène reposent sur une approche multidisciplinaire impliquant les professionnels de la santé, la police et la douane. Cependant l'identification et la caractérisation de ces médicaments demeurent une activité essentielle et préalable à toute action de lutte et reposent principalement sur les laboratoires de contrôle qualité.

4. Cycle de vie des méthodes analytiques

Le contrôle qualité, particulièrement les tests physicochimiques, est effectué en utilisant différentes méthodes analytiques, aussi bien titrimétriques qu'instrumentales. Les techniques instrumentales les plus utilisées sont la spectroscopie infrarouge (identification essentiellement), la spectroscopie UV-visible (identification et dosage), la chromatographie sur couche mince (identification et analyse des impuretés), la chromatographie liquide haute performance (CLHP) (identification, dosage, détermination des impuretés ou substances apparentées) [4]. La CLHP est une technique hautement utilisée dans le contrôle qualité des médicaments.

En général, les contrôles doivent être réalisés en suivant scrupuleusement les méthodes décrites dans les monographies des pharmacopées. Cependant, les autorités réglementaires autorisent aussi l'utilisation de méthodes alternatives. Dans ce cas, il est de la responsabilité du laboratoire de démontrer que la méthode utilisée est équivalente à celle de la pharmacopée pour l'usage prévu. Pour cela, le développement et la validation de la méthode doit s'effectuer en respectant les exigences réglementaires en la matière [6].

La mise en œuvre d'une méthode analytique peut se décomposer en quatre grandes étapes généralement successives [19] :

- une phase de sélection où les objectifs et les conditions opératoires initiales sont définis ;
- une phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences ;
- une phase de validation (validation interne/externe) précédée, selon les cas, d'une phase de pré-validation ;
- et enfin une phase d'application en routine, incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

4.1. Sélection d'une méthode

Lors de cette étape, la technique analytique doit être sélectionnée parmi les diverses méthodes physico-chimiques publiées dans la littérature ou maîtrisées par le laboratoire, tout en répondant à l'objectif à traiter [20]. Cette démarche nécessite une bonne expertise de

l'analyste qui devra se baser à la fois sur ses connaissances et son expérience, et ce, dans le respect des exigences des référentiels en vigueur [19]. L'étape de la sélection est critique pour un analyste. En effet, étant le point de départ du développement d'une nouvelle méthode, c'est d'elle que dépendent les autres étapes et plus particulièrement les décisions qui seront prises [21]. De ce fait, il est nécessaire de bien cerner la problématique en vue de définir clairement les objectifs et proposer des solutions appropriées. Un problème mal cerné conduit à des décisions inappropriées, ce qui entraîne une perte de temps, de réactifs et d'argent.

4.2. Développement d'une méthode

La réalisation de cette étape peut se faire au moyen ou non d'un plan d'expériences selon la problématique définie lors de l'étape de la sélection. En effet, en fonction du nombre de paramètres impliqués dans le développement des méthodes d'analyse, il peut être utile et même nécessaire de recourir aux plans d'expériences.

Les plans d'expériences ont pour objectif de fournir à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations pertinentes pouvant expliquer certains effets et de prédire les réponses étudiées [21,22]. Ces informations sont susceptibles de ne pas être obtenues par la méthodologie univariée classique qui fournit des informations uniquement pour le seul facteur étudié, les autres facteurs étant maintenus à un niveau constant. Dans la méthodologie des plans d'expériences, tous les facteurs considérés sont étudiés simultanément. Cela consiste à effectuer les expériences de manière programmée et raisonnée, en faisant varier les niveaux de tous les facteurs à la fois [20]. Les plans d'expériences doivent être combinés à des outils mathématiques et statistiques pour expliquer les phénomènes observés et exploiter les résultats obtenus. En effet, sans une modélisation, les plans d'expériences n'ont aucune valeur informative et sont difficilement exploitables. La modélisation permet d'exprimer la relation entre, d'une part, la réponse (Y) qui le plus souvent, est un paramètre de performance de la méthode analytique, et, d'autre part, les facteurs à étudier ($X_1, X_2, X_3 \dots X_p$) [20,22]. Des logiciels ont été développés à cet effet et permettent de rendre l'analyse plus facile et rapide. Il existe différents types de plans d'expériences qui peuvent être divisés en 2 groupes : les plans de criblage et les plans d'optimisation [23]. Les plans de criblage ou plan de premier degré permettent de sélectionner parmi les facteurs étudiés ceux qui ont une influence significative sur les réponses [23]. Les plans expérimentaux appropriés dans ce cas sont des plans factoriels complets ou fractionnaires à deux niveaux. Une fois les facteurs ayant

une influence réellement significative identifiés, leur optimisation peut alors être envisagée. Les plans d'optimisation ou plans de surface de réponse permettent de prédire, parmi la multiplicité de solutions potentielles, la meilleure solution par rapport à des critères bien définis [21]. Il existe différents plans d'optimisation parmi lesquels peuvent être cités le plan factoriel complet à 3 niveaux, le plan composite centré et le plan de Box-Behnken [23,24].

Une approche de développement utilisant les plans d'expériences est l'approche « *Quality by Design* » (QbD) qui est fortement recommandée par les autorités réglementaires en pharmacie et qui est décrite dans la ligne directrice ICH Q8 [25]. Initialement mis en place pour les procédés de fabrication, le QbD peut être aussi appliqué aux méthodes analytiques (QbD analytique). Il peut être défini comme une approche systématique de développement qui commence avec des objectifs prédéfinis et met l'accent sur la compréhension et le contrôle des méthodes analytiques en se basant sur une science solide et la gestion du risque qualité [26,27]. L'objectif principal du QbD est de définir, grâce à des plans d'expériences, un espace de conception (*design space*) qui est un espace multidimensionnel de robustesse où la qualité de la performance de la méthode est assurée avec un niveau de probabilité élevée [23]. Par cette notion d'espace de conception, le risque associé au développement d'une méthode analytique est évalué. Le QbD permet d'obtenir des méthodes plus flexibles et robustes. Selon l'approche QbD (*Figure 1*), le développement commence par la définition du profil cible analytique (ATP, *analytical target profile*) et des attributs critiques de la méthode (CMA, *critical method attributes*) [26]. L'ATP se définit comme l'ensemble des objectifs et caractéristiques visés par la méthode afin d'être adaptée à l'usage prévu. Quant aux CMA, ce sont les réponses à mesurer (par exemple, résolutions entre les pics chromatographiques) et qui doivent être dans une limite ou plage appropriée afin d'assurer la qualité de la méthode développée, donc de se conformer à l'ATP. Une évaluation du risque de qualité (*quality risk assessment*) est ensuite effectuée pour sélectionner les paramètres critiques de la méthode (CMP, *critical method parameters*) dont la variation a un impact sur les CMA. Un plan de criblage peut être effectué à cette étape pour identifier les paramètres influents. La réalisation d'un plan de surface de réponse associé à une analyse de l'incertitude du modèle de prédiction, permet de déterminer l'espace de conception c'est-à-dire la combinaison multidimensionnelle des CMP où les CMA répondent aux spécifications requises avec une probabilité définie. Enfin, les performances de la méthode doivent être validées sur un ou plusieurs points de l'espace de conception et sont assorties d'une stratégie de contrôle permettant leur vérification continue lors de l'utilisation de la méthode analytique en routine [28]. Le QbD couvre ainsi toutes les étapes du cycle de vie des méthodes.

Cette stratégie de développement est de plus en plus utilisée dans le développement de méthodes de criblage de substances actives [29–32] ou d'analyses des impuretés et produits de dégradation de principes actifs [26,27,33,34].

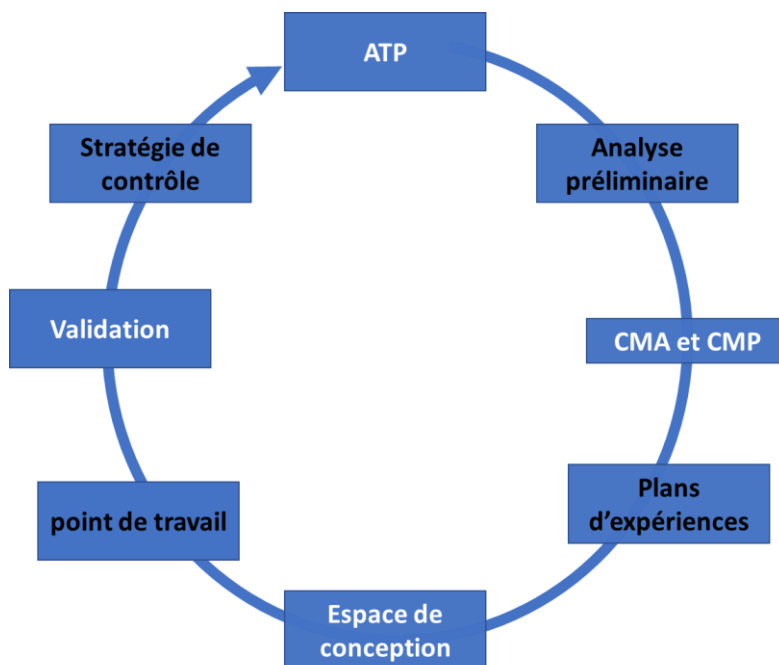


Figure 1. Cycle de vie des méthodes analytiques suivant l'approche Quality By Design. ATP : profil cible analytique, CMA : attributs critiques de la méthode, CMP : paramètres critiques de la méthode.

4.3. Validation d'une méthode

La méthode analytique, une fois développée et optimisée, doit être validée afin de montrer qu'elle correspond à l'usage attendu et fournit des résultats fiables. La validation peut se définir comme étant l'ensemble des opérations effectuées en vue de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et pour l'usage prévu [35]. La validation des méthodes analytiques, dans le secteur pharmaceutique, est régie, par des textes réglementaires tels que la ligne directrice ICH « Q2 (R1), validation of analytical procedures : Text and methodology » [36].

4.3.1. Critères de validation [4,36]

Selon l'ICH Q2 (R1), les critères de validation à considérer sont : la spécificité, la linéarité, l'intervalle de mesure, l'exactitude, la fidélité, les limites de quantification et de détection. Le *Tableau 1* présente les différents paramètres en fonction de l'objectif de la méthode.

Tableau 1. Critères de validation selon l'objectif visé par la méthode

PARAMETRE DE VALIDATION	Type de procédure analytique			
	IDENTIFICATION	ESSAI DE PURETE		DOSAGE
		quantitatif	limite	
Spécificité	OUI	OUI	OUI	OUI
Linéarité	NON	OUI	NON	OUI
Gamme	NON	OUI	NON	OUI
Exactitude	NON	OUI	NON	OUI
Fidélité :				
Répétabilité	NON	OUI	NON	OUI
Précision intermédiaire	NON	OUI	NON	OUI
Reproductibilité	NA	NA	NA	NA
Seuil de détection	NON	NON	OUI	NON
Seuil de quantification	NON	OUI	NON	NON

NA : non applicable

4.3.1.1. Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence des autres composants susceptibles de l'accompagner. Ceux-ci comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradation, la matrice, etc. Par exemple, la spécificité de la méthode peut être vérifiée en montrant que l'ajout des excipients, d'impuretés de synthèse ou de produits de dégradation ne modifie pas la réponse de l'appareil.

4.3.1.2. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité (à l'intérieur d'un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de substance présente dans l'échantillon. Pour établir la linéarité, il convient d'établir un graphique des réponses obtenues en fonction de la concentration ou de la teneur, et de procéder à une évaluation visuelle de ce graphique. Si cet examen montre une relation de type linéaire, ceci doit être confirmé par des méthodes statistiques appropriées en calculant par exemple l'équation de la droite de régression par la méthode des moindres carrés. Le coefficient de

corrélation, la pente de la droite, l'ordonnée à l'origine ainsi que la somme des carrés des résidus peuvent aussi être utiles pour apprécier la qualité de la linéarité. Pour établir la linéarité, il est recommandé d'utiliser au minimum cinq (5) niveaux de concentrations.

4.3.1.3. Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure correspond à l'intervalle (limites inférieure et supérieure incluses) de concentration ou de quantité de substance à analyser (dans l'échantillon) sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées. L'intervalle de mesure découle donc normalement des études de linéarité, d'exactitude et de fidélité. Cependant, des intervalles sont à considérer selon le type d'application auquel est destinée la procédure analytique :

- Pour le dosage d'une substance ou d'un produit fini : de 80 % à 120 % de la concentration d'essai.
- Pour le dosage d'une impureté : de 50 % de la limite spécifiée pour chaque impureté, ou de la limite de quantification si elle est supérieure à cette valeur, à 120 % de la limite spécifiée.

4.3.1.4. Exactitude

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée par la procédure analytique. L'exactitude est parfois confondue avec la justesse. L'exactitude est estimée en utilisant un minimum de neuf déterminations correspondant à trois concentrations. Elle peut être exprimée par le taux de recouvrement exprimé en pourcentage ou par la différence entre la valeur moyenne déterminée par la méthode et la valeur acceptée comme vraie.

4.3.1.5. Fidélité

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité d'une procédure analytique est en général exprimée en termes de variance, d'écart type ou de coefficient de variation d'une série de résultats de mesure. Elle peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. La répétabilité est la fidélité obtenue dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps. La fidélité intermédiaire est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (mesures effectuées à des jours différents, par des analystes différents, avec des équipements différents, etc.). Quant

à la reproductibilité, elle est l'expression de la variabilité interlaboratoire (études collaboratives, généralement conduites aux fins de standardisation de la méthode).

La répétabilité doit être évaluée soit sur la base d'au moins 9 déterminations couvrant l'intervalle de mesure spécifié (par exemple : 3 concentrations avec 3 répétitions pour chaque concentration), soit sur la base d'au moins 6 déterminations à 100 % de la concentration d'essai. L'ampleur des études à effectuer pour évaluer la fidélité intermédiaire dépend des circonstances dans lesquelles il est prévu d'appliquer la procédure analytique. Pour évaluer la fidélité intermédiaire, il faut établir l'effet de différents événements aléatoires sur la précision de la méthode. Les facteurs de variation types à étudier comprennent les variations d'un jour à un autre, d'un analyste à un autre, d'un équipement à un autre, etc. Il n'est pas nécessaire d'étudier individuellement ces effets et l'usage d'un plan d'expériences est conseillé.

4.3.1.6. Limites de quantification et de détection

La limite de quantification d'une méthode est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être quantifiée, dans un échantillon, avec une exactitude et une fidélité appropriées. La limite de quantification intervient dans l'analyse quantitative des substances présentes à faible concentration dans des matrices échantillons. Elle est notamment utilisée pour le dosage des impuretés et/ou des produits de dégradation. Quant à la limite de détection, elle correspond à la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte.

Il existe différentes façons de déterminer les limites de détection et de quantification. Dans le cas des méthodes chromatographiques, l'une d'elles consiste à mesurer le rapport signal/bruit qui est effectuée en comparant les signaux respectivement mesurés avec des échantillons contenant la substance à des concentrations (faibles) connues et avec des blancs, puis en déterminant la concentration minimale à laquelle une quantification ou une détection fiable de la substance est possible. En général, un rapport signal/bruit de 3:1 à 2:1 est acceptable pour la limite de détection alors qu'il faut un rapport signal/bruit de 10:1 pour la limite de quantification.

4.3.1.7. Robustesse

Bien que la robustesse figure dans la directive ICH Q2 (R1), ce critère n'est pas un critère de validation. D'ailleurs il n'apparaît pas dans le *Tableau 1*. La robustesse mesure la capacité d'une méthode à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de facteurs associés à la procédure. Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans

les conditions normales d'application. L'étude de la robustesse est à envisager durant la phase de développement de la méthode en faisant par exemple varier les paramètres retenus pendant l'application de la méthode.

4.3.2. Validation selon la stratégie de l'erreur totale ou du profil d'exactitude

La directive ICH Q2 (R1) définit les critères de validation à respecter mais ne propose pas des approches expérimentales et se limite surtout à des notions générales [20,37]. C'est pourquoi des méthodologies pratiques, respectant ces exigences ICH, ont été développées afin d'aider les analystes à valider leurs procédures analytiques. C'est le cas du premier guide de validation des méthodes analytiques de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP), édité en 1992 [35]. Cependant, cette approche a montré des faiblesses concernant notamment l'interprétation des résultats statistiques. Par exemple, des résultats trop répétables et exacts pouvaient conduire au rejet du critère de validation. Afin de remédier à cela, la SFSTP a publié en 2003 une nouvelle méthodologie basée sur le profil d'exactitude qui repose sur la notion d'erreur totale (biais + écart type) [37].

La stratégie du profil d'exactitude permet d'aligner les objectifs de la validation en fonction des objectifs de la procédure analytique et insiste également sur la validation de la procédure analytique telle qu'elle sera utilisée en routine et fournit une règle de décision simple en utilisant les intervalles de tolérance [38–41].

Cette stratégie fait une différence entre la justesse et l'exactitude. La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série homogène de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. Elle fournit une indication sur les erreurs systématiques et est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif [37]. Quant à l'exactitude, elle est la résultante de la somme des erreurs systématiques (mesurées par la justesse) et aléatoires (mesurées par la fidélité) [28]. Contrairement aux approches traditionnelles qui considèrent de manière dissociée la justesse et la fidélité, la stratégie de profil d'exactitude permet de les associer à travers le concept de l'erreur totale et d'obtenir un outil de décision en fonction des objectifs de la méthode [21].

Le principe de cette stratégie de validation peut être traduite par l'équation :

$$|x - \mu| < \lambda$$

Cette équation stipule que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ) doit être inférieure à la limite d'acceptation (λ) définie *a priori* [38]. La notion de limite d'acceptation introduit un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basées sur l'objectif de la méthode analytique. Communément, la limite d'acceptation est de 1% ou 2 % pour le dosage de substances actives dans une matière première, de 5 % ou 10 % pour les formes pharmaceutiques [21,42].

Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante : $P(|x - \mu| < \lambda) \geq \beta$, avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées *a priori* en fonction des objectifs de la méthode [21]. Le risque associé d'une procédure s'évalue donc par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation. Ainsi, cette stratégie fournit un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode. Le risque associé dépend des estimées du biais et de la fidélité de la procédure analytique.

Elle permet de définir un intervalle de tolérance d'espérance β , pour chaque niveau de concentration, dans lequel on s'attend à ce que chaque résultat futur tombe avec une probabilité définie β . Ainsi, si ces intervalles sont inclus dans la limite d'acceptation ($[-\lambda ; +\lambda]$), la validité de la méthode est prouvée. Le profil d'exactitude (*Figure 2*), construit à partir des intervalles de tolérance permet donc, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Il peut être utilisé aussi pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour l'étalonnage et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que l'intervalle de dosage [20].

Cette stratégie fait aussi une différence entre la notion de linéarité et celle de fonction de réponse. La fonction de réponse traduit la relation existante entre la réponse ou le signal (aire sous la courbe ou absorbance) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. Cette fonction peut être un modèle linéaire ($y = ax$ ou $y = ax + b$) ou non ($y = 1/x$). La linéarité de la fonction de réponse ne doit pas être confondue avec la linéarité de la méthode qui, elle, se définit comme la capacité à obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité en analyte dans l'échantillon [20,37]. Le critère de linéarité se réfère à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la réponse

instrumentale et la concentration. Or cette dernière peut être non linéaire, il importe qu'elle soit monotone.

De façon pratique, l'approche de validation par le profil d'exactitude peut se résumer en six étapes [21] :

- sélection des limites d'acceptation considérant l'usage attendu de la méthode,
- ajustement d'un modèle de régression à partir des standards d'étalonnage,
- calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle d'étalonnage sélectionné,
- détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration,
- calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau β à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire,
- établissement du profil d'exactitude, représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau β et les limites d'acceptation.

La *Figure 2* illustre l'outil de décision graphique que constitue le profil d'exactitude. Ici, les limites d'acceptation sont fixées à $\pm 10\%$ avec une détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration (en bleu) et des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au risque β (en rouge). L'intervalle de tolérance, au risque β , étant inclus dans les limites d'acceptation, la validité de la méthode est démontrée.

Cette méthodologie de validation est de plus en plus utilisée dans le contrôle qualité des produits pharmaceutiques [34,43–49].

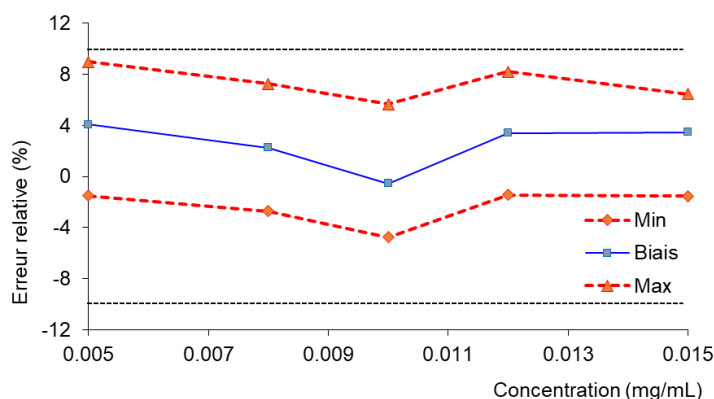


Figure 2. Profil d'exactitude. Les limites de tolérances bilatérales au risque β (en rouge), pour chaque niveau de concentration, étant incluses dans les limites d'acceptation (ici $\pm 10\%$), la validité de la méthode est démontrée.

II. Le paludisme

1. Description

Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par des piqûres de moustiques femelles de l'espèce *Anopheles* infectées [50]. Il existe cinq espèces de parasites responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*. *P. falciparum* est le plus dangereux et responsable de la plupart des formes graves et des décès enregistrés [51]. En 2018, il a été à l'origine de 99,7 % des cas estimés de paludisme dans la région africaine de l'OMS, de 50 % des cas dans la région de l'Asie du Sud-Est, de 71 % dans la région de la Méditerranée orientale et de 65 % dans la région du Pacifique occidental [52].

Le paludisme est une affection fébrile aiguë. Les symptômes apparaissent généralement au bout de 10 à 15 jours après la piqûre de moustique infectante. Les premiers symptômes : fièvre, céphalées et frissons, peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme. En cas de retard de traitement ou d'un traitement inadéquat, le paludisme à *P. falciparum* peut évoluer vers une affection sévère souvent mortelle [50]. Typiquement, trois différents syndromes sont décrits dans les formes de paludisme grave chez l'adulte ou chez l'enfant : syndromes neurologiques, anémie grave et détresse respiratoire [53]. Il est également courant d'observer une insuffisance polyviscérale.

En 2018, on estimait à 228 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde et à 405 000 le nombre de cas de décès imputables à la maladie [50,52]. Les enfants âgés de moins de cinq ans constituent le groupe le plus vulnérable touché par le paludisme. En 2018, ils représentaient 67% des décès imputables au paludisme dans le monde. La région africaine est la plus touchée et regroupe 93% des cas de paludisme et 94% des décès imputables à cette maladie [52].

Les moyens de lutte contre le paludisme comprennent la lutte antivectorielle avec l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides et la pulvérisation d'insecticides à effet rémanent à l'intérieur des habitations, ainsi que les traitements préventifs et curatifs à base de médicaments antipaludiques.

2. Cycle du paludisme

Le paludisme est une maladie avec trois acteurs : le *Plasmodium* ; l'anophèle femelle, agent vecteur et l'homme, hôte réservoir infectant. Le cycle biologique du plasmodium nécessite l'organisme humain, où il se multiplie sous des formes asexuées (phases exo-érythrocytaire et érythrocytaire) et l'organisme de l'anophèle femelle où a lieu la reproduction sexuée (phase sporogonique) (*Figure 3*).

Le cycle de vie du *Plasmodium* s'enclenche dès lors que l'anophèle femelle dont les glandes salivaires contiennent une forme du parasite appelée sporozoïte pique l'homme lors d'un repas sanguin [53]. Le sporozoïte migre rapidement, via la circulation sanguine, vers le foie puis pénètre dans la cellule hépatique (phase exo-érythrocytaire). Il s'y multiplie et se transforme en schizonte extra-érythrocytaire qui, à maturité, libère des milliers de nouveaux parasites : les mérozoïtes. La cellule du foie éclate en libérant ces parasites dans le sang. Ils pénètrent ensuite à l'intérieur des globules rouges (phase érythrocytaire). Dans les hématies, le mérozoïte se différencie en trophozoïte qui grandit et se multiplie pour donner un schizonte intra-érythrocytaire. Ce dernier à maturité éclate avec le globule rouge et libère des mérozoïtes qui vont infecter de nouveaux globules rouges.

Après quelques cycles de réplication des mérozoïtes, des parasites sexués mâles et femelles, appelés gamétocytes, sont formés à l'intérieur des globules rouges. L'anophèle femelle est infecté lors de la piqûre d'un humain infecté possédant des gamétocytes mûrs dans son sang. Chez le moustique (phase sporogonique), les gamétocytes ingérés se transforment en gamètes [54]. Leur fécondation engendre un zygote, qui se différencie en oocyste dans le tube digestif du moustique. Les oocystes produisent des sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires du moustique. Un nouveau cycle peut alors commencer.

Les rechutes tardives de paludisme observées lors d'infections par *P. vivax* et *P. ovale* sont dues à la possibilité pour ces espèces de subsister sous une forme latente ("hypnozoïte") dans la cellule hépatique de l'homme.

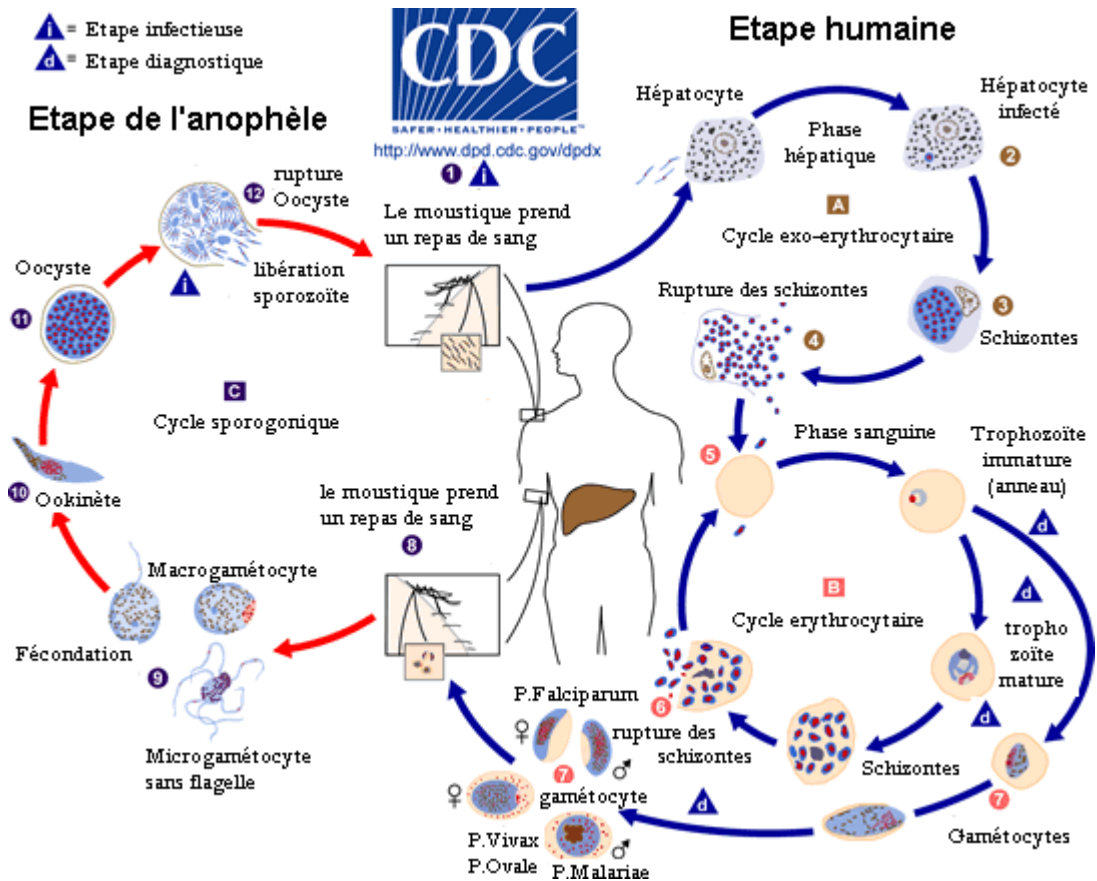


Figure 3. Cycle biologique du Plasmodium (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>). Le cycle biologique se divise en trois phases : la première et la deuxième phase se déroulent chez l'hôte humain : cycle exo-érythrocytaire (hors des cellules sanguines) et cycle érythrocytaire (dans les cellules sanguines) tandis que la troisième phase (cycle sporogonique) a lieu chez le moustique.

3. Les médicaments antipaludiques

La lutte pharmacologique contre le paludisme fait appel à de nombreuses molécules aussi bien à visée préventive qu'à visée curative. Les médicaments antipaludiques peuvent être classés en deux catégories selon leur mode d'action : les schizonticides électifs et les inhibiteurs de l'acide nucléique [53]. Les médicaments principalement utilisés sont les schizonticides capables d'inhiber la prolifération des schizontes du sang ou du foie. Certains en plus ont, soit une action gamétocide, soit une action sporontocide. Le *Tableau 2* résume l'ensemble des molécules utilisées dans le traitement du paludisme [53].

Tableau 2. Les molécules antipaludiques

Catégorie	Groupe chimique	Molécules	Mode d'action/effets
Schizonticides électifs	Amino-quinoléines	4-amino-quinoléine : Chloroquine Amodiaquine Pipéraquline	Activité schizonticide rapide et importante sur les formes sanguines asexuées de <i>P. ovale</i> et <i>P. malariae</i> , ainsi que sur les souches sensibles de <i>P. vivax</i> et <i>P. falciparum</i> . Action au niveau de la détoxification de l'hème
		8-amino-quinoléines : Primaquine	Schizonticides tissulaires, très actives sur formes intra-hépatiques. Effet gamétocytocide sur tous les Plasmodium. Efficace contre les formes hépatiques quiescentes de <i>P. ovale</i> et <i>P. vivax</i>
	Amino-alcools	quinoléines-méthanols : Quinine Mefloquine	Amino-alcools : schizonticides sanguins, interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive du parasite. Quinoléines-méthanols : se concentrent moins que la chloroquine dans la vacuole digestive. Quinine : Gamétocide pour <i>P. malariae</i> et <i>P. vivax</i> , aucune activité sur les gamétocytes de <i>P. falciparum</i> . Méfloquine : active sur les formes sanguines asexuées de tous les Plasmodium et sur les gamétocytes de <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> et <i>P. malariae</i> .
		Phénantrène-méthanol : Halofantrine Dichlorobenzylidine : Lumefantrine	Schizonticides sanguins, Actif sur les formes asexuées de tous les Plasmodium. Mode d'action peu étudié. Semble agir au niveau de la détoxification de l'hème. Existence d'autres sites d'action possibles.
	Sesquiterpènes lactones	Artémisinine et dérivés : Artémisnine Dihydroartémisinine Artésunate Artémether	Grande efficacité sur les souches de <i>P. falciparum</i> résistantes. Interférence avec l'utilisation de l'hémoglobine par libération de radicaux libres en présence du fer héminique, Lyse parasitaire intraérythrocytaire rapide. Egalement inhibition de synthèse protéique plasmodiale. Action gamétocide.
Inhibiteurs de l'acide nucléique	Sulfonamides = Antifoliques	Sulfadoxine, sulfamétopyrazine, Sulfones	Antifoliques et antifoliniques = antifolates : action sur la synthèse des folates, essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques des parasites. Antifoliques : inhibition de la dihydroptéroate synthétase produisant l'acide folique.
	Biguanides	Proguanil chlorproguanil	Antifoliniques : Inhibition de la dihydrofolate réductase produisant l'acide folinique
	Diamino-pyrimidines	Pyriméthamine	
	Naphtoquinones	Atovaquone	Inhibition des fonctions mitochondriales par blocage de la chaîne de transport mitochondrial des électrons au niveau de son enzyme clé, la dihydro-orotate déshydrogénase
Cyclines & Macrolides		Antibiotiques : Inhibition de la synthèse protéique plasmodiale. Activité sur les formes sanguines asexuées de <i>Plasmodium</i> , action sur les formes primaires intra-hépatiques de <i>P. falciparum</i>	

L'artémisinine et ses dérivés constituent une classe de molécules d'origine naturelle très utilisée dans la prise en charge du paludisme dans les pays endémiques. Ce sont des lactones sesquiterpéniques avec un squelette de 1,2,4-trioxane. L'artémisinine est extraite des feuilles d'*Artemisia annua*, un arbuste de la pharmacopée traditionnelle chinoise. Très active sur les souches multi-résistantes de *P. falciparum* [55], son application clinique est, cependant, limitée par sa faible solubilité en milieu aqueux, son temps de demi-vie plasmatique court et sa faible biodisponibilité par voie orale [53]. De ce fait, ses dérivés d'hémisynthèse à temps de demi-vie relativement plus longs et/ou plus actifs et plus efficaces sont plus utilisés. Ces dérivés comprennent la dihydroartémisinine, l'artéméther et l'artésunate.

Afin de faire face à la très grande résistance du *Plasmodium falciparum* aux monothérapies de médicaments antipaludiques comme la chloroquine, l'OMS a mis en place une politique d'associations thérapeutiques pour le traitement du paludisme. L'OMS recommande particulièrement les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) pour traiter le paludisme non compliqué causé par *P. falciparum* [56,57]. Associant 2 principes actifs qui ont des modes d'action différents, les CTA sont les antipaludiques les plus efficaces dont on dispose aujourd'hui. Actuellement, l'OMS recommande 5 CTA contre le paludisme à *P. falciparum* :

- artéméther + luméfantrine
- artésunate + amodiaquine
- artésunate + méfloquine
- artésunate + sulfadoxine - pyriméthamine.
- dihydroartémisinine + pipéraquline

Les associations les plus fréquemment utilisées notamment dans la région africaine sont : artésunate / amodiaquine et artéméther / luméfantrine. Le *Tableau 3* résume les propriétés physico-chimiques de l'artésunate et de l'artéméther tandis que le *Tableau 4* présente celles de l'amodiaquine et de la luméfantrine. L'artéméther est une molécule neutre tandis que l'artésunate présente des propriétés acides. L'amodiaquine et la luméfantrine ont des propriétés basiques et sont riches en groupements chromophores contrairement aux dérivés d'artémisinine.

Tableau 3. Propriétés physico-chimiques de l'artésunate et de l'artémether

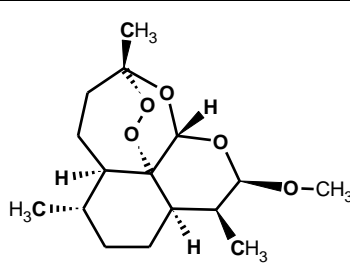
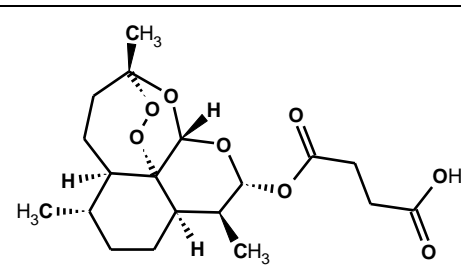
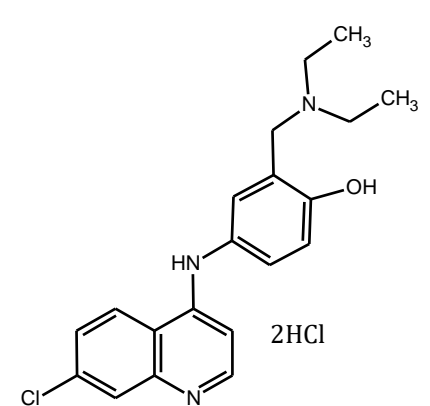
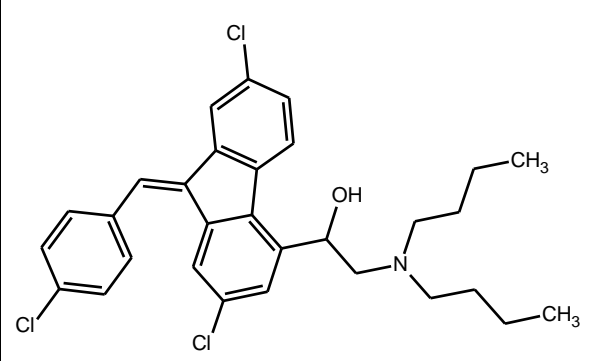
Composé	Structure chimique	Propriétés physicochimiques
Artémether		<ul style="list-style-type: none"> - Poudre blanche cristalline - Pratiquement insoluble dans l'eau et facilement soluble dans l'éthanol - Log P : 3,53 - MM : 298,37 g/mol
Artésunate		<ul style="list-style-type: none"> - Poudre blanche cristalline - Très légèrement soluble dans l'eau et facilement soluble dans l'éthanol - pKa : 4,35 - Log P : 2,61 - MM : 384,42 g/mol

Tableau 4. propriétés physico-chimiques de l'amodiaquine et de la luméfantine

Composé	Structure	Propriétés physicochimiques
Amodiaquine (Chlorhydrate)		<ul style="list-style-type: none"> - Poudre jaune cristalline - Soluble dans l'eau et peu soluble dans l'éthanol - pKa : 9,12 - Log P : 3,70 - MM : 428,86 g/mol
Luméfantine		<ul style="list-style-type: none"> - Poudre jaune cristalline - Pratiquement insoluble dans l'eau et légèrement soluble dans l'éthanol - pKa : 9,76 - Log P : 8,70 - MM : 528,90 g/mol

4. Contrôle qualité des antipaludiques

Les antipaludiques n'échappent pas malheureusement au phénomène des médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. En effet, des études conduites en Afrique Subsaharienne ont montré que 35% des médicaments antipaludiques étaient de mauvaise qualité et que 20% de ces médicaments étaient des falsifications [58]. L'association artémether/luméfantrine constitue l'un des médicaments les plus falsifiés [59].

Le contrôle qualité des médicaments antipaludiques constitue donc une nécessité. Cependant, les méthodes existantes d'analyse de ces médicaments se caractérisent souvent par un temps d'analyse relativement long et une complexité de mise en œuvre, ce qui peut constituer un frein au contrôle qualité. Par exemple, le contrôle qualité de comprimés à base d'artésunate et d'amodiaquine se fait en utilisant plusieurs méthodes impliquant diverses techniques dans la pharmacopée internationale [10]. En effet, le dosage de l'artésunate et de l'amodiaquine dans les comprimés est réalisé par 2 méthodes de CLHP différentes utilisant l'acétonitrile et le méthanol pour l'artésunate et l'amodiaquine respectivement. Aussi, l'essai des substances apparentées (analyse des impuretés) de l'artésunate est effectué par CLHP en utilisant de l'acétonitrile alors que l'analyse des impuretés de l'amodiaquine est réalisée par chromatographie sur couche mince avec l'usage du chloroforme qui est toxique. Dans la littérature, il existe de nombreuses méthodes décrites pour l'analyse des impuretés : soit de l'artésunate [60,61], soit de l'amodiaquine [62,63]. Cependant à notre connaissance, il n'existe aucune méthode publiée pour l'analyse simultanée des impuretés de l'amodiaquine et de l'artésunate. Il serait donc intéressant pour un meilleur contrôle de qualité de disposer d'une méthode unique permettant d'analyser à la fois les 2 molécules et leurs impuretés. Le défi est d'autant plus grand que le développement est effectué en tenant compte des principes de la chimie verte.

Quant à l'association artémether / luméfantrine qui est l'une des plus falsifiées [59], la méthode de la pharmacopée internationale basée sur la CLHP permet d'analyser simultanément les 2 molécules. Cependant la méthode est longue (55 minutes) et emploie l'acétonitrile et un agent d'appariement d'ions (hexanesulfonate) afin d'améliorer la forme du pic de la luméfantrine. Aussi, l'usage d'agent d'appariement d'ions augmente très souvent drastiquement le temps d'équilibration de la colonne chromatographique, entraînant ainsi une consommation élevée de phases mobiles, un temps d'analyse davantage allongé et une durée de vie réduite de la colonne. Il serait donc souhaitable de disposer d'une méthode de

quantification rapide et respectueuse de l'environnement pour cette association. Etant l'un des médicaments les plus falsifiés, il serait aussi intéressant de disposer d'un outil de criblage rapide et de terrain permettant de détecter les falsifications d'artémether et de luméfantrine.

III. Méthodes analytiques vertes

III-A. Chimie verte et chimie analytique verte

C'est au début des années 1990 qu'est apparu le concept de chimie verte encore appelée chimie durable ou chimie écologique. Son but était de concevoir des produits et procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses pour l'homme et l'environnement [64]. Le mot « dangereuses » est pris au sens large, le danger pouvant être physique (substance inflammable, explosive, etc), toxicologique (cancérogène, mutagène, etc) ou global (destruction de la couche d'ozone, changement climatique, etc) [65]. Cette définition de la chimie verte a été ensuite précisée en 1998 par les chimistes américains Paul T. Anastas et John Charles Warner qui ont énoncé les 12 principes de la chimie verte (*Tableau 5*) servant de guide afin d'atteindre les objectifs de la chimie verte [66]. Cela a grandement contribué à l'émergence et à la diffusion de ce concept.

Au sein de la communauté analytique dont les activités impliquent l'usage de nombreux réactifs et solvants dangereux, ainsi que la production de déchets souvent plus toxiques que l'analyte, il y a eu une prise de conscience et de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des méthodes plus respectueuses de l'environnement [64,67,68]. C'est ainsi que la chimie analytique verte a émergé dans les années 2000 avec pour but de réduire ou d'éliminer l'usage de produits chimiques dangereux dans les processus analytiques pour améliorer le respect de l'environnement et de la santé des opérateurs sans pour autant compromettre les performances des méthodes [68,69].

Les 12 principes énoncés par Anastas et Warner s'adaptent davantage aux besoins de la chimie de synthèse et ne tiennent pas compte de certains paramètres importants de la chimie analytique. Afin de remédier à cela, Galuszka et al. ont développé et édité les 12 principes de la chimie analytique verte (*Tableau 6*), plus adaptés aux procédures analytiques [70]. De façon globale, les procédures analytiques peuvent être rendues vertes par l'élimination ou la réduction de l'usage des substances chimiques dangereux (solvants, réactifs, conservateurs, modificateurs de pH, etc), la minimisation de la consommation d'énergie, la bonne gestion des déchets et le renforcement de la sécurité des opérateurs.

Tableau 5. Les 12 principes de la chimie verte

1.	Prévention : mieux vaut éviter de produire des déchets que d'avoir ensuite à les traiter ou s'en débarrasser.
2.	Économie d'atomes : mise en œuvre de méthodes de synthèse qui incorporent dans le produit final tous les matériaux entrant dans le processus.
3.	Conception de méthodes de synthèse moins dangereuses : dans la mesure du possible, les méthodes de synthèse doivent utiliser et produire des substances peu ou pas toxiques pour l'homme et l'environnement.
4.	Conception de produits chimiques plus sûrs : Mise au point de produits chimiques atteignant les propriétés recherchées tout en étant le moins toxiques possible.
5.	Solvants et auxiliaires moins polluants : renoncer à utiliser des auxiliaires de synthèse (solvants, agents de séparation...) ou choisir des auxiliaires inoffensifs lorsqu'ils sont nécessaires.
6.	Recherche du rendement énergétique : la dépense énergétique nécessaire aux réactions chimiques doit être examinée sous l'angle de son incidence sur l'environnement et l'économie, et être réduite au minimum. Dans la mesure du possible, les opérations de synthèse doivent s'effectuer dans les conditions de température et de pression ambiantes.
7.	Utilisation de ressources renouvelables : utiliser une ressource naturelle ou une matière première renouvelable plutôt que des produits fossiles, dans la mesure où la technique et l'économie le permettent.
8.	Réduction du nombre de dérivés : éviter, si possible, la multiplication inutile des dérivés en minimisant l'utilisation de radicaux bloquants (protecteurs/déprotecteurs ou de modification temporaire des processus physiques ou chimiques) car ils demandent un surplus d'agents réactifs et peuvent produire des déchets.
9.	Catalyse : l'utilisation d'agents catalytiques (aussi sélectifs que possible) est préférable à celle de procédés stœchiométriques.
10.	Conception de produits en vue de leur dégradation : les produits chimiques doivent être conçus de telle sorte qu'en fin d'utilisation ils se décomposent en déchets inoffensifs biodégradables.
11.	Observation en temps réel en vue de prévenir la pollution : les méthodes d'observation doivent être perfectionnées afin de permettre la surveillance et le contrôle en temps réel des opérations en cours et leur suivi avant toute formation de substances dangereuses.
12.	Une chimie fondamentalement plus fiable : les substances et leur état physique entrant dans un processus chimique doivent être choisis de façon à prévenir les accidents tels qu'émanations dangereuses, explosions et incendies.

Tableau 6. Les 12 principes de la chimie analytique verte

1.	Utiliser des techniques analytiques directes permettant d'éviter les pré-traitements d'échantillons
2.	Minimiser l'échantillonnage tant en taille qu'en nombre
3.	Préférer les mesures <i>in situ</i>
4.	Utiliser des processus analytiques intégrés économes en énergie et réduisant l'utilisation des réactifs
5.	Préférer les méthodes miniaturisées et/ou automatisées
6.	Eviter les techniques de dérivation
7.	Eviter de générer de large volume de déchets analytiques et assurer une bonne gestion des déchets analytiques
8.	Préférer les méthodes multi-analytes / multi-paramètres au lieu des méthodes analysant seulement un analyte à la fois
9.	Minimiser l'utilisation de l'énergie
10.	Préférer les réactifs provenant de sources renouvelables
11.	Eliminer ou remplacer les réactifs toxiques
12.	Renforcer la sécurité des opérateurs

Le processus de développement de méthodes vertes commence depuis l'étape de préparation d'échantillons jusqu'à la détermination finale. Afin de pouvoir évaluer le caractère vert d'une méthode, différents outils ont été développés. Le plus ancien de ces outils est le « *National Environmental Methods Index* » (NEMI) [67]. L'évaluation NEMI résulte d'un pictogramme facile et rapide à lire comprenant 4 termes (*Figure 4*) :

- « *PBT* » : Les solvants et réactifs utilisés sont-ils classés comme substances persistantes, bio-accumulatives et toxiques (PBT) par l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) ?
- « *Hazardous* » : Les solvants et réactifs utilisés font-ils partie de la liste des substances dangereuses de l'EPA ?
- « *Corrosive* » : Les solutions sont-elles corrosives ($\text{pH} < 2$ ou $\text{pH} > 2$) ?
- « *Waste* » : La quantité de déchets générée est-elle supérieure à 50 g ou mL ?

Chaque terme du pictogramme est coloré en blanc ou en vert selon que le critère correspondant est respecté (vert) ou non (blanc). L'inconvénient majeur de cet outil, est qu'il est qualitatif et qu'en plus, il ne tient pas compte de certains paramètres importants de la chimie analytique verte comme la consommation d'énergie.

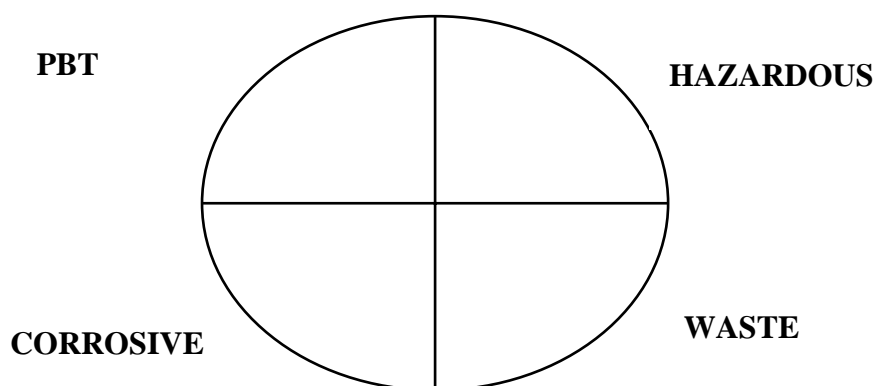


Figure 4. Pictogramme NEMI [67]. PBT : Persistent, bioaccumulative and toxic. Chaque terme du pictogramme est coloré en blanc ou en vert selon que le critère correspondant est respecté (vert) ou non (blanc)

Un autre outil plus quantitatif existe comme l'« *eco-scale* » analytique qui est une approche basée sur la soustraction de points de pénalités d'un score initial de 100 points, en considérant la quantité consommée et la dangerosité des réactifs utilisés, la consommation d'énergie, le risque professionnel et la quantité de déchets générée [71]. Plus le score est élevé,

plus la procédure analytique est considérée comme verte. Ainsi, l'aspect vert d'une méthode est idéal si le score est de 100, excellent si le score est supérieur 75, acceptable si le score est compris entre 50 et 75, et enfin inadéquat si le score est inférieur à 50.

Le « *Green Analytical Procedure Index* » (GAPI) est l'outil le plus récent permettant d'évaluer et quantifier, de façon plus approfondie, l'impact environnemental de chaque étape d'une procédure analytique [72]. S'inspirant à la fois du NEMI et de l'« *eco-scale* » analytique, l'évaluation GAPI s'effectue à l'aide de cinq pentagrammes représentant chacun une étape de la procédure analytique (l'échantillonnage, la préparation d'échantillons, les réactifs et solvants utilisés, le type de méthode (direct ou indirect) et l'instrumentation). Au total, 15 paramètres sont étudiés avec des codes couleurs comprenant le vert, le jaune et le rouge selon que l'impact environnemental est faible, moyen ou élevé, respectivement (*Figure 5*). La présentation visuelle de GAPI permet de comparer différentes méthodes et de sélectionner la méthode la plus verte.

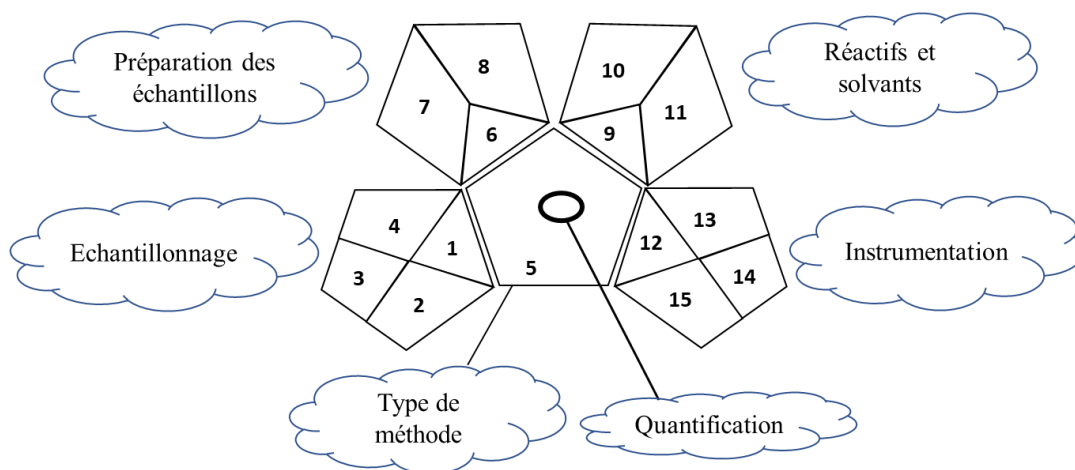


Figure 5. Pictogramme GAPI [72]. Echantillonnage : 1. collection, 2. préservation, 3. transport, 4. stockage, 5. type de méthode (direct ou indirect), préparation des échantillons : 6. type d'extraction, 7. solvants/réactifs utilisés, 8. traitements additionnels, réactifs et solvants : 9. quantité, 10. risque sanitaire, 11. risque pour la sécurité, instrumentation : 12. énergie, 13. risque professionnel, 14. déchets, 15. système de traitement des déchets. Chaque partie est colorée en vert, jaune ou rouge selon que l'impact environnemental du paramètre correspondant est faible, moyen ou élevé, respectivement.

D'un point de vue de la chimie verte, les méthodes analytiques peuvent être divisées en 2 groupes [67]. Le premier groupe concerne les méthodes directes qui sont intrinsèquement vertes car ne nécessitant pas de préparation des échantillons, et ne génèrent donc pas de déchets. C'est le cas des analyses basées sur les techniques de spectroscopie vibrationnelle tels que le Raman ou le proche infrarouge qui sont non destructives et ne requièrent ni réactifs ni d'étapes de préparation des échantillons [73]. Le second groupe est constitué des méthodes qui nécessitent des réactifs et une étape de préparation d'échantillons. C'est le cas des méthodes basées sur des techniques séparatives comme la chromatographie liquide qui est l'une des

techniques les plus consommatrices de solvants organiques. Pour ces techniques, différentes modifications doivent être apportées afin de les rendre autant que possible conformes aux principes de la chimie analytique verte. Ces modifications sont focalisées sur la réduction de la consommation des solvants et réactifs, le remplacement des solvants et réactifs nocifs par des alternatives plus respectueuses de l'environnement et le recyclage. Cette dernière reste peu utilisée dans le domaine analytique. En effet, cela coûte cher et consomme beaucoup d'énergie, ce qui peut d'ailleurs remettre en cause le caractère réellement vert de cette approche [74].

III-B. Techniques de spectroscopie vibrationnelle

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle proche infrarouge (PIR) et Raman sont intrinsèquement vertes car elles sont non destructives et nécessitent peu ou pas de préparations d'échantillons [69]. En outre, elles permettent d'effectuer des analyses rapides (voire en temps réel) et multi paramétriques (un seul spectre PIR ou Raman permet de déterminer simultanément plusieurs paramètres chimiques et/ou physiques).

Le principe de la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) repose sur l'absorption du rayonnement proche infrarouge compris entre 780 et 2500 nm [75,76]. La région spectrale PIR est le domaine des bandes harmoniques et des bandes de combinaisons dues à des liaisons contenant l'hydrogène et d'autres atomes (à savoir, C-H, N-H, O-H ou S-H). Contrairement à la SPIR qui repose sur l'absorption de la lumière, la spectroscopie Raman est basée sur la détection des photons diffusés inélastiquement à la suite de l'interaction de l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique (laser) [77]. La différence de fréquence entre photon incident et photon diffusé permet de renseigner sur la nature chimique de la molécule à l'origine de la diffusion. La spectroscopie Raman est plus sensible aux propriétés chimiques des échantillons alors que la SPIR est davantage influencée à la fois par les propriétés chimiques et physiques [78]. Les deux techniques sont donc complémentaires et sont souvent utilisées ensemble [79].

Il est généralement difficile d'exploiter et d'interpréter directement les données spectrales PIR et Raman. Les spectroscopies PIR et Raman sont classiquement utilisées en association avec les outils chimiométriques qui permettent d'extraire le maximum d'informations pertinentes contenues dans les données spectrales et de pouvoir les interpréter [75]. La chimiométrie est définie comme une discipline chimique qui utilise des méthodes

mathématiques, statistiques et informatiques pour, d'une part, concevoir ou sélectionner des procédures de mesure et des expériences optimales, et d'autre part, extraire le maximum d'informations chimiques à partir des données collectées [75,80]. La chimiométrie contribue à rendre les méthodes plus respectueuses de l'environnement. En effet, en permettant d'accéder à un maximum d'informations à partir d'un seul échantillon, elle limite le nombre d'analyses à effectuer [69]. Les modèles chimiométriques couramment utilisés dans l'analyse proche infrarouge et Raman peuvent être classés en 3 catégories : exploratoires, de classification et de régression [81,82]. Les méthodes exploratoires sont des méthodes qualitatives non supervisées (chaque donnée constituant le modèle est traitée sans lui associer une propriété) et sont utilisées pour la visualisation des données et permettent de mettre en évidence des regroupements ou des tendances parmi ces données. Le modèle chimiométrique le plus utilisé dans les méthodes exploratoires est l'analyse en composantes principales (ACP). Les méthodes de classification sont des méthodes qualitatives supervisées, c'est-à-dire que chaque donnée constituant le modèle est associée à une variable qualitative définissant une classe d'appartenance. Un des algorithmes de classification couramment utilisé est le « *Soft Independent Modelling of Class Analogies* » (SIMCA). Quant aux méthodes de régression, elles permettent d'établir un modèle de calibration entre les données à analyser et une variable quantitative (par exemple la concentration d'un analyte). Une fois le modèle validé, il est alors possible de prédire la concentration de l'analyte dans un échantillon donné. Les méthodes de régression les plus utilisées sont la régression sur composantes principales (*principal component regression, PCR*) et la régression des moindres carrés partiels (*partial least squares regression, PLS*). Généralement, un prétraitement spectral est effectué avant l'application du modèle chimiométrique. Les prétraitements spectraux permettent de minimiser les variations non pertinentes entre les spectres d'un même échantillon et de mettre en exergue l'information recherchée. Les méthodes classiques de prétraitement comprennent la correction de la ligne de base, le centrage de la moyenne, l'élimination de la tendance, la normalisation, le calcul des dérivées première et seconde, le lissage, la mise à l'échelle automatique [83,84].

De nos jours, les spectroscopies PIR et Raman, associée aux outils chimiométriques, sont de plus en plus utilisées dans le contrôle qualité pharmaceutique tant en analyse qualitative (identification des produits et en particulier détection des médicaments falsifiés) qu'en analyse quantitative (détermination de la teneur en substances actives) [48,82,83,85]. A côté des appareils de paillasse, il existe différents appareils portables permettant d'effectuer des analyses sur le terrain [86]. L'inconvénient majeur de ces techniques est leur faible sensibilité ne

permettant pas d'effectuer des analyses à de très faibles concentrations. Aussi, une attention doit être portée au phénomène de fluorescence qui peut survenir lors de analyses Raman et masquer le signal d'intérêt. Enfin, le coût élevé des instruments classiquement commercialisés limite leur utilisation, en particulier dans les laboratoires à ressources limitées. Par exemple, les appareils portables proche infrarouge classiquement utilisés, bien que moins coûteux que les appareils de paillasse, ont des prix généralement compris entre 14000 et 40000 €, ce qui reste prohibitif pour les laboratoires à faible budget [87]. Heureusement, il est apparu, récemment, sur le marché des spectromètres PIR portables et à bas prix (moins de 1000 €), pouvant être pilotés par un smartphone, une tablette ou un ordinateur via port USB ou Bluetooth (*Figure 6*). Malgré leur faible coût, ces appareils portables peuvent offrir des performances prometteuses comparables aux instruments classiques [78].



Figure 6. Spectromètre proche infrarouge portable et à bas prix (136 g, 82 x 63 x 40 mm)

III-C. Les différentes approches pour rendre les méthodes de CLHP vertes

La CLHP est la technique de choix depuis de nombreuses années pour évaluer la composition et la pureté chimique des substances et des produits pharmaceutiques, et est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, de la recherche et développement aux laboratoires de contrôle qualité [2]. En contrôle qualité, elle est souvent couplée à un spectrophotomètre UV-visible pour la détection. La grande majorité des méthodes de CLHP utilisées en contrôle qualité est basée sur le mode à polarité de phases inversée. La CLHP est aussi l'une des techniques les plus consommatrices de solvants organiques toxiques et génératrices de déchets [88]. En effet, l'acétonitrile et le méthanol qui sont habituellement utilisés dans la composition des phases mobiles en CLHP à polarité de phases inversée sont reconnus dangereux pour l'homme et l'environnement du fait de leur toxicité et du traitement difficile de leurs déchets [89]. De nombreuses stratégies ont donc été développées afin de rendre les méthodes d'analyse utilisant la CLHP plus respectueuses de l'environnement. Elles sont basées sur l'utilisation de méthodes sans étape de préparation d'échantillons, la réduction de la consommation de solvants organiques et le remplacement des solvants organiques classiquement utilisés par des alternatives plus vertes.

1. Utilisation de méthodes sans étape de préparation d'échantillons

La préparation d'échantillons est généralement l'étape la plus polluante d'une procédure analytique. La chromatographie liquide (CL) directe permet d'éliminer cette étape en injectant directement les échantillons tels quels [89,90]. Les méthodes chromatographiques sans étape de préparation d'échantillons sont plus respectueuses de l'environnement. En effet, elles permettent d'éviter la consommation de matériaux qui auraient été utilisés lors de la préparation des échantillons y compris les solvants organiques [91]. En outre, la durée totale de l'analyse (de la collecte de l'échantillon à l'obtention des résultats) est considérablement raccourcie. La principale limite de ces méthodes est qu'elles ne sont applicables qu'aux échantillons avec des matrices relativement simples [92], sinon cela entraîne une détérioration rapide de la colonne par les constituants non élués de l'échantillon. Dans la littérature, les applications des méthodes de chromatographie liquide directe, en analyse pharmaceutique, sont limitées à l'analyse de substances actives dans des matrices biologiques [93–96].

2. Réduction de la consommation de solvants

2.1. Chromatographie liquide à vitesse élevée

Bien que cela soit fortement souhaitable, l'élimination des solvants et réactifs toxiques n'est pas toujours possible sans une détérioration significative des performances de l'analyse, notamment en CLHP. Une approche pour rendre cette technique plus respectueuse de l'environnement est de réduire les quantités de solvants consommées, et par voie de conséquence celles des déchets générés, en diminuant les temps de séparation par l'augmentation de la vitesse d'analyse [88].

L'une des stratégies pour réduire les temps d'analyse en CLHP consiste à utiliser des phases stationnaires remplies de particules de taille inférieure à 2 μm . En effet, les colonnes avec des tailles de particules inférieures à 2 μm permettant de travailler à des débits élevés sans perte d'efficacité contrairement aux colonnes avec des particules de taille classique (3,5 et 5 μm) [91]. Ces colonnes permettent donc de diminuer les temps de séparation et les volumes de solvants consommés, sans une détérioration des performances analytiques. Cependant, le principal inconvénient de ces colonnes est la génération de pression élevée incompatible avec les appareils classiques de chromatographie liquide dont la pression maximale supportée est autour de 400 bars voir plus faible [97]. Cet inconvénient peut être surmonté en utilisant des appareils de chromatographie liquide à ultra-haute performance (CLUHP) qui permettent de travailler à des pressions supérieures à 1000 bars [91]. Le travail à haute pression peut générer un chauffage par friction à l'intérieur des colonnes, ce qui peut entraîner une perte de performance en termes d'efficacité en particulier avec les colonnes de diamètre interne supérieur à 3 mm [88]. Ce problème peut être résolu en utilisant des colonnes de diamètre réduit (2,1 mm ou 1 mm), ce qui génère davantage une augmentation de la pression [98]. L'utilisation de chaîne de CLUHP combinée avec des colonnes courtes avec un diamètre interne réduit et des particules de faible taille est reconnue comme étant une approche verte [99]. Cependant ces appareils de CLUHP coûtent chers, ce qui limite leur utilisation dans les laboratoires à ressources limitées. Le *Tableau 7* présente des méthodes de CLUHP développées en analyse pharmaceutique [100–109]. Par exemple, Dongre et al. [100] ont développé et validé une méthode de CLUHP pour l'analyse de la primaquine et de ses impuretés en utilisant une colonne de dimensions : 50 x 2,1 mm, 1,7 μm , à un débit de 0,5 mL/min. Cela a permis de réduire le temps d'analyse à 5 min comparativement à la méthode de CLHP conventionnelle qui utilisait un débit de 1 mL/min avec un temps d'analyse supérieur à 30 min. Dans une autre étude, une

méthode de CLUHP a été développée pour le dosage de l'ébastine et de la phényléphrine dans des comprimés en utilisant une colonne de 1,7 μm de taille de particules [102]. Le caractère vert de la méthode a été ensuite évaluée en utilisant l'outil « *eco-scale* » analytique et comparé à une méthode de CLHP existante. Mohamed et al. [107] ont mis au point une méthode de CLUHP couplée à la spectroscopie de masse pour analyser les antibiotiques sulfadiazine et triméthoprimine dans la viande de bœuf et de poulet avec un temps d'analyse de 2,5 min. Les outils d'évaluation NEMI, GAPI et « *eco-scale* » analytique ont été utilisés pour confirmer le caractère vert de la méthode.

Une autre approche pour de réduire les temps d'analyses est l'utilisation de colonnes remplies de particules partiellement poreuses telles que les particules dites « *fused core* ». Ces particules sont constituées d'un cœur de silice recouvert d'une couche de silice poreuse et présentent de nombreux avantages comme la réduction de la pression, un transfert de masse amélioré et la possibilité d'utiliser des débits élevés sans compromettre l'efficacité [113]. Ces colonnes conservent ainsi les avantages des particules de taille inférieure à 2 μm en termes de rapidité et donc d'économie de solvant sans générer des pressions trop élevées [114]. Par conséquent, elles sont compatibles avec les appareils classiques. Les colonnes monolithiques fonctionnant avec des débits d'éluant élevés réduisent les temps de séparation, tout en préservant les performances analytiques.

Une autre stratégie pour réduire la consommation de solvants consiste à travailler à des températures élevées. En chromatographie liquide à haute température (CLHT), les analyses sont effectuées à des températures supérieures à la température ambiante mais inférieure à celle critique [91]. L'élévation de la température permet d'améliorer l'efficacité tout en réduisant la viscosité des phases mobiles, conduisant à une diminution de la pression de la colonne qui, à son tour, permet l'utilisation de débits élevés et/ou l'utilisation de colonnes remplies de petites particules avec des systèmes de CLHP conventionnels [91,110]. Bien que compatible avec les chaînes classiques, l'utilisation de la CLHT requiert néanmoins un équipement supplémentaire pour le chauffage (systèmes de préchauffage de la phase mobile, de chauffage de la colonne et de refroidissement post colonne) [111]. Des applications de CLHT sont recensées dans la littérature [112]. L'inconvénient majeur de cette approche est que les composés analysés doivent être thermostables.

2.2. Systèmes miniaturisés de chromatographie liquide

La miniaturisation est l'une des tendances récentes dans le domaine de la chimie analytique. Elle se concentre sur la minimisation de l'échelle globale des systèmes analytiques permettant ainsi d'économiser l'usage des solvants [91]. La miniaturisation en chromatographie liquide passe par une réduction importante des dimensions de la colonne. En effet, la réduction du diamètre et de la longueur des colonnes facilite l'utilisation de débits plus faibles, ce qui entraîne une réduction de la consommation de solvant par rapport aux méthodes traditionnelles. Par exemple, l'utilisation d'une colonne de 2 mm de diamètre interne permet de réduire la consommation de solvant d'environ 80% environ par rapport à une colonne standard de 4,6 mm. Une colonne de 1 mm de diamètre permet de réduire jusqu'à 95 % la consommation de solvant par rapport à une colonne standard à la même vitesse linéaire de phase mobile [88]. Les autres avantages des colonnes miniaturisées par rapport aux colonnes conventionnelles sont la consommation d'énergie réduite et le nombre réduit de consommables nécessaires par rapport aux systèmes traditionnels.

Selon le degré de réduction des dimensions de la colonne, on parle de micro-CL (diamètre interne compris entre 0,5 et 1 mm), CL capillaire (diamètre interne compris entre 0,1 et 0,5 mm) et nano-CL (diamètre interne inférieur à 0,1 mm) [115,116]. Cependant, les systèmes miniaturisés de CL nécessitent des adaptations au niveau de l'appareillage afin de minimiser les volumes extra-colonnes [91,117]. Ces ajustements passent par la réduction des volumes de la pompe, de l'injecteur, de la cellule de détection et de toutes les connexions entre l'injecteur et le détecteur. Le *Tableau 8* présente quelques exemples de méthodes de chromatographie liquide miniaturisée appliquée à l'analyse pharmaceutique [116,118–122]. D'Orazio et al. [116] ont développé des méthodes rapides de nano-CL en préparant des colonnes capillaires, de 5 cm de longueur, remplies de silice greffée C18 et de différents diamètres internes (50, 75 and 100 μm). Dans cette étude, des mélanges constitués de huit anti-inflammatoires stéroïdiens et de neuf anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été utilisés comme modèles. Des séparations rapides de moins de 3 min ont été obtenues sur les 3 colonnes capillaires en utilisant des débits inférieurs à 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les meilleurs résultats en termes de facteur de rétention et de sélectivité ont été obtenus avec la colonne de 50 μm de diamètre interne. Dans cette même étude, les mêmes mélanges d'anti-inflammatoires ont été également analysés par micro-CL en utilisant une colonne, disponible dans le commerce, de 1 mm de diamètre interne, 5 cm de longueur et remplie avec une phase stationnaire C18. Les deux méthodes de nano-CL et micro-CL ont été validées et appliquées à l'analyse de formulations

pharmaceutiques à base de dexaméthasone. Salih et al. [118] ont développé une méthode de nano-LC pour le dosage du paracétamol et de la chlorxazone dans des formulations pharmaceutiques en utilisant une colonne de 0,1 mm de diamètre interne préparée au laboratoire avec un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un volume d'injection de 4 nL. Les composés ont été détectés en utilisant une nano-cellule UV de 3 nL. Dans une autre étude, une méthode de chromatographie liquide miniaturisée couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse simultanée de 18 sulfonamides a été développée en utilisant une colonne de 0,1 mm de diamètre, préparée au laboratoire [121]. L'analyse effectuée en gradient, en utilisant un débit de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$, a permis la séparation des composés en 35 min. Les techniques de chromatographie liquide miniaturisée sont particulièrement adaptées pour un couplage avec la spectroscopie de masse. En effet, compte tenu des faibles débits utilisés, elles peuvent être directement couplées avec un spectromètre de masse sans l'utilisation d'un système de « *split* » de débit.

Cependant, ces approches ne permettent pas, en général, la réduction de déchets générés par la préparation d'échantillons, qui reste un poste très consommateur de solvants.

Tableau 7. Quelques exemples de méthodes de CLUHP appliqués à l'analyse pharmaceutique

Composés	Matrice	Colonne	Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps d'analyse (min)	Détection	Reference
Primaquine et ses impurétés		Acquity UPLC BEH C18, (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Acétonitrile/ acide trifluoroacétique 0,01 % (25 :75, v/v)	0,5	5,0	UV 265 nm	[100]
Primaquine et chloroquine	Comprimés	Hypersil C18 (50 x 2,1 mm ; 1,9 µm)	Analyse en gradient : Solvant A, triéthylamine 0,1 % ajusté à pH 3 avec acide phosphorique Solvant B, acétonitrile	0,6	2,0	UV 260 nm	[101]
Ebastine et phényléphrine	Comprimés	Kinetex C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Acide phosphorique 0,1 % / acétonitrile (70:30, v/v)	0,5	5,0	UV 270 nm	[102]
Substances antihypertensives : Olmesartan, irbesartan, telmisartan et azilsartan	Comprimés	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	acétonitrile/méthanol/ tampon ammonium formiate 10 mM (31:30,5:38,5 v/v/v)	0,4	2,0	UV 210 nm	[103]
Substances apparentées de la nicotine		Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Analyse en gradient : solvant A, phosphate 10 mM à pH 8,9; solvant B, acétonitrile	0,6	7,0	UV 260 nm	[104]
Moxonidine et ses produits de dégradation	Comprimés	C18 Hypersil Gold AQ (100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	Méthanol/tampon ammonium acétate 10 mM pH 3,43 (0,9:99,1, v/v)	0,87	10,0	UV 255 nm	[105]
Sitagliptine et metformine	Comprimés	Acquity UPLC BEH C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Analyse en gradient : Solvant A, tampon phosphate 10 mM et 1-hexanesulfonate 2 mM; Solvant B, acétonitrile	0,2	8,0	UV 210 nm	[106]
Sulfadiazine et triméthoprime	Viande de bœuf et de poulet	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm),	Acétonitrile / tampon ammonium acétate pH 5,5 (20:80 v/v)	0,2	2,5	Spectroscopie de masse	[107]
Atovaquone et proguanil	Plasma de rat	Acquity UPLC BEH C18, (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Analyse en gradient : Solvant A, dihydrogenophosphate de potassium 20 mM pH 5,5 ajusté avec acide perchlorique Solvant B, acétonitrile	0,5	2,0	UV	[108]

Sildenafil, nicorandil et arginine	Plasma humain	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Analyse en gradient : solvant A, acétonitrile /méthanol/ TFA 3% / ammonium acétate 0,05 M (15:15:2:68 v/v/v/v) ; solvant B, méthanol	0,4	3,0	Spectroscopie de masse	[109]
------------------------------------	---------------	--	--	-----	-----	------------------------	-------

Tableau 8. Quelques exemples de méthodes de chromatographie liquide miniaturisée appliqués à l'analyse pharmaceutique

Composés	Matrice	Colonne	Phase mobile	Débit (µL/min)	Temps d'analyse (min)	Détection	Reference
Mélanges d'anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens	Comprimés	Colonnes C18 de différents diamètres internes (0,05, 0,075 et 0,1 mm)	Acide formique 0,1 % / acétonitrile 65:35 (v/v) pour les composés stéroïdiens et acide formique 0,1 % / acétonitrile 55:45 (v/v) pour les non stéroïdiens	0,3-1,3	3	UV	[116]
Paracétamol et chlorzoxazone	Comprimés	Colonne monolithique (200 x 0,1 mm)	Acide formique 1 % / acétonitrile 40:60 (v/v)	1,0	7	UV 270 nm	[118]
Kétoprofène, fenoprofène, flurbiprofène, suprofène	Comprimés	Colonne monolithique (150 x 0,1 mm, 2µm)	Tampon phosphate 50 mM pH 7	0,7	6	UV 200 nm	[119]
Carboplatine et nedaplatine	Plasma de rats	Inertsil ODS-3 (150 x 0,3 mm; 3 µm)	Eau/acétonitrile (20 :80, v/v)	5,0	10	UV 254 nm	[120]
18 sulfonamides	Lait	Colonne C18 préparée en laboratoire (250 x 0,1 mm, 3 et 2,6 µm)	Solvant A, eau contenant acide formique 0,1 % Solvant B, acétonitrile contenant acide formique 01 %	0,19	35	Spectroscopie de masse	[121]
Diclofénac et métabolites	Microsomes hépatiques	Integra Hypersil Gold C18 (100 x 0,075 mm, 5 µm)	Solvant A : acide formique 0,1 % Solvant B : acétonitrile contenant acide formique 0,1%	0,3	30	Spectroscopie de masse	[122]

3. Utilisation de solvants alternatifs (article 1)

Une dernière approche pour rendre la CLHP plus respectueuse de l'environnement consiste à remplacer les solvants usuels (acétonitrile et méthanol) par des solvants alternatifs moins toxiques et plus écologiques. Cette approche a l'avantage de pouvoir être mise en œuvre avec des chaînes CLHP classiques donc facile à implémenter dans les laboratoires de contrôle qualité et notamment dans ceux à ressources limitées. L'usage des solvants alternatifs en chromatographie liquide notamment en phase inverse, a fait l'objet d'une investigation particulière qui a été publiée sous la forme d'un article de revue par Yabré et al. en 2018 dans le journal *Molecules*.

Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis

Molecules. 23 (2018) 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules23051065>

Moussa Yabré^{1,2}, **Ludivine Ferey**^{1*}, **Issa Touridomon Somé**², **Karen Gaudin**¹

1 ChemBioPharm Team, ARNA Laboratory, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France

2 Laboratoire de développement du médicament, Université Joseph Ki-Zerbo, Ouaga 03 BP 7021, Burkina Faso

Received 13 April 2018, Accepted 25 April 2018

Keywords: green liquid chromatography; reversed-phase chromatography; alternative solvents; pharmaceutical analysis; ethanol; micellar liquid chromatography; ionic liquids

1. Introduction

The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) is the most widely used analytical tool for pharmaceutical analysis. Indeed, it is the most important technique involved in the quality control of bulk drugs and pharmaceutical formulations (analysis of active pharmaceutical ingredients (API), characterization of impurities, determination of degradation products to test product stability, determination of enantiomeric purity), and also in the determination of drugs and metabolites in biological samples [1]. Most HPLC methods developed in pharmaceutical laboratories are based on the reversed-phase (RP) mode using a hydrophobic stationary phase and a polar mobile phase. In quality control, the main used detection mode is ultraviolet (UV)/Visible detector. Therefore, mobile phase compatibility with this detection is a parameter often taken into account in pharmaceutical analysis development. The mobile phase in RP-HPLC is usually a mixture of water (containing additives to adjust pH and ionic strength) and organic solvent such as acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) [2]. These two solvents are by far the preferred organic solvent used in RP-HPLC because of the remarkable combination of properties favorable for RP-HPLC applications. Among them include complete miscibility with water, relatively low viscosity of their aqueous solutions (especially in the case of ACN), low UV cut-off wavelength (190 nm and 205 nm for ACN and MeOH respectively), availability in the high purity required for HPLC and low chemical reactivity with most sample species as well as with HPLC instrument and column surfaces [2,3].

Despite these remarkable properties, ACN and MeOH present some issues in terms of environmental impact and health safety. Indeed, ACN is flammable, volatile, and toxic. Even if MeOH is less toxic and more easily biodegradable than acetonitrile, it is also ranked as hazardous solvents due to its inherent toxicity and the great requirement of its waste disposal [4,5]. Unfortunately, the amount of waste generated by RP-HPLC analyses cannot be neglected. In fact, one continuously operating liquid chromatograph equipped with a conventional LC column (15-25 cm length, 4.6 mm i.d., packed with 5 μm particles) and a mobile phase flow rate of 1 mL/min produces about 1.5 L of waste per day, meaning about 500 L of effluent per year [3]. Although this volume of waste is small compared to the amount of waste generated by large industrial manufacturing companies, some big pharmaceutical companies use hundreds of liquid chromatographs in their research and development and quality control laboratories, resulting in thousands of liters of toxic waste produced every day. Moreover, the use of HPLC is becoming more and more intensive due to the technological advances allowing high throughput analysis but also increasing, in the same time, the amount of waste produced. These HPLC waste streams containing ACN and MeOH must be disposed as chemical waste, which is costly and adds to the environmental waste-disposal burden of the laboratory.

Regarding the health and environmental issues of organic solvents commonly used in RP-HPLC, greening RP-HPLC methods has received great interest in the analytical community whose aim

is to search new alternatives to replace polluting analytical methods with cleaner ones. Green analytical chemistry (GAC) has emerged from green chemistry since the 2000s [6,7] and has gained increasing attention and acceptance from researchers. Its concept refers to eliminating or reducing hazardous chemicals from analytical processes to improve the environmental and health friendliness without compromising method performance [8].

Based on the 12 principles of green chemistry, some strategies are commonly implemented to achieve greener liquid chromatography methods. They focus on a reduction of solvent consumption through a decrease of column length, internal diameter and/or column particle, the replacement of toxic and hazardous solvents such as ACN and MeOH by less toxic and more environmental friendly alternatives, and the recycling being more important in larger scale preparative separation technologies [3,9]. Chromatographic techniques have the potential to be greener at all steps of the analysis, from sample collection and preparation to separation and final determination. Some strategies for greening chromatographic methods are more efficient than others; therefore, evaluation methods are needed to assess the greenness of analytical methods. Some tools have been developed, the two best-known being the NEMI labelling and the analytical Eco-scale [10–13]. The NEMI labelling results in a pictogram easy to read stating if hazardous or corrosive reagents are used or procedure generates significant amounts of waste [10]. The analytical Eco-scale is a more quantitative approach, based on subtracting penalty points from a total of 100, based on the amount and hazard of reagents, energy consumption, occupational hazards, and amount of waste generated [11].

In the past years, several reviews covered the application of GAC principles to chromatography analysis in general [3,9,14,15] while some focused especially on pharmaceutical analysis [16–19]. Since it is difficult to eliminate the use of organic solvents in RP-HPLC, the better way to make this technique greener is to replace hazardous solvents with more benign ones. Solvent-reduction strategies can also be successfully followed to achieve a method even more ecological. However, an overall reduction in the amount of solvent used and consequently waste generated often implies the purchase of expensive ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) instruments or the development of new technologies. This review will present recent advances in greening RP-HPLC methods dedicated to pharmaceutical analysis through the use of alternative solvents.

2. Alternative organic solvents in RP-HPLC

Mobile phases in RP-HPLC are classically mixtures of water, containing additives to adjust pH and ionic strength, and organic solvent. ACN and MeOH are the two organic modifiers most widely used by HPLC users in RP. Unfortunately, both solvents are ranked hazardous due to their toxic effect and the great importance of safe detoxification of their waste, even if methanol is more environmentally friendly compared to acetonitrile and therefore should be preferred whenever possible [5]. Since it appears difficult to develop a RP-HPLC method without an organic solvent, a strategy to make this

technique greener is to replace acetonitrile and methanol by others less toxic organic solvents to minimize the environmental and health impact. The greenness degree of an organic solvent is assessed based on the environmental, health, and safety criterion (EHS) and the life cycle assessment (LCA) [20]. The EHS assessment is composed of environmental indicators (e.g water and air hazard, and persistency), as well as indicators related to human health (e.g chronic and acute toxicity, and irritation) and safety (stability, reactivity, flammability, explosion, and release potential) hazards. It allows the assessment of possible hazards inherent to the solvent properties. The LCA method is used for a detailed assessment of emissions to the environment as well as resource use over the full life-cycle of a solvent. It includes the production, use, potential recycling, and the disposal. In other words, LCA allows to quantify environmental impacts that are indirectly attributable to the use of a solvent. An organic solvent will be preferable in terms of greenness if it combines good EHS and LCA assessment. Several general solvent selection guides (SSGs) based on EHS only or EHS combined with LCA have been published [20–24]. The SSGs have been mainly developed by pharmaceutical industry companies and they present some differences in the classification of solvents which can be considered as green [23]. These guides have been largely developed to be applied to organic synthesis and thus are not adapted to solvent selection for analytical chemistry applications [25]. The organic solvents commonly accepted as green, and which can be used in RP-HPLC are ethanol, isopropanol, n-propanol, acetone, ethyl acetate, ethyl lactate, and propylene carbonate [25–27].

3.1. Ethanol

3.1.1. Chromatographic properties

Ethanol (EtOH) is one of the greenest organic solvents which makes it a particularly desirable solvent for green liquid chromatography [9]. Compared to ACN and MeOH, EtOH is less toxic and has a lower vapor pressure which leads to less evaporation and consequently to lower inhaled quantities. EtOH is also widely available and less expensive (particularly EtOH 96%) than ACN and MeOH, which promote its use in resource-limited laboratories particularly in developing countries [3]. Moreover, due to its environmentally compatible waste, EtOH has lower disposal costs compared to ACN and MeOH which is advantageous for sensitive areas where chemical-waste disposal is still too expensive.

From a chromatographic point of view, EtOH has similar properties to ACN and MeOH. For example, Miyabe et al. [28] studied adsorption characteristics in RP-HPLC of EtOH/water mixture on octadecylsilyl (ODS)-silica gel column and compared them to corresponding results obtained with MeOH/water and ACN/water mixture based mobile phases. In the three chromatographic systems, they found a similar mechanism of surface diffusion with regard to enthalpy-entropy compensation and linear free-energy relation. Based on this study, quite similar contribution of adsorption mechanism was demonstrated. From this point of view, similar separation mechanism should be expected using these different solvent mixtures. Also, EtOH/water mixtures were evaluated by Ribeiro et al. [29], as reversed-

phase mobile phases on both C8 and C18 columns. They showed that, by substituting ACN or MeOH with EtOH as a green modifier, similar peak efficiency was obtained for the chromatographic separation of a mixture containing neutral and basic compounds. As confirmed later by other investigators, satisfactory performance could be achieved with EtOH [30]. In terms of selectivity, EtOH is in the same group as MeOH according to Snyder's classification of organic solvents, which means that they have similar proton acceptor, proton donor, and dipole moments [2]. Also, EtOH has a higher eluotropic strength, which means that a lower percentage of EtOH than MeOH is needed in the mobile phase for comparable retention times [26].

However, EtOH has two main drawbacks which can hinder its use in RP-HPLC [16]. The first drawback is that the UV cut-off of EtOH (210 nm) is higher than that of MeOH and ACN [2], which can result in an elevated background noise and an important drift of baseline when gradient elution is used, leading to a reduction in sensitivity when UV detection is hyphenated. Nevertheless, the high UV cut-off of EtOH may not be a problem if compounds have strong UV chromophores or if a mass-spectrometry (MS) detection is used. The important number of applications reported in Table 1 proves that this limitation can be overcome. The second drawback comes from the viscosity of EtOH/water mixtures which is higher than that of MeOH/water and ACN/water mixtures for equivalent eluotropic strength at room temperature. Such high viscosity leads to high backpressures thus, limiting the use of EtOH with conventional LC systems (400 bar) [17]. The main strategy to overcome the high pressures generated by viscous mobile phases is the use of UHPLC systems which can support high pressures above 1000 bar. However, even if UHPLC instruments are widely available in the market, these instruments are expensive and thus less accessible to limited resource laboratories.

Another way to overcome the high pressure generated by ethanol-based mobile phases is the use of columns packed with superficially porous particles which are also compatible with conventional LC instruments. The development of columns packed with such particles was considered a breakthrough in column technology since it limits backpressures created and thus allows the use of high mobile phase flow rates while maintaining column efficiencies [31]. The low pressures generated by these columns offer also the possibility of the use of mobile phases with higher viscosity like EtOH/water mixtures.

Performing LC separations at elevated mobile phase temperatures, known as high temperature liquid chromatography (HTLC), is also a way to reduce viscosity of ethanol-based mobile phases. It is well known that temperature of the column affects selectivity, efficiency, and mobile phase viscosity. By increasing the temperature, the viscosity of the mobile phase decreases resulting in reduced backpressures. For example, solvent viscosity can decrease in by about 50% by raising the temperature from ambient (20°C) to about 50°C [32]. Many interesting reviews about HTLC have been published [33–37]. To successfully implement high temperatures in LC a special instrumentation is required such as a mobile phase preheater, a column heater, and a post column effluent cooling system [34]. Although

HTLC brings many advantages, it also has limitations. One of them is the thermal stability of stationary phases. Indeed, for most silica-based columns used in reversed-phase conditions, the maximum allowed temperature should not exceed 60°C [35]. Another limitation is that analyzed compounds must be thermally stable. At the end, the use of high column temperatures induces an increase in energy consumption which is in contradiction with GAC principles [7].

3.1.2. Pharmaceutical applications

Green RP-HPLC methods using ethanol-based mobile phases, have been widely reported for the analysis of drugs in pharmaceutical formulations [38–54] as well as in biological samples [55,56] (*Table 1*). For example, a HPLC/diode-array detector (DAD) method using EtOH as the organic solvent in the mobile phase and an octadecyl-grafted silica column, was developed and validated by our team for the analysis of statins i.e. pravastatin, fluvastatin, and atorvastatin in high concentrated ethanol/water solutions [42]. The mobile phase was composed of ethanol/aqueous solution of formic acid (pH 2.5, 25 mM) (50:50, v/v) at 40°C. During method development, four columns with particle size between 1.9 μm and 3 μm were compared regarding the efficiency using Van Deemter plots. For these acidic compounds, the benefit of keeping efficiency within a large range of flow rate, classically achieved with column with particle size under 2 μm , was not observed with ethanol-based mobile phase compared to acetonitrile one (*Figure 1*). Such loss of efficiency with the flow rate may be a limit of the use of EtOH in some cases.

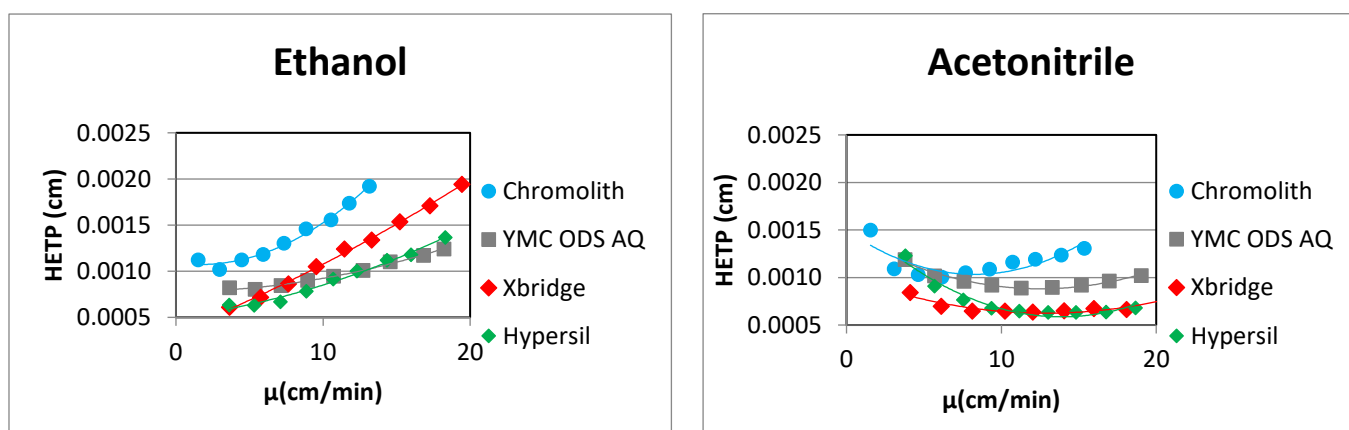


Figure 1: Comparison of Van Deemter curves of atorvastatin obtained using ethanol or acetonitrile in mobile phases. Xbridge BEH Shield RP18 (50 x 4.6 mm i.d., 2.5 μm); Chromolith (SpeedROD RP18, 50 x 4.6 mm i.d., 2 μm); YMC-ODS-AQ (50 x 4.6 mm i.d., 3 μm); Hypersil GOLD (50 x 4.6 mm i.d., 1.9 μm). Isoeluotropic mobile phases: EtOH/formic acid (pH 2.5, 25 mM) in proportions 40/60 (v/v) for YMC column, 38/62 (v/v) for Xbridge and Hypersil columns, 35/65 (v/v) for Chromolith column. Similar to ref [42].

Elzanfaly et al. [45] developed and validated green HPLC methods, with mobile phases composed of ethanol/water mixtures at room temperature, for the analysis of coformulated

pharmaceuticals treating gastrointestinal tract disorders: clidinium bromide/chlordiazepoxide hydrochloride, phenobarbitone/pipenzolate bromide, mebeverine hydrochloride/sulpiride, and chlorphenoxamine hydrochloride/caffeine/8-chlorotheophylline either in their bulk powder or in their dosage forms. The developed methods were compared to the reported conventional HPLC methods and were found to be greener using NEMI assessment [12]. More time- and solvent-saving was reported; hence these new methods can be used for routine analysis of the studied mixtures with a low impact on the environment. In another study, Rojanarata [38] developed a stability-indicating RP-HPLC method for the assay of prednisolone tablets using a mixture of EtOH/water (30:70, v/v) as the mobile phase. The separation was performed at 50°C to overcome the increase in backpressure caused by the high viscosity of EtOH. Also, a green chromatographic method was developed and validated for the simultaneous determination of phenylephrine, paracetamol, and guaifenesin in their ternary pharmaceutical mixture using a mobile phase composed of EtOH and phosphate buffer at pH 7.0 [47]. The separation was carried out on a monolithic column which allows an efficient separation at higher flow rates and consequently, a reduction in the analysis time. Lower quantities of solvent were consumed and thus reduced amount of waste was produced. In another study, our team reported a green RP-HPLC method using a mobile phase composed of EtOH, for stability studies of dextromethorphan [44]. The development was based on an innovative combination of green chemistry and Quality by Design (QbD) concepts to achieve a good quality of the method while minimizing environmental impacts and analyst exposure. It is an example of how chemometrics can be used to aid in the development of green analytical chemistry. Experimental designs were used to identify parameters most affecting method performances and to find finally the optimal operating conditions allowing the best chromatographic separation in terms of resolution between dextromethorphan and its degradation products, peak efficiencies, and solvent consumption. A response surface methodology allowed determining the Design Space (DS) (method operable design region) which was validated experimentally to prove method robustness inside. This method was validated using the concept of total error and used to analyze the main degradation products of dextromethorphan in a pharmaceutical product (*Figure 2*). The greenness of this method was also checked using the analytical Eco-scale tool.

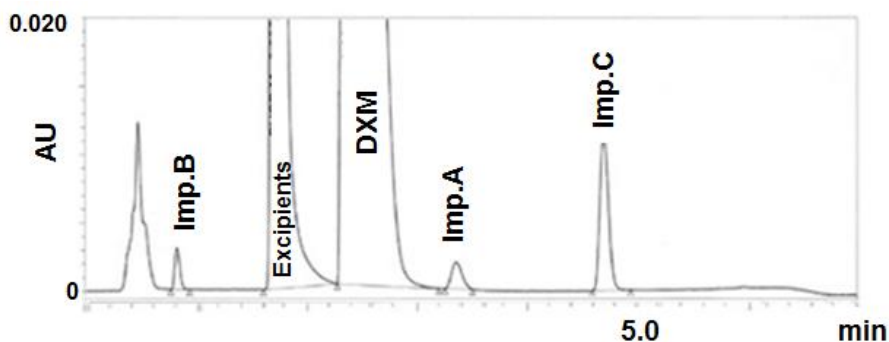


Figure 2: Reversed-phase HPLC chromatogram of a mixture of dextrometorphan, its impurities, and excipients. Acquity BEH C18 column (50 x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m). Gradient elution of ethanol (slope of 3.1 %/min) with 10 mM ammonium formate adjusted at pH 4.7 with formic acid. Flow rate: 0.23 mL/min. Temperature: 38.0°C. Detection at 280 nm. Similar to ref [44].

Another application still in the field of pharmaceutical quality control but this time dealing with multiproduct analysis was recently published [54]. In this study, a specific and robust RP-HPLC method was successfully developed through QbD approach for the simultaneous separation of 16 active pharmaceutical ingredients (among them, artemether without chromophore) using a gradient elution with ethanol as organic modifier. Throughout the study, acetonitrile and ethanol-based mobile phases were investigated and compared. Optimal conditions could be found only with ethanol-based mobile phase showing different selectivity between the two organic solvents (*Figure 3*). As shown in *Figure 3*, at 210 nm a relatively high baseline drift is noticed in gradient mode using EtOH due to its high UV cut-off, however, artemether, a compound without chromophore in its structure can still be detected.

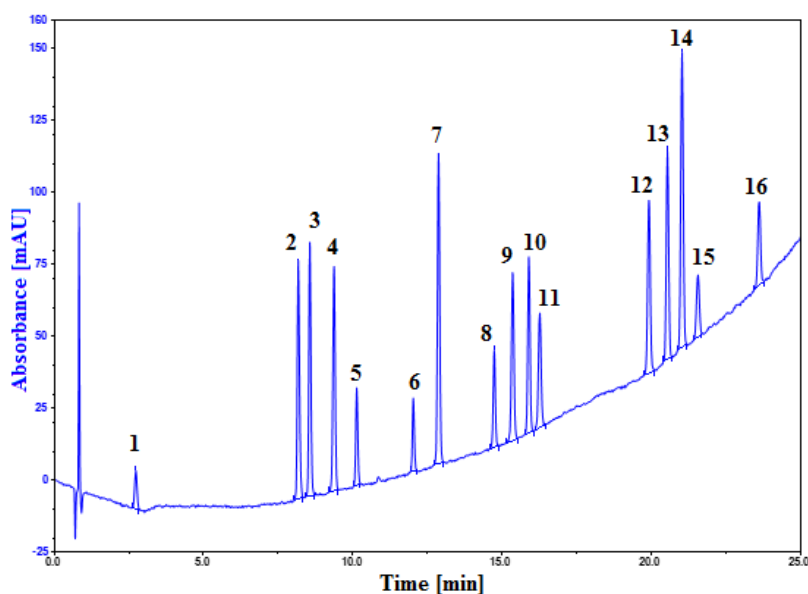


Figure 3: Separation of 16 active pharmaceutical ingredients. Xbridge BEH Shield RP18 column (50 x 4.6 mm i.d., 2.5 μ m). Gradient elution of ethanol from 5% to 80% (slope of 2.57%/min) with acetate buffer 20 mM at pH 4.85. Flow rate: 0.8 mL/min. Temperature: 33.7°C. Detection at 210 nm. Peak identification: 1 = paracetamol, 2 = doxylamine, 3 = ondansetron, 4 = melatonin, 5 = quinine, 6 = metopimazine, 7 = domperidone, 8 = pravastatin, 9 =

ketoprofen, 10 = rosuvastatin, 11 = midazolam, 12 = diclofenac, 13 = atorvastatin, 14 = fluvastatin, 15 = artemether, 16 = simvastatin. Similar to ref [54].

In the field of bioanalysis, there are also some articles dealing with the use of EtOH as a green organic modifier in the mobile phase for the chromatographic analysis of pharmaceutical compounds [55,56]. For example, a HPLC assay was developed and validated by Hassanlou et al. [56] for the determination of capecitabine in human plasma using a C18 reversed-phase analytical column and a mobile phase composed of formic acid solution (pH 3): ethanol (55:45, v/v).

All these studies, using ethanol as organic modifier in RP-HPLC for pharmaceutical analysis, were carried out recently, in the last decade, and deal with quality control and bioanalysis. This highlights an increasing use of ethanol for chromatographic analysis at different stages of the pharmaceutical product lifecycle.

Table 1: Examples of pharmaceutical analysis in RP-HPLC using ethanol-based mobile phases.

Compounds	Matrix	Column	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Temperature (°C)	Detection	Ref
Prednisolone	Tablets	Phenomenex C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/water (30:70, v/v)	0.8	50	UV (254 nm)	[38]
Diltiazem	Topical formulations	C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/H ₃ PO ₄ (pH 2.5) (35:65, v/v)	2	50	UV (240 nm)	[39]
Permethrin Isomers	Pharmaceutical formulations (cream)	C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/H ₃ PO ₄ (pH 3.0) (67:33, v/v)	1	30	UV (215 nm)	[40]
Ampicilline sodium	Powder for injection solution	Zorbax C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/water (40:60, v/v)	0.5	25	UV (210 nm)	[41]
Statins Pravastatin; Fluvastatin; Atorvastatin	Pharmaceutical hydro-alcoholic solutions	ODS-AQ YMC C18 (50 x 4.6 mm, 3 µm)	EtOH/25 mM formic acid (pH 2.5) (50:50, v/v)	1.0	40	UV (238 nm)	[42]
Daptomicin	Lyophilized powder	Zorbax C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/water (55:45, v/v) pH 4.5 with glacial acetic acid	0.6	25	UV (221 nm)	[43]
Dextromethorphan and its impurities	Pharmaceutical products	Acquity BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	Gradient elution of EtOH/10 mM ammonium formate buffer (pH 4.7)	0.23	38	UV (280 nm)	[44]
Mebeverine hydrochloride/ Sulpiride	Coformulated pharmaceuticals	Zorbax SBC18 (75 x 4.6 mm, 3.5 µm)	EtOH/water (94.5:5.5, v/v)	0.8	room temperature	UV (220 nm)	[45]
Chlorphenoxamine hydrochloride/ Caffeine/ Chlorotheophylline	Coformulated pharmaceuticals	Polaris SI (50 x 4.6 mm, 3 µm)	EtOH (100%)	0.4	room temperature	UV (220,4 nm, 270,4 nm, and 276,4 nm)	[45]
Clidinium bromide /Chlordiazepoxide hydrochloride; Phenobarbitone/ Pipenzolate bromide	Coformulated pharmaceuticals	Zorbax SBC18 (75 x 4.6 mm, 3.5 µm)	EtOH/water (50:50, v/v)	0.5	room temperature	UV (210 nm and 220 nm)	[45]
Telmisartan; Hydrochlorothiazide; Amlodipine besylate	Tablets	Intersil ODS-3 C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/20 mM phosphate buffer (pH 7) (70:30, v/v)	0.7	25	UV (240 nm)	[46]
Phenylephrine; Paracetamol; Guaifenesin	Tablets	Onyx Monolithic C18 (100 x 4.6 mm)	Gradient elution of EtOH/phosphate buffer (pH 7)	2	room temperature	UV (220 nm)	[47]

Compounds	Matrix	Column	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Temperature (°C)	Detection	Ref
Cefepime hydrochloride	Lyophilized powder for solution for injection	Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/water (55:45, v/v)	0.5		UV (258 nm)	[48]
Lansoprazole enantiomers		Stainless-steel Chiralpak IC-3 (100 x 4.6 mm)	EtOH/water (50:50, v/v)	1.0	40	UV (210 nm and 280 nm)	[49]
Dapsone	Pharmaceutical preparations	C18	EtOH/formic acid (pH 3) (10:90, v/v)			UV detection	[50]
Caffeic acid	Pharmaceutical products	RP18 XDB Waters (250 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/acetic acid (pH 2.5) (40:60, v/v)	0.7	25	UV (325 nm)	[51]
Ertapenem sodium	Powder for injection solution	Zorbax Bonus-RP (150 x 4.6 mm, 5 µm)	EtOH/0.1% formic acid (20:80, v/v)	1.0		UV (297 nm)	[52]
Rifaximin	Tablets	Eclipse Plus C18 (150 x 4.6 mm)	EtOH/0.1% glacial acetic acid (52:48, v/v)			UV (290 nm)	[53]
16 active pharmaceutical ingredients		Xbridge BEH Shield RP18 (50 x 4.6 mm, 2.5 µm)	Gradient elution of EtOH/20 mM acetate buffer (pH 4.85)	0.8	33.7	UV (210 nm)	[54]
Quetiapine	Rat plasma	Acquity BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	EtOH/water/formic acid (80:20:0.1, v/v/v)	0.3	40	MS/MS detection	[55]
Capecitabine	Human plasma	C18 RP column	EtOH/formic acid (pH 3) (55:45, v/v)	1.0	50	UV (310 nm)	[56]

3.2. Propylene Carbonate

Propylene carbonate (PC), a carbonate ester derived from propylene glycol, was reported as a possible ACN substitution in RP-HPLC [57,58]. It is a polar aprotic solvent mainly used as a reactive intermediate or as an inert solvent in various industries. It is used in degreasing, paint stripping and cleaning applications and as a carrier solvent for topically applied medications and cosmetics.

PC presents several advantages over ACN such as a higher biodegradability, a lower toxicity, and a lower capacity to bio-accumulate, leading to a relatively easy disposal of PC waste [57]. Also, PC has higher boiling point and flashpoint temperatures reducing the risks of accidental fires in laboratories. In addition, PC is commercially available as HPLC grade solvent at reasonable prices. However, PC has two major drawbacks which obviously limit the possibility of a direct transposition from ACN to PC in RP-HPLC [59,60]. The first drawback refers to the low miscibility of PC with water, which is why a third solvent is often added such as MeOH or EtOH. The latter is the best interesting candidate due to its green characteristics. The second problem comes from the high density and viscosity of PC causing high pressure drops in the chromatographic system. The backpressure will increase even more if EtOH is used as the ternary solvent.

Some applications of PC in RP-HPLC have been reported for the determination of active substances in pharmaceutical formulations, but most of them used MeOH as ternary solvent [57,58,61–63]. Nevertheless, Tache et al. [59] studied the possibility to substitute ACN by PC and EtOH mixtures in RP-HPLC. Three series of compounds have been analyzed, including acidic (fenofibric, lovastatic, and simvastatic acids), neutral (toluene, fluorene, fluoranthene) and basic (carbamazepine, diltiazem, nicergoline) compounds. Through a systematic study, they showed that such approach could be greener for pharmaceutical applications without any major impact in terms of elution order, chromatographic separation, efficiency, and peak symmetry. Moreover, the study of thermodynamic parameters showed that partition of analytes between the mobile and stationary phases was similar for both solvent systems. However, the most important difference is a lower mass transfer of analytes using PC-based mobile phases, so that optimal flow rates were found lower compared to acetonitrile-based mobile phases, increasing analysis time. Also, the limited miscibility of PC and pressure drop should be taken into account.

Acetonitrile replacement by PC/EtOH mixtures has also been applied to bioanalytical applications by Cheregi et al. [60]. A LC/MS-MS assay of enalapril and enalaprilat in human plasma was developed and similar chromatographic performance was achieved using this green approach compared to the reference one. Also, Dogan et al. [64] developed and validated green bioanalytical HPLC methods for voriconazole and tadalafil analysis using a mobile phase composed of a mixture of PC and EtOH as organic modifiers.

Finally, PC appears to have the same advantages as EtOH with the additional disadvantage coming from its limited miscibility with water. Indeed, the use of PC implies a ternary mobile phase leading to more difficult developments. It may explain the lower number of applications found with PC compared to EtOH.

3.3. Other solvents

3.3.1. Acetone

Acetone is another greener substitute to ACN in RP-HPLC applications due to its low toxicity and its biodegradability properties. Acetone shares similar physicochemical characteristics as ACN in terms of solubility and miscibility properties with other solvents including water. Indeed, acetone is in the same group as ACN in Snyder et al.'s classification [2]. In addition, they present similar viscosities (0.37 mPa.s for ACN and 0.33 mPa.s for acetone at 20°C) [26]. The main drawback of acetone compared to ACN is its high UV cut-off which reaches 340 nm, limiting its use with UV detection [9]. Moreover, acetone is highly volatile and therefore difficult to pump. However, the fast popularization of MS-based detectors in LC and the new generation of aerosol-based LC detectors offer new opportunities for the usage of acetone in RP-HPLC.

The possibility of effectively substituting ACN with acetone was investigated by Funari et al. [65]. In this study, a RP-HPLC method with the double detection UV and corona charged aerosol detector (CAD) was developed to fingerprint a complex plant extract. Based on the design of experiments, the methods using ACN or acetone were successfully optimized and compared. The same performance of separation and detection was noticed with both solvents using CAD detector. The number of detected peaks and peak capacity were proved to be statistically similar. However, the superiority of acetone was evidenced when parameters related to method greenness were taken into account. Moreover, there are some reports on satisfactory replacement of ACN with acetone in RP-HPLC employing mass spectrometer detectors in the analysis of peptides [66,67]. However, as UV remains the most widespread detector in pharmaceutical analysis, acetone is clearly not the favorite green solvent to replace ACN in RP-HPLC.

3.3.2. Ethyl lactate

Ethyl lactate is industrially produced as a racemic mixture from the reaction of EtOH with lactic acid, wherein water is the sole by-product. Thus, ethyl lactate has been well recognized as an environmentally benign solvent that possesses unique advantages such as low production cost, nontoxicity (used as an additive in the food industry), high biodegradability, and excellent miscibility with water and others organic compounds [68].

Ethyl lactate has been studied as an environmentally friendly organic modifier to be used in HPLC mobile phases [27,69]. For example, Judge et al. [69] showed that a mobile phase composed of

87% water, 10% ethyl lactate, and 3% acetic acid allowed a baseline separation of three standard pharmaceutical analytes (acetaminophen, caffeine, and acetylsalicylic acid) on a standard C18 column at a temperature of 60°C under three minutes. However, the use of ethyl lactate has some major drawbacks limiting its use in RP-HPLC such as its chemical stability when using acidic or alkaline conditions in the mobile phases, its cut-off wavelength significantly much higher than that of ACN, its lack of availability on the market in a chromatographic grade, and its viscosity even if it produces pressure drops compatible with conventional LC instruments [27].

3.3.3. Ethyl acetate

Ethyl acetate is another green solvent which can be used in mobile phases to replace ACN and MeOH [26]. However, this solvent has some drawbacks such as its high UV cut-off wavelength (256 nm), its low miscibility with water, and its chemical instability particularly with acids and bases [2,26]. Despite these limits, an environmentally benign RP-HPLC method with a mobile phase composed of 100% ethyl acetate was developed and validated by Haq et al. [70] for the analysis of indomethacin in bulk drugs, nanoemulsions, and various pharmaceutical formulations. Also, the same authors developed and validated a RP-HPLC method using a mobile phase composed of ethyl acetate/ethanol (50:50, v/v) for a rapid analysis of olmesartan medoxomil in bulk drugs, self-microemulsifying drug delivery systems, and marketed tablets [71].

4. Aqueous mobile phases

Using 100% aqueous mobile phases is a good way to make conventional RP-HPLC greener as water is one of the most benign solvent. Indeed, water is readily available, inexpensive, non-toxic, non-flammable, and environmentally friendly with no disposal concerns. In addition, water does not absorb in UV down to 190 nm so that it is possible to detect even weak chromophores [72]. Also, using water as an eluent allows the combination of LC with non-conventional detectors, e.g flame ionization detector (FID) as water has no significant FID response. This is highly desirable for UV-transparent compound analysis. Moreover, the compatibility of heated water with MS detectors has been shown to increase the ionization efficiency and signal to noise ratio (S/N) for some compounds [17].

Some applications report the use of totally aqueous mobile phases in RP-HPLC at relatively low temperatures for the analysis of pharmaceuticals [73,74]. Nevertheless, such applications are limited to the separation of highly polar analytes since, in RP-HPLC, water is the weakest solvent due to its high polarity (dielectric constant, $\epsilon = 80$ at 20°C) [72]. Indeed, the elution strength of water at ambient temperature is usually not sufficient to elute relatively non-polar compounds in RP-HPLC. Another problem coming from the use of totally aqueous mobile phases is the phenomenon of phase collapse or phase dewetting which occurs with alkyl bonded phases (such as C8 or C18) in RP-HPLC [75]. In fact, phase dewetting leads to chromatographic problems such as retention loss, peak tailing, non-

reproducible retention times, and gradient regeneration delays. Nevertheless, this issue of phase collapse can be avoided by using columns especially designed to be compatible with highly aqueous environments i.e. including a polar end-capping or polar embedded groups [75]. For example, a RP-HPLC-DAD method was developed and validated using only aqueous solvents, by Langlois et al., for paracetamol quantitation in cell culture fluid from an in vitro Blood Brain Barrier model using a C18 column with embedded polar groups (XTerra RP18 column) at 35°C [73]. The mobile phase was a 20 mM formate buffer in water at pH 4. Also, Šatínský et al. [74] have developed et validated a simple, rapid, and environmentally friendly method for the separation of four compounds (4-aminophenol, caffeine, paracetamol, and propyphenazone) on a polyethylene glycol (PEG) stationary phase at 30°C with a low-toxicity mobile phase consisting of water and 0.04% (v/v) trimethylamine whose pH was adjusted to 4.5 by means of glacial acetic acid. Then, the proposed green method was successfully applied to the analysis of active substances and one degradation product (4-aminophenol) in commercial preparations.

Due to its low elution strength at room temperature, water cannot elute many organic analytes so, high temperatures are usually needed to increase its elution strength. Indeed, at elevated temperatures, dielectric constant of water decreases, increasing its elution strength [34]. Chromatographic separation performed with water at high temperatures is known as superheated water chromatography (SHWC) or subcritical water chromatography (SWC) as the temperatures used are lower than the critical temperature of water (374°C) [76]. At high temperature, pure water tends to have a similar polarity as eluents typically used in RP-HPLC [72]. For example, at 150°C, the dielectric constant of water is reduced and its elution strength becomes comparable to that of a mixture of MeOH/water 50:50 (v/v) at ambient temperature [34].

Some comprehensive reviews about SHWC have been published [72,76,77]. As High Temperature Liquid Chromatography (HTLC), SHWC requires special instrumentation such as a mobile phase preheater, a column heater, and a post column effluent cooling system [34]. Also, the most used silica-based stationary phases in RP-LC are not stable at temperatures above 50°C since the reactive properties of water at high temperatures accelerates the dissolution of silica [17,33]. More temperature-resistant packing materials are usually required for SHWC such as polymeric phases (polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB)) or zirconia-based materials (e.g., zirconia particles with polybutadiene (PBD), polystyrene or a carbon coating) [76]. Moreover, SHWC has others limitations such as potential on-column degradation of thermally labile analytes and insolubility of hydrophobic analytes in pure water [3,35].

Several applications of SHWC in pharmaceutical analysis have been reported in the literature [78–83]. As examples, Fields et al. [82] showed that the replacement of ACN/water mixtures by superheated water mobile phases in RP-HPLC can be successfully applied to the analysis of testosterone

and several related compounds on a porous zirconia, PBD-coated column at temperatures up to 200°C. Six anticancer drugs were also well separated on a PS-DVB column at 160°C with a buffered superheated water as the mobile phase [80]. In another study, a SHWC method was established for the analysis of pharmaceutical compounds in cold drugs, in substitution of traditional RP-HPLC [78]. A mixture of pure water and 100 mM phosphoric acid was used as the mobile phase on an Alltech Adsorbosil C18 column. To optimize the separation of pharmaceuticals a gradient elution based on an increase of temperature was programmed. Also, Huang et al. [83] compared the chromatographic analysis of eleven thiazide and related sulfonamide diuretics on an XBridge C18 columns using SHWC up to 200°C and conventional liquid chromatography at ambient temperature. Most of the sulfonamide diuretics were thermally stable, but many of the thiazides were degraded. The results confirmed that the thermal stability of analytes must be considered before using SHWC.

5. Micellar liquid chromatography

Micellar liquid chromatography (MLC) is a reversed-phase liquid chromatographic mode in which the stationary phase is nonpolar and the mobile phase is an aqueous solution of a surfactant at a concentration above the critical micellar concentration (cmc) [84]. In comparison with aqueous-organic mobile phases, the addition of a surfactant to the mobile phase in RP-HPLC modifies the chromatographic behavior since it introduces a pseudo-stationary phase into which analytes can partition. In MLC, analyte retention depends on three phases: stationary phase, bulk solvent, and micellar pseudophase. Compounds are therefore separated based on their differential partitioning between these three phases. Most of the time, surfactants are added to the mobile phase to form micelles, but surfactant-coated stationary phases can also be used. For water-insoluble species, partitioning mainly occurs via direct transfer of analytes between the micellar pseudophase and the stationary phase [85]. Different papers with a comprehensive overview on MLC have been published [84–87].

MLC has been investigated as an interesting approach for green analytical chemistry as it eliminates or reduces the use of organic solvents. Indeed, mobile phases contain aqueous solutions of a surfactant and a small percentage of organic modifier (mostly below 15%, v/v). Moreover, these micellar mobile phases are non-flammable, have a low toxicity, and do not produce hazardous waste because of the biodegradable character of the surfactants used [88]. For example, sodium dodecyl sulfate (SDS), the most commonly used surfactant in MLC, is a fatty alcohol sulfate that is aerobically degraded [89–91]. However, it is often necessary to add organic solvents to the aqueous solutions of micelles in order to improve MLC separations [86]. The most commonly used organic modifiers in MLC are propanol, butanol, and pentanol which are less toxic than methanol or acetonitrile [4]. Another important advantage of MLC concerns sample treatment. In fact, the great solubilizing ability of micelles allows the direct injection of drugs in complex matrices (e.g. biological fluids and dosage forms) without the

need of sample pretreatment other than filtration [84]. Moreover, MLC is compatible with existing RP-HPLC instruments. Thus, it does not require any modification of existing RP-HPLC instrumentation.

Table 2 lists different recent applications of MLC for analysis of drugs in both pharmaceutical and biological matrices [92-118]. Although most of these methods used SDS as surfactant, some of them used also Brij-35 [92,93], cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) [94] or Tween-20 [95]. In the majority of applications, hybrid micellar liquid chromatography was reported using mobile phases composed of an aqueous surfactant solution and a small volume of organic modifiers such as n-propanol, n-butanol and n-pentanol. As an example, El-Shaheny [96] developed and validated a stability-indicating MLC method for the determination of three oxicams (piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam) using a C8 column and a mobile phase composed of 0.15 M SDS with 10% of propanol. This method was applied to quality control of pharmaceutical preparations including gel and suppositories without pretreatment steps other than dilution and filtration. Another MLC method was established to quantify three selective serotonin reuptake inhibitors (citalopram, paroxetine, and fluoxetine) using a mobile phase buffered at pH 7, containing SDS and 6% (v/v) butanol [97]. The suitability of the method was then successfully checked through the analysis of tablets and biological samples i.e. plasma and urine samples, without extraction steps from patients treated with selective serotonin reuptake inhibitors.

There are also some interesting examples of green MLC analysis of pharmaceuticals using totally aqueous mobile phases [92,93,98,99]. A MLC method using a 0.05 M SDS aqueous solution at pH 7 as mobile phase was developed and validated by Peris-Vicente et al. [99] to quantify abacavir, lamivudine, and raltegravir in plasma. Also, Fernández-Navarro et al. [92] successfully analyzed seven tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations using 0.02 M of Brij-35 in the mobile phase. The preparation of the samples required only solubilization and filtration steps previous to injection.

To conclude, MLC is an interesting alternative to develop green chromatographic methods for pharmaceutical analysis. Moreover, MLC enables to simplify sample preparation for complex biological sample analysis. Also, it can be hyphenated with UV, fluorescence, and even electrochemical detections. However, such methods involve a high number of parameters among them the type and the concentration of surfactants and the nature and the percentage of organic solvents, leading to quite difficult chromatographic developments. Indeed, due to the complexity of the mobile phase, retention mechanisms are often difficult to predict or to interpret.

Table 2: Some recent applications of MLC in pharmaceutical analysis

Compounds	Matrix	Column	Mobile phase	Temperature (°C)	Detection	Ref
Seven tricyclic antidepressants	Pharmaceutical formulations	Zorbax C18 (150 × 4.6 mm)	0.02 M Brij-35 with citric buffer, pH 3.0 1 mL/min	25	UV (254 nm)	[92]
Six β-blockers		Zorbax Eclipse C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.02 M Brij-35 and 0.15 M SDS with 0.01 M NaH ₂ PO ₄ and HCl, pH 3.0 1 mL/min	25	UV (225 nm)	[93]
Seven tricyclic antidepressants		Zorbax Eclipse C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.02 M Brij-35 with 0.01 M NaH ₂ PO ₄ and HCl, pH 3.0 1 mL/min	25	UV (254 nm)	[93]
Free ampicillin	Standard solutions of human serum albumin	RP-8 endcapped column (125 x 4.0 mm, 5 μm)	0.06 M CTAB + 20% ACN (v/v), pH 7.4 1 mL/min	20	UV (254 nm)	[94]
Nelfinavir mesylate	Tablets	Licrosphere c18	0.5 M Tween-20 + 2% n-butanol (v/v) with H ₃ PO ₄ , pH 4.2 1.5 mL/min	25	UV (249 nm)	[95]
Piroxicam, tenoxicam, and lornoxicam	Gel and suppositories	C8 column (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 10% n-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 3.0		Time-programmed UV detection	[96]
Citalopram, paroxetine, and fluoxetine	Plasma and urine	Kromasil C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.075 M SDS + 6% n-butanol (v/v) with 0.01 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7.0 1 mL/min	25	Fluorescence detection program	[97]
Sildenafil citrate	Oral suspensions and tablets	ACE 5 C18 - AR column (50 x 4.6 mm, 5 μm)	0.0082 M SDS with acetate buffer, pH 4.0 0.5 mL/min	room temperature	UV (298 nm)	[98]
Abacavir, lamivudine, and raltegravir	Human plasma	Kromasil C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.05 M SDS, pH 7.0 1 mL/min	room temperature	UV (260 nm)	[99]
Nicotine	Pharmaceutical formulations and biological fluid	Kromasil C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 6% n-pentanol (v/v) with 0.01 M NaH ₂ PO ₄ and 0.001 M KCl, pH 6.0		Electrochemical detector (0.8 V) UV (259 nm)	[100]

Compounds	Matrix	Column	Mobile phase	Temperature (°C)	Detection	Ref
Tamoxifen	Plasma of breast cancer patients	Kromasil 5 C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 7% n-butanol (v/v), pH 3.0 1.5 mL/min	40	Fluorescence (260 nm/380 nm)	[101]
Penicillin antibiotics (amoxicillin, ampicillin, cloxacillin, and dicloxacillin)	Pharmaceutical formulations and physiological fluids (urine)	Zorbax C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.11 M SDS + 6% n-propanol (v/v) with 0.01 M NaH ₂ PO ₄ , pH 3.0 1 mL/min	25	UV (210 nm)	[102]
Tamoxifen and endoxifen	Plasma samples from breast cancer patients	Kromasil C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 7% n-butanol (v/v), pH 3.0 1.5 mL/min	40	Fluorescence (260 nm/380 nm)	[103]
Morphine, codeine, papaverine, and noscapine	Pharmaceutical solution for injection	Kromasil C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.10 M SDS + 5% n-butanol (v/v) with H ₃ PO ₄ , pH 2.5 1 mL/min	40	UV (280 nm)	[104]
Derivatives of zidovudine	Simulated gastric and intestinal fluids	Phenomenex Synergi Fusion-RP 80 (250 x 4.6 mm, 4 μm)	0.05 M SDS + 1% n-butanol (v/v) with 0.01 M NaH ₂ PO ₄ , pH 3.0 1 mL/min	30	UV (267 nm)	[105]
Lamivudine and its carbonate derivatives	Simulated gastric and intestinal fluids	Kromasil C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 4% n-butanol (v/v) with 0.01 M KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0 1 mL/min	30	UV (272 nm)	[106]
Flavoxate hcl	Tablets	BDS Hypersil phenyl (250 x 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 15% n-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 2.5 1 mL/min		UV (325 nm)	[107]
Diltiazem hydrochloride, metoprolol tartrate, and isosorbide mononitrate	Human serum	Pinnacle II Cyano column (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.0415 M SDS + 10% n-propanol (v/v) with 0.02 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7.0 0.8 mL/min	40	UV (225 nm)	[108]
Tizoxanide	Human urine and plasma	Chromolith® C18 (100 × 4.6 mm)	0.1 M SDS + 8% n-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 4.0 1.0 mL/min	25	UV (240 nm)	[109]

Compounds	Matrix	Column	Mobile phase	Temperature (°C)	Detection	Ref
β-blockers (acebutolol, atenolol, carteolol, labetalol, metoprolol, and propranolol, celiprolol, and oxprenolol)	Urine samples	Zorbax Eclipse XDB-C8 and Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)	Gradient mode: 0.10 M SDS + n-propanol (from 0 to 30% (v/v) in 15 min) 1 mL/min	25	UV (225 nm)	[110]
Felodipine	Tablets and human plasma	Shim-pack CLC-C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)	0.085 M SDS + 6.5% n-pentanol (v/v) with 0.025 M phosphate buffer, pH 7.0 1.5 mL/min	30	Fluorescence (240 nm/440 nm)	[111]
Darunavir, ritonavir, emtricitabine, and tenofovir	Human plasma	Kromasil C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.06 M SDS + 2.5% n-pentanol (v/v), pH 7.0 1 mL/min	room temperature	UV (214 nm)	[112]
Ascorbic acid, pseudoephedrine hydrochloride, and ibuprofen	Tablets	ODS C18 stainless steel (150 × 4.6 mm)	0.03 M SDS + 8% 1-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 3.0 1 mL/min		UV (260 nm)	[113]
Ofloxacin and flavoxate	Pharmaceutical formulations	BDS Hypersil phenyl (250 × 4.6 mm, 5 μm)	0.15 M SDS + 15% n-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 2.5 1 mL/min		UV (325 nm) and fluorescence (290 nm/485 nm)	[114]
Tamoxifen and its main metabolites	Plasma samples from breast cancer patients	C18 column	0.08 M SDS + 4.5% n-butanol (v/v), pH 3.0 1.5 mL/min	40	Fluorescence (260 nm/380 nm)	[115]
Enalapril maleate, lisinopril dihydrate, benazepril hydrochloride, and hydrochlorothiazide	Tablets	C18 silica column	0.012 M SDS + 10% n-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 3.6		UV (210 nm)	[116]
Esomeprazole, leflunomide and ibuprofen	Human plasma and tablets	Shim-pack VP-ODS stainless steel column (150 × 4.6 mm)	0.1 M SDS + 10% n-propanol (v/v) with 0.3% TEA and 0.02 M H ₃ PO ₄ , pH 3.5 1 mL/min		UV (285 nm)	[117]
Axitinib, lapatinib and afatinib	Plasma	Kromasil C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm)	0.07 M SDS + 6.0% n-pentanol (v/v) with 0.01 M phosphate salt, pH 7.0		UV (260 nm)	[118]

ACN, acetonitrile ; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; SDS, sodium dodecyl sulfate; TEA, triethylamine.

6. Ionic liquids as green mobile phase additives

Ionic liquids (ILs), which are also called room-temperature ionic liquids (RTILs), are liquid at ambient temperature, and are composed entirely of ions, most often organic cations but also inorganic or organic anions [119]. These low-melting-point salts (below 100°C) were first intensively used as solvents for organic synthesis but have more recently shown great potential as green solvents for analytical chemistry in academic and industrial fields. Indeed, they possess beneficial properties such as high miscibility with water and organic solvents and capacity to solubilize organic and inorganic compounds, high thermal stability, negligible vapor pressure (low volatility), and non-flammability [120,121]. However, their environment-friendly nature was recently questioned as aquatic toxicity is a matter of concern with respect to the environmental safety of ILs [16].

A review on applications of ionic liquids in the whole field of analytical chemistry has been published [120]. Other reviews focus on applications in separation sciences [121,122], and some specifically on liquid chromatography [119,123,124]. In chromatographic separations, ionic liquids are most common used as mobile phase additives and sometimes as surface-bonded stationary phases for ion-exchange (IEX) or mixed mode IEX/RP-HPLC [119,122]. ILs are usually used in small quantity in RP-HPLC mobile phases as silanol-blocking agent to improve the chromatographic analysis of basic compounds. In fact, ILs can reduce or suppress interactions between positively charged compounds and anionic free silanols of the stationary phase at low pH mobile phases, which are responsible of peak tailing and peak broadening. ILs can also be added in higher proportions to totally aqueous mobile phases instead of polluting organic modifiers.

Some applications of ILs as mobile phase additives in RP-HPLC has been reported for the analysis of pharmaceutical compounds [125–130]. Different pharmaceutical compounds were analyzed such as β -blockers [125], antidepressants [126], β -lactam antibiotics [127], thiamine (vitamin B1) [128], urazamide [129], and ephedrines [130]. Among these, Ruiz-Angel et al. [125] carried out a comparative study of the effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIM][BF₄]) and triethylamine (TEA) added to the mobile phase on the analysis of seven β -blockers in RP-HPLC. They showed that, in terms of efficiency and asymmetry factor, BMIM BF₄ was a significantly better additive compared to TEA. Even if this study highlights the benefits of using ILs, the greenness of the method can be questioned as 30% of ACN was used in the mobile phase. Also, Seo et al. [129] developed and validated successfully a green method for the determination of urazamide in pharmaceutical preparation using an aqueous mobile phase modified with 1-ethyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate.

7. Conclusions

Greening liquid chromatographic methods becomes of great interest in the field of pharmaceutical analysis to protect both the operators' health and the environment. Indeed, thousands of

chromatographic equipment are used in routine for quality control of pharmaceuticals around the world, representing high amounts of organic solvents consumed and waste generated.

In this review, we have shown that a good strategy to make RP-HPLC methods greener for analysis of pharmaceuticals is the replacement of the toxic solvents commonly used, mainly acetonitrile and methanol, with more benign alternative solvents. Many strategies have been described. Among them, the use of ethanol as a green organic solvent in the mobile phase is probably the most promising one as it is economical and follows a classical development in RP-HPLC. Totally aqueous mobile phases at high temperatures or modified with surfactants or ionic liquids are also interesting approaches.

The different applications presented herein highlight that green RP-HPLC methods using alternative solvents can be successfully performed without any major compromise in terms of chromatographic performance. These approaches are rather economical as they do not require expensive equipment and reduce waste disposal costs, consequently, they are expected to develop in the coming years.

References

1. Görög, S. The changing face of pharmaceutical analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 12–17, doi:10.1016/j.trac.2006.07.011.
2. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. In; John Wiley & Sons, Inc., 2009 ISBN 978-0-470-50818-3.
3. Welch, C.J.; Wu, N.; Biba, M.; Hartman, R.; Brkovic, T.; Gong, X.; Helmy, R.; Schafer, W.; Cuff, J.; Pirzada, Z. Greening analytical chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 667–680, doi:10.1016/j.trac.2010.03.008.
4. ICH Harmonised Tripartite Guideline Impurities: Guideline for residual solvents Q3C (R5). *Curr. Step* **2005**, *4*, 509.
5. Sheldon, R.A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437–1451.
6. Anastas, P.T.; Kirchoff, M.M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686–694, doi:10.1021/ar010065m.
7. Gałaszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *50*, 78–84, doi:10.1016/j.trac.2013.04.010.
8. Tobiszewski, M.; Mechlińska, A.; Namieśnik, J. Green analytical chemistry—theory and practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2869–2878, doi:10.1039/B926439F.

9. Płotka, J.; Tobiszewski, M.; Sulej, A.M.; Kupska, M.; Górecki, T.; Namieśnik, J. Green chromatography. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1307*, 1–20, doi:10.1016/j.chroma.2013.07.099.
10. Tobiszewski, M.; Marć, M.; Gałuszka, A.; Namieśnik, J. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules* **2015**, *20*, 10928–10946, doi:10.3390/molecules200610928.
11. Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.M.; Konieczka, P.; Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 61–72, doi:10.1016/j.trac.2012.03.013.
12. Keith, L.H.; Gron, L.U.; Young, J.L. Green Analytical Methodologies. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2695–2708, doi:10.1021/cr068359e.
13. Tobiszewski, M. Metrics for green analytical chemistry. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 2993–2999, doi:10.1039/C6AY00478D.
14. Olives, A.I.; González-Ruiz, V.; Martín, M.A. Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 5618–5634, doi:10.1021/acssuschemeng.7b01012.
15. A. Peterson, E.; Dillon, B.; Raheem, I.; Richardson, P.; Richter, D.; Schmidt, R.; F. Sneddon, H. Sustainable chromatography (an oxymoron?). *Green Chem.* **2014**, *16*, 4060–4075, doi:10.1039/C4GC00615A.
16. Mohamed, H.M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 176–192, doi:10.1016/j.trac.2014.11.010.
17. Shaaban, H.; Górecki, T. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. *Talanta* **2015**, *132*, 739–752, doi:10.1016/j.talanta.2014.09.050.
18. Shaaban, H. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 6929–6944, doi:10.1007/s00216-016-9726-2.
19. Eldin, A.B.; Ismaiel, O.A.; Hassan, W.E.; Shalaby, A.A. Green analytical chemistry: Opportunities for pharmaceutical quality control. *J. Anal. Chem.* **2016**, *71*, 861–871, doi:10.1134/S1061934816090094.
20. Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* **2007**, *9*, 927, doi:10.1039/b617536h.
21. Henderson, R.K.; Jiménez-González, C.; Constable, D.J.C.; Alston, S.R.; Inglis, G.G.A.; Fisher, G.; Sherwood, J.; Binks, S.P.; Curzons, A.D. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. *Green Chem.* **2011**, *13*, 854, doi:10.1039/c0gc00918k.
22. Pena-Pereira, F.; Kloskowski, A.; Namieśnik, J. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a

- generation of eco-friendly alternatives. *Green Chem.* **2015**, *17*, 3687–3705, doi:10.1039/C5GC00611B.
23. Byrne, F.P.; Jin, S.; Paggiola, G.; Petchey, T.H.M.; Clark, J.H.; Farmer, T.J.; Hunt, A.J.; Robert McElroy, C.; Sherwood, J. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. *Sustain. Chem. Process.* **2016**, *4*, 7, doi:10.1186/s40508-016-0051-z.
 24. Gaber, Y.; Törnvall, U.; Kumar, M.A.; Ali Amin, M.; Hatti-Kaul, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2021, doi:10.1039/c0gc00667j.
 25. Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. Greener organic solvents in analytical chemistry. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2017**, *5*, 1–4, doi:10.1016/j.cogsc.2017.03.002.
 26. Shen, Y.; Chen, B.; van Beek, T.A. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. *Green Chem.* **2015**, *17*, 4073–4081, doi:10.1039/C5GC00887E.
 27. Micăle, F.; Albu, F.; Iorgulescu, E.-E.; Medvedovici, A.; Tache, F. Ethyl Lactate as a Greener Alternative to Acetonitrile in RPLC: A Realistic Appraisal. *J. Chromatogr. Sci.* **2015**, bmv077, doi:10.1093/chromsci/bmv077.
 28. Miyabe, K.; Takeuchi, S.; Tezuka, Y. Adsorption characteristics in reversed-phase liquid chromatography using ethanol/water mixed solvent. *Adsorption* **1999**, *5*, 15–24.
 29. Ribeiro, R.L.; Bottoli, C.B.; Collins, K.E.; Collins, C.H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLS-RP mobile phases. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 300–306.
 30. Welch, C.J.; Brkovic, T.; Schafer, W.; Gong, X. Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1232–1238.
 31. Shaaban, H.; Górecki, T. Fused core particles as an alternative to fully porous sub-2 µm particles in pharmaceutical analysis using coupled columns at elevated temperature. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 2735, doi:10.1039/c2ay25202c.
 32. Li, J.; Carr, P.W. Accuracy of Empirical Correlations for Estimating Diffusion Coefficients in Aqueous Organic Mixtures. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2530–2536, doi:10.1021/ac961005a.
 33. Greibrokk, T.; Andersen, T. High-temperature liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 743–755, doi:10.1016/S0021-9673(02)01963-5.
 34. McNeff, C.V.; Yan, B.; Stoll, D.R.; Henry, R.A. Practice and theory of high temperature liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1672–1685, doi:10.1002/jssc.200600526.
 35. Heinisch, S.; Rocca, J.-L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 642–658, doi:10.1016/j.chroma.2008.11.079.
 36. Greibrokk, T.; Andersen, T. Temperature programming in liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 899–909, doi:10.1002/1615-9314(20011201)24:12<899::AID-JSSC899>3.0.CO;2-K.
 37. Yang, Y. High-Temperature Liquid Chromatography Available online: <http://www.chromatographyonline.com/high-temperature-liquid-chromatography> (accessed on Apr 5, 2018).

38. Rojanarata, T. Eco-friendly, operator-safe and cost-effective RP-HPLC method for stability-indicating assay of prednisolone tablets using ethanol-water as mobile phase. *Int J Pharm Pharm Sci* **2012**, *4*, 444–448.
39. Sadeghi, F.; Navidpour, L.; Bayat, S.; Afshar, M. Validation and Uncertainty Estimation of an Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Diltiazem in Pharmaceutical Preparations. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**, 1–10, doi:10.1155/2013/353814.
40. Afshar, M.; Salkhordeh, N.; Rajabi, M. An Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Permethrin Isomers: Application to Pharmaceutical Analysis Available online: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/697831/> (accessed on Dec 6, 2017).
41. Tótolí, E.G.; Salgado, H.R.N. Development and validation of an economic, environmental friendly and stability-indicating analytical method for determination of ampicillin sodium for injection by RP-HPLC. *World J Pharm Sci* **2014**, *3*, 1928–1943.
42. Assassi, A.L.; Roy, C.-E.; Perovitch, P.; Auzerie, J.; Hamon, T.; Gaudin, K. Green analytical method development for statin analysis. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1380*, 104–111, doi:10.1016/j.chroma.2014.12.066.
43. Tótolí, E.G.; Salgado, H.R.N. Development, Optimization, and Validation of a Green and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Daptomycin in Lyophilized Powder. *J. AOAC Int.* **2015**, *98*, 1276–1285, doi:10.5740/jaoacint.15-039.
44. Boussès, C.; Ferey, L.; Vedrines, E.; Gaudin, K. Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 114–122, doi:10.1016/j.jpba.2015.07.003.
45. Elzanfaly, E.S.; Hegazy, M.A.; Saad, S.S.; Salem, M.Y.; Abd El Fattah, L.E. Validated green high-performance liquid chromatographic methods for the determination of coformulated pharmaceuticals: A comparison with reported conventional methods. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 757–763, doi:10.1002/jssc.201401151.
46. Mohamed, H.M.; Lamie, N.T. Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of a Developed RP-HPLC Method Used for Simultaneous Analysis of Combined Antihypertensive Medications. *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 1260–1265, doi:10.5740/jaoacint.16-0124.
47. Yehia, A.M.; Mohamed, H.M. Green approach using monolithic column for simultaneous determination of coformulated drugs: Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39*, 2114–2122, doi:10.1002/jssc.201600081.
48. Rodrigues, D.F.; Salgado, H.R.N. Development and Validation of a Green Analytical Method of RP-HPLC for Quantification of Cefepime Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form: Simple, Sensitive and Economic. *Curr. Pharm. Anal.* **2016**, *12*, 306–314.

49. Ferretti, R.; Zanitti, L.; Casulli, A.; Cirilli, R. Green high-performance liquid chromatography enantioseparation of lansoprazole using a cellulose-based chiral stationary phase under ethanol/water mode. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39*, 1418–1424, doi:10.1002/jssc.201501329.
50. Beheshti-Maal, L.; Navidpour, L.; Afshar, M. An ecofriendly and stability-indicating RP-HPLC method for determination of dapsone: Application to pharmaceutical analysis. *Chiang Mai J. Sci.* **2016**, *43*, 620–629.
51. Spagnol, C.M.; Isaac, V.L.B.; Corrêa, M.A.; Salgado, H.R.N. Validation of HPLC-UV assay of caffeic acid in emulsions. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*, 305–311, doi:10.1093/chromsci/bmv142.
52. Pedroso, T.M.; Medeiros, A.C.D.; Salgado, H.R.N. RP-HPLC×HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. *Talanta* **2016**, *160*, 745–753, doi:10.1016/j.talanta.2016.08.016.
53. Kogawa, A.C.; Mendonça, J.N.; Lopes, N.P.; Salgado, H.R.N. Method indicative of stability for the determination of rifaximin and its degradation products by thin chromatographic. *Curr. Pharm. Anal.* **2017**, *13*, 520–524, doi:10.2174/1573412912666160801103712.
54. Ferey, L.; Raimbault, A.; Rivals, I.; Gaudin, K. UHPLC method for multiproduct pharmaceutical analysis by Quality-by-Design. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *148*, 361–368, doi:10.1016/j.jpba.2017.10.014.
55. Iqbal, M. UHPLC-MS/MS assay using environment friendly organic solvents: A green approach for fast determination of quetiapine in rat plasma. *Arab. J. Chem.* **2014**, doi:10.1016/j.arabjc.2014.11.039.
56. Hassanlou, S.; Rajabi, M.; Shahrashbi, A.A.; Afshar, M. Development and Validation of an Ecofriendly HPLC-UV Method for Determination of Capecitabine in Human Plasma: Application to Pharmacokinetic Studies. *South Afr. J. Chem.* **2016**, *69*, 174–179, doi:10.17159/0379-4350/2016/v69a21.
57. Bhoir, S.; Namboodiry, V.; Verma, P.; Mishra, S.; Bhagwat, A. Prospective Use of Propylene Carbonate as a Mobile Phase Component in RP-HPLC. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **2011**, *1*.
58. Verma, P.; Namboodiry, V.; Bhagwat, A.; Bhoir, S. Significance of Propylene Carbonate as a Mobile Phase Component in Estimation of Aspirin and its Impurities using RP-HPLC. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **2011**, *1*.
59. Tache, F.; Udrescu, S.; Albu, F.; Micăle, F.; Medvedovici, A. Greening pharmaceutical applications of liquid chromatography through using propylene carbonate–ethanol mixtures instead of acetonitrile as organic modifier in the mobile phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *75*, 230–238, doi:10.1016/j.jpba.2012.11.045.
60. Cheregi, M.; Albu, F.; Udrescu, Ş.; Răducanu, N.; Medvedovici, A. Greener bioanalytical approach for LC/MS–MS assay of enalapril and enalaprilat in human plasma with total

- replacement of acetonitrile throughout all analytical stages. *J. Chromatogr. B* **2013**, *927*, 124–132, doi:10.1016/j.jchromb.2012.11.023.
61. Varsha, N.; Pratibha, V.; Soni, M.; Ashok, B.; Suvarna, B. Estimation of paracetamol and lornoxicam by isocratic, gradient, and elevated temperature hplc using propylene carbonate. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2014**, *37*, 1094–1103, doi:10.1080/10826076.2013.765464.
 62. Verma, P.; Namboodiry, V.; Mishra, S.; Bhagwat, A.; Bhoir, S. A stability indicating HPLC method for the determination of metronidazole using ecofriendly solvent as mobile phase component. *Int J Pharm Pharm Sci* **2013**, *5*, 496–501.
 63. Varsha, N.; Suvarna, B.; Pratibha, V.; Soni, M.; Ashok, B. Replacement of acetonitrile by mixtures of propylene carbonate and methanol as organic modifier in mobile phases for RPLC separation mechanism: Application to the assay of alprazolam and sertraline in combined pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, *35*, 2643–2654, doi:10.1080/10826076.2011.637273.
 64. Dogan, A.; Basci, N.E. Green bioanalytical and pharmaceutical analysis of voriconazole and tadalafil by HPLC. *Curr. Pharm. Anal.* **2017**, *13*, 495–504, doi:10.2174/1573412913666170210160251.
 65. Funari, C.S.; Carneiro, R.L.; Khandagale, M.M.; Cavalheiro, A.J.; Hilder, E.F. Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 1458–1465, doi:10.1002/jssc.201401324.
 66. Fritz, R.; Ruth, W.; Kragl, U. Assessment of acetone as an alternative to acetonitrile in peptide analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2009**, *23*, 2139–2145, doi:10.1002/rcm.4122.
 67. Keppel, T.R.; Jacques, M.E.; Weis, D.D. The use of acetone as a substitute for acetonitrile in analysis of peptides by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2010**, *24*, 6–10, doi:10.1002/rcm.4352.
 68. Gu, Y.; Jérôme, F. Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9550–9570, doi:10.1039/C3CS60241A.
 69. Judge, M.D.; Aab, C. Ethyl lactate as an environmentally friendly HPLC mobile-phase modifier in the analysis of acetaminophen, caffeine, and ASA. *Can. J. Chem.* **2013**, *91*, 352–356, doi:10.1139/cjc-2012-0381.
 70. Haq, N.; Shakeel, F.; Ali, M.; Elbadry, M.; Alanazi, F.K.; Alsarra, I.A. An environmentally benign approach for rapid analysis of indomethacin using a stability-indicating RP-HPLC method. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2014**, *37*, 878–892, doi:10.1080/10826076.2012.758150.

71. Haq, N.; Iqbal, M.; Alanazi, F.K.; Alsarra, I.A.; Shakeel, F. Applying green analytical chemistry for rapid analysis of drugs: Adding health to pharmaceutical industry. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S777–S785, doi:10.1016/j.arabjc.2012.12.004.
72. Smith, R.M.; Burgess, R.J. Superheated water as an eluent for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *785*, 49–55, doi:10.1016/S0021-9673(97)00570-0.
73. Langlois, M.-H.; Vekris, A.; Bousses, C.; Mordelet, E.; Buhannic, N.; Séguard, C.; Couraud, P.-O.; Weksler, B.B.; Petry, K.G.; Gaudin, K. Development of a solvent-free analytical method for paracetamol quantitative determination in Blood Brain Barrier in vitro model. *J. Chromatogr. B* **2015**, *988*, 20–24, doi:10.1016/j.jchromb.2015.02.019.
74. Šatinský, D.; Brabcová, I.; Maroušková, A.; Chocholouš, P.; Solich, P. Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and a low-toxic water-based mobile phase. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 6105–6115, doi:10.1007/s00216-013-7003-1.
75. Przybyciel, M.; Majors, R.E. Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography. *LC GC N. Am.* **2002**, *20*, 516–523.
76. Hartonen, K.; Riekkola, M.-L. Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 1–14, doi:10.1016/j.trac.2007.10.010.
77. Edge, A.M.; Shillingford, S.; Smith, C.; Payne, R.; Wilson, I.D. Temperature as a variable in liquid chromatography: Development and application of a model for the separation of model drugs using water as the eluent. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1132*, 206–210, doi:10.1016/j.chroma.2006.07.081.
78. Kapalavavi, B.; Yang, Y.; Marple, R.; Gamsky, C. Separation and analysis of pharmaceuticals in cold drugs using green chromatography. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, *158*, 308–312, doi:10.1016/j.seppur.2015.12.036.
79. Yarita, T.; Aoyagi, Y.; Sasai, H.; Nishigaki, A.; Shibukawa, M. Separation of parabens on a zirconia-based stationary phase in superheated water chromatography. *Anal. Sci.* **2013**, *29*, 213–219, doi:10.2116/analsci.29.213.
80. Teutenberg, T.; Lerch, O.; Götze, H.-J.; Zinn, P. Separation of Selected Anticancer Drugs Using Superheated Water as the Mobile Phase. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3896–3899, doi:10.1021/ac0101860.
81. Akay, S.; Kayan, B.; Yang, Y. Solubility and Chromatographic Separation of 5-Fluorouracil under Subcritical Water Conditions. *J. Chem. Eng. Data* **2017**, *62*, 1538–1543, doi:10.1021/acs.jced.7b00015.
82. Fields, S.M.; Ye, C.Q.; Zhang, D.D.; Branch, B.R.; Zhang, X.J.; Okafo, N. Superheated water as eluent in high-temperature high-performance liquid chromatographic separations of steroids on

- a polymer-coated zirconia column. *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 197–204, doi:10.1016/S0021-9673(00)01246-2.
83. Huang, G.; Smith, R.M.; Albishri, H.M.; Lin, J.-M. Thermal Stability of Thiazide and Related Diuretics During Superheated Water Chromatography. *Chromatographia* **2010**, *72*, 1177–1181, doi:10.1365/s10337-010-1789-1.
84. El-Shaheny, R.N.; El-Maghrabey, M.H.; Belal, F.F. Micellar Liquid Chromatography from Green Analysis Perspective. *Open Chem.* **2015**, *13*, doi:10.1515/chem-2015-0101.
85. Rambla-Alegre, M. Basic Principles of MLC. *Chromatogr. Res. Int.* **2012**, *2012*, 1–6, doi:10.1155/2012/898520.
86. Khaledi, M.G. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. *J. Chromatogr. A* **1997**, *780*, 3–40, doi:10.1016/S0021-9673(97)00610-9.
87. García-Alvarez-Coque, M.C.; Ruiz-Angel, M.J. Micellar Liquid Chromatography. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2014 ISBN 978-0-12-409547-2.
88. Scott, M.J.; Jones, M.N. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2000**, *1508*, 235–251, doi:10.1016/S0304-4157(00)00013-7.
89. Margesin, R.; Schinner, F. Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate at low temperatures. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1998**, *41*, 139–143, doi:10.1016/S0964-8305(97)00084-X.
90. Thomas, O.; White, G. Metabolic pathway for the biodegradation of sodium dodecyl sulfate by *Pseudomonas* sp. C12B. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1989**, *11*, 318–327, doi:10.1111/j.1470-8744.1989.tb00064.x.
91. Ambily, P.S.; Jisha, M.S. Metabolic profile of sodium dodecyl sulphate (SDS) biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 10311). *J. Environ. Biol.* **2014**, *35*, 827–831.
92. Fernández-Navarro, J.J.; Ruiz-Ángel, M.J.; García-Álvarez-Coque, M.C. Reversed-phase liquid chromatography without organic solvent for determination of tricyclic antidepressants. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1303–1309, doi:10.1002/jssc.201101106.
93. Ruiz-Angel, M.J.; Peris-García, E.; García-Alvarez-Coque, M.C. Reversed-phase liquid chromatography with mixed micellar mobile phases of Brij-35 and sodium dodecyl sulphate: a method for the analysis of basic compounds. *Green Chem.* **2015**, *17*, 3561–3570, doi:10.1039/C5GC00338E.
94. Stępnik, K.E.; Malinowska, I.; Maciejewska, M. A new application of micellar liquid chromatography in the determination of free ampicillin concentration in the drug–human serum albumin standard solution in comparison with the adsorption method. *Talanta* **2016**, *153*, 1–7, doi:10.1016/j.talanta.2016.02.045.

95. Sharma, M.C.; Sharma, S. Micellar liquid chromatographic method development for determination and stability indicating of Nelfinavir Mesylate in pharmaceutical formulation. *Int. J. PharmTech Res.* **2011**, *3*, 248–252.
96. El-Shaheny, R.N. Stability-indicating micellar LC methods with time-programmed UV detection for determination of three oxicams in pharmaceuticals with direct injection of gel and suppositories. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 163–171, doi:10.1080/10826076.2014.896814.
97. Agrawal, N.; Esteve-Romero, J.; Bose, D.; Dubey, N.P.; Peris-Vicente, J.; Carda-Broch, S. Determination of selective serotonin reuptake inhibitors in plasma and urine by micellar liquid chromatography coupled to fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2014**, *965*, 142–149, doi:10.1016/j.jchromb.2014.06.026.
98. Jaipang, S.; Santiarworn, D.; Liawruangrath, S.; Liawruangrath, B. Micellar liquid chromatographic determination of sildenafil citrate in pharmaceutical formulations. *Chiang Mai J. Sci.* **2013**, *40*, 408–418.
99. Peris-Vicente, J.; Villareal-Traver, M.; Casas-Breva, I.; Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J. A micellar liquid chromatography method for the quantification of abacavir, lamivudine and raltegravir in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *98*, 351–355, doi:10.1016/j.jpba.2014.06.009.
100. Chin-Chen, M.-L.; Rambla-Alegre, M.; Durgavanshi, A.; Bose, D.; Esteve-Romero, J. Rapid and sensitive determination of nicotine in formulations and biological fluid using micellar liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2010**, *878*, 2397–2402, doi:10.1016/j.jchromb.2010.07.010.
101. Esteve-Romero, J.; Ochoa-Aranda, E.; Bose, D.; Rambla-Alegre, M.; Peris-Vicente, J.; Martinavarró-Domínguez, A. Tamoxifen monitoring studies in breast cancer patients by micellar liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1557–1561, doi:10.1007/s00216-010-3695-7.
102. Rambla-Alegre, M.; Martí-Centelles, R.; Esteve-Romero, J.; Carda-Broch, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4972–4981, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.015.
103. Aranda, E.O.; Esteve-Romero, J.; Rambla-Alegre, M.; Peris-Vicente, J.; Bose, D. Development of a methodology to quantify tamoxifen and endoxifen in breast cancer patients by micellar liquid chromatography and validation according to the ICH guidelines. *Talanta* **2011**, *84*, 314–318, doi:10.1016/j.talanta.2011.01.022.
104. Kulikov, A.U.; Boichenko, A.P.; Verushkin, A.G. Optimization of micellar LC conditions for separation of opium alkaloids and their determination in pharmaceutical preparations. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 2749–2757, doi:10.1039/c1ay05389b.

105. Raviolo, M.A.; Esteve-Romero, J.; Briñón, M.C. Stability-indicating micellar liquid chromatography method for three novel derivatives of zidovudine in aqueous and simulated gastric and intestinal fluids matrices. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2540–2545, doi:10.1016/j.chroma.2011.02.018.
106. Gualdesi, M.S.; Esteve-Romero, J.; Briñón, M.C.; Raviolo, M.A. Development and validation of a stability indicating method for seven novel derivatives of lamivudine with anti-HIV and anti-HBV activity in simulated gastric and intestinal fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78–79*, 52–56, doi:10.1016/j.jpba.2013.01.027.
107. El-Shaheny, R.N.; El-Enany, N.M.; Belal, F.F. A green HPLC method for the analysis and stability study of flavoxate HCl using micellar eluent. *Anal Methods* **2014**, *6*, 1001–1010, doi:10.1039/C3AY41318G.
108. Li, N.; Li, C.-L.; Lu, N.-W.; Dong, Y.-M. A novel micellar per aqueous liquid chromatographic method for simultaneous determination of diltiazem hydrochloride, metoprolol tartrate and isosorbide mononitrate in human serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2014**, *967*, 90–97, doi:10.1016/j.jchromb.2014.07.019.
109. Shalan, S.; Nasr, J.J.; Belal, F. Determination of tizoxanide, the active metabolite of nitazoxanide, by micellar liquid chromatography using a monolithic column. Application to pharmacokinetic studies. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 8682–8689, doi:10.1039/c4ay00310a.
110. Rodenas-Montano, J.; Ortiz-Bolsico, C.; Ruiz-Angel, M.J.; García-Alvarez-Coque, M.C. Implementation of gradients of organic solvent in micellar liquid chromatography using DryLab®: Separation of basic compounds in urine samples. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1344*, 31–41, doi:10.1016/j.chroma.2014.03.073.
111. Walash, M.; Belal, F.; El-Enany, N.; Zayed, S. Micellar liquid chromatographic determination of felodipine in tablets and human plasma with fluorescence detection: Application to stability studies and content uniformity testing. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 3401–3409, doi:10.1039/c3ay41570h.
112. Peris-Vicente, J.; Villarreal-Traver, M.; Casas-Breva, I.; Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J. Use of micellar liquid chromatography to analyze darunavir, ritonavir, emtricitabine, and tenofovir in plasma. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 2825–2832, doi:10.1002/jssc.201400574.
113. Wahba, M.E.K. Simultaneous determination of ascorbic acid, pseudoephedrine hydrochloride and ibuprofen in their combined tablets using micellar liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 54–61, doi:10.1080/10826076.2014.883531.
114. El-Shaheny, R.N.; El-Enany, N.M.; Belal, F.F. Analysis of ofloxacin and flavoxate HCl either individually or in combination via a green chromatographic approach with a pharmacokinetic study of ofloxacin in biological samples. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4629–4639, doi:10.1039/C3AY41784K.

115. Peris-Vicente, J.; Ochoa-Aranda, E.; Bose, D.; Esteve-Romero, J. Determination of tamoxifen and its main metabolites in plasma samples from breast cancer patients by micellar liquid chromatography. *Talanta* **2015**, *131*, 535–540, doi:10.1016/j.talanta.2014.07.093.
116. Eid, M.; El-Shabrawy, Y.; El-Shaheny, R. Green micellar HPLC analysis of three angiotensin-converting enzyme inhibitors in their mixtures with hydrochlorothiazide and modeling of their retention behavior by fitting to Foley's model. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40*, 3646–3654, doi:10.1002/jssc.201700622.
117. Talaat, W. Bioanalytical method for the estimation of co-administered esomeprazole, leflunomide and ibuprofen in human plasma and in pharmaceutical dosage forms using micellar liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31*, doi:10.1002/bmc.3865.
118. Albiol-Chiva, J.; Esteve-Romero, J.; Peris-Vicente, J. Development of a method to determine axitinib, lapatinib and afatinib in plasma by micellar liquid chromatography and validation by the European Medicines Agency guidelines. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **2018**, *1074–1075*, 61–69, doi:10.1016/j.jchromb.2017.12.034.
119. Wang, Y.; Tian, M.; Bi, W.; Row, K.H. Application of Ionic Liquids in High Performance Reversed-Phase Chromatography. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2591–2610, doi:10.3390/ijms10062591.
120. Ho, T.D.; Zhang, C.; Hantao, L.W.; Anderson, J.L. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 262–285, doi:10.1021/ac4035554.
121. Han, D.; Row, K.H. Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology. *Molecules* **2010**, *15*, 2405–2426, doi:10.3390/molecules15042405.
122. Joshi, M.D.; Anderson, J.L. Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 5470, doi:10.1039/c2ra20142a.
123. Marszałł, M.P.; Kaliszán, R. Application of ionic liquids in liquid chromatography. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2007**, *37*, 127–140, doi:10.1080/10408340601107847.
124. García-Alvarez-Coque, M.C.; Ruiz-Angel, M.J.; Berthod, A.; Carda-Broch, S. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *883*, 1–21, doi:10.1016/j.aca.2015.03.042.
125. Ruiz-Angel, M.J.; Carda-Broch, S.; Berthod, A. Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1119*, 202–208, doi:10.1016/j.chroma.2005.11.132.
126. Cruz-Vera, M.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Combined use of carbon nanotubes and ionic liquid to improve the determination of antidepressants in urine samples by liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1139–1145, doi:10.1007/s00216-008-1871-9.

127. Han, D.; Wang, Y.; Jin, Y.; Row, K.H. Analysis of Some β -Lactam Antibiotics Using Ionic Liquids as Mobile Phase Additives by RP-HPLC. *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, *49*, 63–66, doi:10.1093/chrsi/49.1.63.
128. Suh, J.H.; Kim, J.; Jung, J.; Kim, K.; Lee, S.G.; Cho, H.-D.; Jung, Y.; Han, S.B. Determination of Thiamine in Pharmaceutical Preparations by Reverse Phase Liquid Chromatography Without Use of Organic Solvent. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, *34*, 1745–1750, doi:10.5012/bkcs.2013.34.6.1745.
129. Seo, N.; Lee, Y.R.; Park, H.S.; Truong, Q.-K.; Lee, J.-Y.; Chung, H.K.; Choi, Y.; Kim, B.; Han, S.B.; Kim, K.H. Determination of urazamide in pharmaceutical preparation with room temperature ionic liquid. *Arch. Pharm. Res.* **2017**, *40*, 364–372, doi:10.1007/s12272-017-0895-0.
130. He, L.; Zhang, W.; Zhao, L.; Liu, X.; Jiang, S. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrines by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1007*, 39–45.

Conclusion du chapitre 1

Le contrôle qualité pharmaceutique est une activité essentielle pour la qualité des médicaments, qui malheureusement intègre rarement des procédures analytiques développées en chimie analytique verte. Sur la base du contrôle qualité des antipaludiques, nous allons aborder la potentialité d'intégrer ces approches. Le choix des combinaisons thérapeutiques constituées d'un dérivé d'artémisinine comme preuve de concept, présente plusieurs avantages. Le premier avantage est que ces associations sont composées de substances actives aux propriétés acido-basiques différentes et de détectabilité plutôt opposées et donc leur analyse simultanée représente un véritable défi analytique. Le second intérêt est de proposer des approches pour remplacer les méthodes existantes dans les pharmacopées qui ne sont pas vertes et longues à mettre en oeuvre. Le troisième intérêt réside dans ce que les monographies de contrôle de ces bithérapies sont basées souvent sur une méthode d'analyse par substance active, et donc avoir une seule méthode pour le contrôle des substances actives, serait un gain de temps. Le dernier avantage est que rendre les méthodes plus vertes, peut s'accompagner d'une diminution des coûts. Le résultat devra cependant respecter la réglementation pharmaceutique pour être accepté par les laboratoires de contrôle qualité. Ces méthodes devront donc être au minimum validées.

Des différentes approches pour rendre la chromatographie liquide en phase inverse verte, l'utilisation de l'éthanol en remplacement des solvants classiques est le choix le plus adapté à notre étude qui consiste à développer des méthodes peu polluantes compatibles avec les instruments classiques de CLHP. En effet, en plus d'être l'un des solvants les plus verts, l'éthanol est facilement disponible, est biosourcé et a des propriétés chromatographiques similaires à l'acétonitrile et au méthanol. Néanmoins, une vigilance doit être portée à son origine biosourcée. En effet, la production de bioéthanol à partir de plantes cultivées peut contribuer à la déforestation [123]. Une fabrication à partir de la fermentation de déchets organiques est une option plus écologique et est à privilégier. Aussi lors du développement en CLHP, une attention particulière doit être apportée à la viscosité élevée de l'éthanol lors de ses mélanges aqueux afin de ne pas avoir une pression trop élevée incompatible avec le matériel de CLHP. Par ailleurs, en raison de son absorbance relativement élevée comparativement à celle de l'acétonitrile, une optimisation des paramètres pouvant influencer la détection des composés peut être nécessaire particulièrement si des analytes possèdent peu de groupements chromophores.

Références bibliographiques

- [1] Directive 65/65/CEE du Conseil, du 26 janvier 1965, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives, relatives aux spécialités pharmaceutiques.
- [2] V. D'Atri, S. Fekete, A. Clarke, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis, *Anal. Chem.* 91 (2019) 210–239. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05026>.
- [3] WHO, Essential medicines and health products. https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/control/en/ (accessed September 11, 2020).
- [4] Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Sant (EDQM), Guide technique pour l'élaboration des monographies, (2015) 80.
- [5] Qu'est-ce que la Pharmacopée ? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/(offset)/0) (accessed September 27, 2020).
- [6] M. Champey, Le processus de veille et de mise en conformité règlementaire en laboratoire de contrôle qualité dans un contexte de spécifications internationales multiples : évolutions des pharmacopées et impacts sur un laboratoire, Thèse de pharmacie, Université Grenoble Alpes, 2019.
- [7] EDQM, European Pharmacopoeia 8.0.
- [8] United States Pharmacopoeia (USP) 39.
- [9] The Japanese Pharmacopoeia XVII, 2016.
- [10] The International Pharmacopoeia, 9th ed., WHO Department of Essential Medicines and Health Product, 2019. <https://apps.who.int/phint/2019/index.html#p/home> (accessed April 27, 2018).
- [11] WHO, 21st WHO Model List of Essential Medicines, (2019). <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1> (accessed February 26, 2019).
- [12] OMS | Médicaments essentiels, WHO. http://www.who.int/topics/essential_medicines/fr/ (accessed September 27, 2020).
- [13] ICH history. <https://www.ich.org/page/history> (accessed September 27, 2020).
- [14] Harmonisation Internationale - Pharmacopée européenne. <https://www.edqm.eu/fr/harmonisation-internationale> (accessed September 27, 2020).

- [15] ICH Quality Guidelines. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (accessed September 27, 2020).
- [16] WHO member state mechanism on substandard/spurious/falsely-labelled/falsified/counterfeit (ssffc) medical products. 2015. https://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/A70_23-en1.pdf?ua=1. https://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/A70_23-en1.pdf?ua=1 (accessed July 9, 2020).
- [17] Produits médicaux de qualité inférieure ou falsifiés. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/substandard-and-falsified-medical-products> (accessed September 27, 2020).
- [18] WHO. <https://www.who.int/fr/news-room/detail/28-11-2017-1-in-10-medical-products-in-developing-countries-is-substandard-or-falsified> (accessed September 10, 2020).
- [19] M. Feinberg, B. Boulanger, W. Dewé, P. Hubert, New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 502–514. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2791-y>.
- [20] A. Bouabidi, Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques, Thèse de doctorat, Université Hassan II et Université de Liège, 2013. <http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-07292014-182950/unrestricted/THESEFINALE.pdf> (accessed September 10, 2020).
- [21] R. Marini Djang'Eing'A, Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytiques, Thèse de doctorat, Université de Liège, 2005. http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-07032007-221300/unrestricted/09_ChapitreIV_2.pdf (accessed September 13, 2020).
- [22] J. Goupy, Plans d'expériences, Ed. Techniques Ingénieur, 2006.
- [23] E. Rozet, P. Lebrun, P. Hubert, B. Debrus, B. Boulanger, Design Spaces for analytical methods, *TrAC Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.007>.
- [24] J. Goupy, L. Creighton, Introduction to design of experiments with JMP examples, SAS publishing, 2007.
- [25] The international Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Q8 (R2), Pharmaceutical development, (2009). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q8%28R2%29%20Guideline.pdf>.

- [26] R. Deidda, S. Orlandini, P. Hubert, C. Hubert, Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 161 (2018) 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.050>.
- [27] K. Gaudin, L. Ferey, Quality by design: A tool for separation method development in pharmaceutical laboratories, *LC-GC Eur.* 29 (2016) 16–25.
- [28] C. Hubert, Gestion du risque associé au cycle de vie des méthodes analytiques, Thèse de doctorat, Université de Liège, 2014. http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-09302015-140101/unrestricted/These_de_doctorat_CEDRIC_HUBERT.pdf.
- [29] B. Debrus, P. Lebrun, J.M. Kindenge, F. Lecomte, A. Ceccato, G. Caliaro, J.M.T. Mbay, B. Boulanger, R.D. Marini, E. Rozet, Ph. Hubert, Innovative high-performance liquid chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach, using design of experiments, independent component analysis and design space, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5205–5215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.102>.
- [30] J.K. Mbinze, A. Dispas, P. Lebrun, J.M.T. Mbay, V. Habyalimana, N. Kalenda, E. Rozet, Ph. Hubert, R.D. Marini, Application of an innovative design space optimization strategy to the development of LC methods for the simultaneous screening of antibiotics to combat poor quality medicines, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 85 (2013) 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.036>.
- [31] V. Habyalimana, J.K. Mbinze, A.L. Yemoa, C. Waffo, T. Diallo, N.K. Tshilombo, J.-L.K. Ntokamunda, P. Lebrun, P. Hubert, R.D. Marini, Application of design space optimization strategy to the development of LC methods for simultaneous analysis of 18 antiretroviral medicines and 4 major excipients used in various pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 139 (2017) 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.040>.
- [32] L. Ferey, A. Raimbault, I. Rivals, K. Gaudin, UHPLC method for multiproduct pharmaceutical analysis by Quality-by-Design, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018) 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.014>.
- [33] A. Dispas, H.T. Avohou, P. Lebrun, P. Hubert, C. Hubert, ‘Quality by Design’ approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances, *TrAC Trends Anal. Chem.* 101 (2018) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.028>.
- [34] C. Boussès, L. Ferey, E. Vedrines, K. Gaudin, Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a

- stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115 (2015) 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.07.003>.
- [35] J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'guyen-Huu, R. Russotto, Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie, *STP Pharma Prat. Tech. Réglementations*. 2 (1992) 205–226.
- [36] The international Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, (2005). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (accessed September 15, 2020).
- [37] P. Hubert, P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, C. Nivert, L. Valat, Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches, (2003). <https://doi.org/null>.
- [38] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.027>.
- [39] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>.
- [40] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 82–96. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.032>.
- [41] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 760–771. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.07.018>.

- [42] V. Viaud, Développements de méthodes CLHP pour le dosage de l'azithromycine et d'un dérivé d'artémisinine dans des co-formulations pour le traitement des fièvres de l'enfant en milieu tropical, Université de Bordeaux, 2009.
- [43] F. Krier, M. Brion, B. Debrus, P. Lebrun, A. Driesen, E. Ziemons, B. Evrard, P. Hubert, Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.10.022>.
- [44] A. Dispas, V. Desfontaine, B. Andri, P. Lebrun, D. Kotoni, A. Clarke, D. Guillarme, P. Hubert, Quantitative determination of salbutamol sulfate impurities using achiral supercritical fluid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134 (2017) 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.039>.
- [45] A.L. Assassi, C.-E. Roy, P. Perovitch, J. Auzerie, T. Hamon, K. Gaudin, Green analytical method development for statin analysis, *J. Chromatogr. A.* 1380 (2015) 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.066>.
- [46] Validation of an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to quantify illicit drug and pharmaceutical residues in wastewater using accuracy profile approach, *J. Chromatogr. A.* 1500 (2017) 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.028>.
- [47] D.H. Shewiyo, E. Kaale, P.G. Risha, B. Dejaegher, J. De Beer, J. Smeyers-Verbeke, Y. Vander Heyden, Accuracy profiles assessing the validity for routine use of high-performance thin-layer chromatographic assays for drug formulations, *J. Chromatogr. A.* 1293 (2013) 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.074>.
- [48] J.K. Mbinze, P.-Y. Sacré, A. Yemoa, J. Mavar Tayey Mbay, V. Habyalimana, N. Kalenda, Ph. Hubert, R.D. Marini, E. Ziemons, Development, validation and comparison of NIR and Raman methods for the identification and assay of poor-quality oral quinine drops, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 111 (2015) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.049>.
- [49] M.A. Mansouri, P.-Y. Sacré, L. Coïc, C. De Bleye, E. Dumont, A. Bouklouze, P. Hubert, R.D. Marini, E. Ziemons, Quantitation of active pharmaceutical ingredient through the packaging using Raman handheld spectrophotometers: A comparison study, *Talanta.* 207 (2020) 120306. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120306>.
- [50] OMS, Malaria. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (accessed September 10, 2020).

- [51] OMS, Paludisme. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (accessed September 25, 2020).
- [52] OMS, Rapport sur le paludisme dans le monde 2019, WHO. (2019). <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/report/fr/> (accessed September 25, 2020).
- [53] G.J. Yaméogo, Nano-assemblages à base de cyclodextrines modifiées chargés d'artémisinine pour le traitement du paludisme grave, Thèse de doctorat, Université de Grenoble, 2012. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00767116/document> (accessed September 10, 2020).
- [54] Institut Pasteur, Paludisme : informations et traitements. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/paludisme> (accessed September 25, 2020).
- [55] M.A. van Agtmael, T.A. Eggelte, C.J. van Boxtel, Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01302-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01302-4).
- [56] OMS | Traitement du paludisme - tour d'horizon, WHO. <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/fr/> (accessed September 25, 2020).
- [57] WHO, Guidelines for the treatment of malaria, World health organization, Geneva, 2015.
- [58] G.M. Nayyar, J.G. Breman, P.N. Newton, J. Herrington, Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa, *Lancet Infect. Dis.* 12 (2012) 488–496. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70064-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70064-6).
- [59] P.N. Newton, P. Taberner, P. Dwivedi, M.J. Culzoni, M.E. Monge, I. Swamidoss, D. Mildenhall, M.D. Green, R. Jähnke, M. dos S. de Oliveira, J. Simao, N.J. White, F.M. Fernández, Falsified medicines in Africa: all talk, no action, *Lancet Glob. Health.* 2 (2014) e509–e510. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70279-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70279-7).
- [60] C. Charrier, G. Bertho, O. Petigny, P. Moneton, R. Azerad, A new derivative detected in accelerated ageing of artesunate-amodiaquine fixed dose combination tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 81 (2013) 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.009>.
- [61] K. Gaudin, M.-H. Langlois, A. Barbaud, C. Boyer, P. Millet, F. Fawaz, J.-P. Dubost, Stability of artesunate in pharmaceutical solvents, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.09.039>.

- [62] V.G. Dongre, P.P. Karmuse, P.D. Ghugare, S.K. Kanojiya, S. Rawal, Investigation of amodiaquine bulk drug impurities by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2227–2233. <https://doi.org/10.1002/rcm.3605>.
- [63] L. Hoellein, U. Holzgrabe, Development of simplified HPLC methods for the detection of counterfeit antimalarials in resource-restraint environments, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.06.013>.
- [64] P.T. Anastas, Green Chemistry and the role of analytical methodology development, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167–175. <https://doi.org/10.1080/10408349891199356>.
- [65] P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 686–694. <https://doi.org/10.1021/ar010065m>.
- [66] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, 2000.
- [67] L.H. Keith, L.U. Gron, J.L. Young, Green Analytical Methodologies, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2695–2708. <https://doi.org/10.1021/cr068359e>.
- [68] M. Tobiszewski, A. Mechlińska, J. Namieśnik, Green analytical chemistry—theory and practice, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 2869–2878. <https://doi.org/10.1039/B926439F>.
- [69] H.M. Mohamed, Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.010>.
- [70] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [71] A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.
- [72] J. Płotka-Wasyłka, A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index, *Talanta*. 181 (2018) 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.013>.
- [73] J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 578–591. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.012>.
- [74] M. Koel, Do we need Green Analytical Chemistry?, *Green Chem.* 18 (2016) 923–931. <https://doi.org/10.1039/C5GC02156A>.

- [75] D. Bertrand, La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale, *INRAE Prod. Anim.* 15 (2002) 209–219. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2002.15.3.3702>.
- [76] D. Andueza, Utilisation de la spectroscopie dans le proche infrarouge et de la spectroscopie de fluorescence pour estimer la qualité et la traçabilité de la viande, (2015) 11.
- [77] P. Guinot, H. Rebière, Techniques analytiques au service de la lutte contre la falsification des médicaments, (2017) 27.
- [78] P.H. Ciza, P.-Y. Sacre, C. Waffo, L. Coïc, H. Avohou, J.K. Mbinze, R. Ngonu, R.D. Marini, P. Hubert, E. Ziemons, Comparing the qualitative performances of handheld NIR and Raman spectrophotometers for the detection of falsified pharmaceutical products, *Talanta*. 202 (2019) 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.049>.
- [79] R. Deidda, P.-Y. Sacre, M. Clavaud, L. Coïc, H. Avohou, P. Hubert, E. Ziemons, Vibrational spectroscopy in analysis of pharmaceuticals: Critical review of innovative portable and handheld NIR and Raman spectrophotometers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 114 (2019) 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.035>.
- [80] Chapitre 5.21. méthodes chimiométriques appliquées aux données analytiques, in: *Pharmacopée Eur.* 90, 2016: pp. 843–861.
- [81] M. Blanco, I. Villarroya, NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 240–250. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1).
- [82] Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683–700. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.023>.
- [83] O.Ye. Rodionova, A.L. Pomerantsev, NIR-based approach to counterfeit-drug detection, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 795–803. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.004>.
- [84] A. Candolfi, R. De Maesschalck, D. Jouan-Rimbaud, P.A. Hailey, D.L. Massart, The influence of data pre-processing in the pattern recognition of excipients near-infrared spectra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 115–132. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00125-9).
- [85] S. Kovacs, S.E. Hawes, S.N. Maley, E. Mosites, L. Wong, A. Stergachis, Technologies for Detecting Falsified and Substandard Drugs in Low and Middle-Income Countries, *PLoS ONE*. 9 (2014) e90601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090601>.

- [86] C. Pasquini, Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review, *Anal. Chim. Acta.* 1026 (2018) 8–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.004>.
- [87] D. BASTIANELLI, L. BONNAL, P. BARRE, S. NABENEZA, P. SALGADO, D. ANDUEZA, La spectrométrie dans le proche infrarouge pour la caractérisation des ressources alimentaires, *INRAE Prod. Anim.* 31 (2018) 237–254. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2018.31.2.2330>.
- [88] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, Greening analytical chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 667–680. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.008>.
- [89] J. Płotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, J. Namieśnik, Green chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1307 (2013) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>.
- [90] M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 943–951. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>.
- [91] H. Shaaban, New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6929–6944. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9726-2>.
- [92] M. Tobiszewski, J. Namieśnik, Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 35 (2012) 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.006>.
- [93] A.J. Santos-Neto, K.E. Markides, P.J.R. Sjöberg, J. Bergquist, F.M. Lancas, Capillary Column Switching Restricted-Access Media-Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry System for Simultaneous and Direct Analysis of Drugs in Biofluids, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6359–6367. <https://doi.org/10.1021/ac070671g>.
- [94] E. Yamamoto, T. Sakaguchi, T. Kajima, N. Mano, N. Asakawa, Novel methylcellulose-immobilized cation-exchange precolumn for on-line enrichment of cationic drugs in plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 807 (2004) 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.028>.
- [95] S. Strano-Rossi, L. Anzillotti, E. Castrignanò, M. Felli, G. Serpelloni, R. Mollica, M. Chiarotti, UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 609–624. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5108-y>.

- [96] R. Jarmalavičienė, O. Kornyšova, V. Bendokas, D. Westerlund, B. Buszewski, A. Maruška, Restricted-access media development for direct analysis of drugs in biofluids using capillary liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2323–2328. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2024-x>.
- [97] A.I. Olives, V. González-Ruiz, M.A. Martín, Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 5618–5634. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01012>.
- [98] J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns, *Anal. Chem.* 69 (1997) 983–989. <https://doi.org/10.1021/ac961094r>.
- [99] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography, *Chromatographia.* 76 (2013) 1429–1437. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2434-6>.
- [100] V.G. Dongre, P.P. Karmuse, P.P. Rao, A. Kumar, Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.09.012>.
- [101] T.A. Miranda, P.H. Silva, G.A. Pianetti, I.C. César, Simultaneous quantitation of chloroquine and primaquine by UPLC-DAD and comparison with a HPLC-DAD method, *Malar. J.* 14 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0570-1>.
- [102] M.K. Abd El-Rahman, E. Fawaz, E.M. Abdel-Moety, A.M.A. Al-Alamein, UPLC-PDA: A greener miniaturized tool for the analysis and purity assessment of ebastine and phenylephrine hydrochloride, *Microchem. J.* 159 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105400>.
- [103] C. Vishnuvardhan, R. Srinivas, N. Satheeshkumar, Development and validation of a UPLC method for screening potentially counterfeit anti-hypertensive drugs using design of experiment, *Anal. Methods.* 6 (2014) 4610–4616. <https://doi.org/10.1039/c4ay00384e>.
- [104] G. Nagamallika, M. Arunadevi, A rapid separation and quantification of nicotine and nicotine related substances using UPLC in pharmaceutical formulations, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (2014) 524–529.
- [105] B. Otašević, S. Milovanović, M. Zečević, J. Golubović, A. Protić, UPLC method for determination of moxonidine and its degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage form, *Chromatographia.* 77 (2014) 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2580-x>.


- [106] C.S.N. Malleswararao, M.V. Suryanarayana, K. Mukkanti, Simultaneous Determination of Sitagliptin Phosphate Monohydrate and Metformin Hydrochloride in Tablets by a Validated UPLC Method, *Sci. Pharm.* 80 (2012) 139–152. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1110-13>.
- [107] D. Mohamed, M.M. Fouad, Application of NEMI, Analytical Eco-Scale and GAPI tools for greenness assessment of three developed chromatographic methods for quantification of sulfadiazine and trimethoprim in bovine meat and chicken muscles: Comparison to greenness profile of reported HPLC methods, *Microchem. J.* 157 (2020) 104873. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104873>.
- [108] V.S. Veer, S.G. Pingale, K.V. Mangaonkar, Ultra performance liquid chromatography method for simultaneous determination of atovaquone and proguanil in rabbit plasma and its application to a pharmacokinetic study, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37 (2014) 1953–1967. <https://doi.org/10.1080/10826076.2013.825854>.
- [109] R. El-Bagary, H.M.E. Azzazy, E.F. ElKady, F. Farouk, Simultaneous determination of sildenafil citrate and some nitric oxide releasing drugs in human plasma using UPLC MS/MS, *Clin. Biochem.* 47 (2014) 654–656. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.03.009>.
- [110] R. Berta, M. Babják, M. Gazdag, A study of some practical aspects of high temperature liquid chromatography in pharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.012>.
- [111] C.V. McNeff, B. Yan, D.R. Stoll, R.A. Henry, Practice and theory of high temperature liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1672–1685. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600526>.
- [112] S. Koppala, B. Panigrahi, S.V.N. Raju, K. Padmaja Reddy, V. Ranga Reddy, J.S. Anireddy, Development and validation of a simple, sensitive, selective and stability-indicating RP-UPLC method for the quantitative determination of ritonavir and its related compounds, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 662–675. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu097>.
- [113] H. Shaaban, T. Górecki, Fused core particles as an alternative to fully porous sub-2 μm particles in pharmaceutical analysis using coupled columns at elevated temperature, *Anal. Methods*. 4 (2012) 2735. <https://doi.org/10.1039/c2ay25202c>.
- [114] F. Chartier, La chimie analytique verte, *Tech. Ing.* (2013) 29.
- [115] K. Sandra, A. Pereira, F. David, P. Sandra, G. Vanhoenacker, Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography, *LCGC Eur.* 23 (2010) 242–259.

- [116] G. D’Orazio, A. Rocco, S. Fanali, Fast-liquid chromatography using columns of different internal diameters packed with sub-2 μ m silica particles, *J. Chromatogr. A.* 1228 (2012) 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.053>.
- [117] M. Hilhorst, C. Briscoe, N. van de Merbel, Sense and nonsense of miniaturized LC–MS/MS for bioanalysis, *Bioanalysis.* 6 (2014) 3263–3265. <https://doi.org/10.4155/bio.14.263>.
- [118] M.E. Salih, A. Aqel, B.Y. Abdulkhair, Z.A. Alothman, M.A. Abdulaziz, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, Simultaneous Determination of Paracetamol and Chlorzoxazone in Their Combined Pharmaceutical Formulations by Reversed-phase Capillary Liquid Chromatography Using a Polymethacrylate Monolithic Column, *J. Chromatogr. Sci.* 56 (2018) 819–827. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy058>.
- [119] R. Gotti, J. Fiori, E. Calleri, C. Temporini, D. Lubda, G. Massolini, Chiral capillary liquid chromatography based on penicillin G acylase immobilized on monolithic epoxy silica column, *J. Chromatogr. A.* 1234 (2012) 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.048>.
- [120] Y. Otsuki, A. Kotani, F. Kusu, Capillary liquid chromatography with UV detection using N,N-diethyl dithiocarbamate for determining platinum-based antitumor drugs in plasma, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 60 (2012) 665–669. <https://doi.org/10.1248/cpb.60.665>.
- [121] G. D’Orazio, S. Rocchi, S. Fanali, Nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry: Separation of sulfonamides employing non-porous core–shell particles, *J. Chromatogr. A.* 1255 (2012) 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.032>.
- [122] J. Liu, Z. Zhao, Y. Teffera, Application of on-line nano-liquid chromatography/mass spectrometry in metabolite identification studies, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 320–326. <https://doi.org/10.1002/rcm.5332>.
- [123] Y. Gao, M. Skutsch, R. Drigo, P. Pacheco, O. Masera, Assessing deforestation from biofuels: methodological challenges, *Applied Geography.* 31 (2011) 508–518.

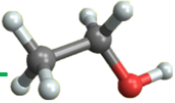
Chapitre 2 : Stratégie de développement de méthode de CLHP verte : application au dosage d'artésunate et d'amodiaquine

Green Analytical Chemistry

RP-HPLC method optimization



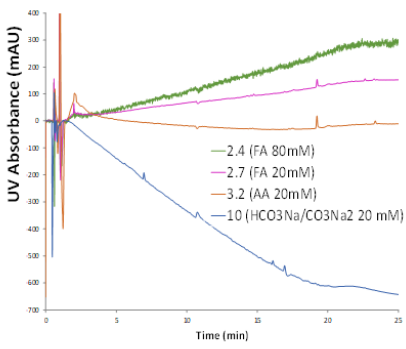
Green organic modifier



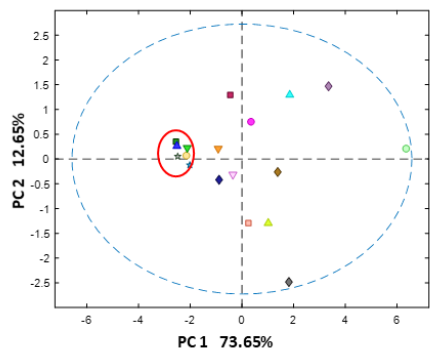
ETHANOL

Screening of chromatographic parameters

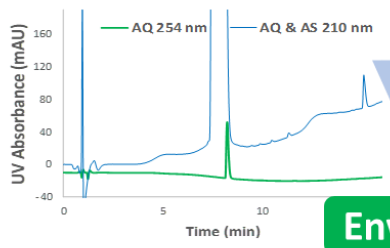
Green pH modifier



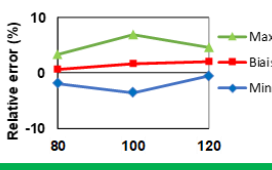
Stationary phase




Quality control in pharmaceutical industry



VALIDATION





Q2(R1)

Environment and health safety

Contexte du chapitre 2

Dans ce chapitre, nous avons évalué quels sont les paramètres cruciaux à prendre en compte pour effectuer un développement en CLHP à polarité de phases inversée avec la contrainte d'utiliser l'éthanol comme unique solvant organique et des modificateurs de pH verts.

L'analyse a porté sur l'association artésunate / amodiaquine. Il s'agit d'un cas intéressant qui propose un modèle d'étude rassemblant plusieurs difficultés : d'une part des molécules qui s'ionisent différemment, l'une négativement (artésunate) l'autre positivement (amodiaquine) ; et qui absorbent l'une dans le visible (amodiaquine), l'autre absorbant peu au dessus de 210 nm (artésunate). L'amodiaquine va poser des problèmes en termes de symétrie de pics dûs aux interactions ioniques qu'elle peut faire avec les silanols libres de la phase stationnaire qui s'ionisent négativement. Et d'autre part, nous avons dû avoir recours à une analyse en mode gradient et donc faire face à une dérive importante de la ligne de base accentuée par l'utilisation de l'éthanol et des modificateurs de pH, ce qui peut être critique pour la détection de composés absorbant peu en UV comme l'artésunate.

Dans cette étude, différents modificateurs de pH choisis pour leur caractère vert ont été criblés et leur impact sur la forme des pics et la détection des composés ont été investigués. En choisissant, dès le début, l'éthanol comme solvant d'élution, les paramètres d'optimisation se trouvent limités. C'est pourquoi, 19 phases stationnaires ont été testées afin d'étudier leur influence sur la forme des pics et la sélectivité des composés. L'étude a été réalisée en collaboration avec la société Interchim qui nous a fourni des colonnes. Afin d'avoir des résultats plus probants, d'autres molécules structurellement proches de l'artésunate et de l'amodiaquine ont été analysées au cours de cette phase de criblage. En se basant sur les résultats du criblage des paramètres critiques, des méthodes ont été ensuite optimisées et validées selon la stratégie de l'erreur totale pour le dosage de l'artésunate et de l'amodiaquine dans des comprimés. Le caractère vert des méthodes développées, a été évalué et comparé à d'autres méthodes décrites dans la littérature en utilisant différents outils comme le NEMI, l'« *eco-scale* » analytique et le GAPI. Enfin, les méthodes ont été utilisées avec succès pour doser l'artésunate et l'amodiaquine dans des comprimés. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le « *journal of separation science* ».

Article 2

Green reversed-phase HPLC development strategy: application to artesunate and amodiaquine analysis

Journal of separation science. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000732>

Moussa Yabré^{1,2}, Ludivine Ferey^{1*}, Issa Touridomon Somé², Olivier Mercier³, Karen Gaudin¹

1 ChemBioPharm Team, ARNA Laboratory, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France

2 Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé (LATES), Université Joseph Ki-Zerbo, Ouaga 03 BP 7021, Burkina Faso

3 Interchim, 211 bis avenue JF Kennedy, 03100 Montluçon, France

Received 06 July 2020, Accepted 09 October 2020

Key words: accuracy profile, amodiaquine, artesunate, ethanol, green chromatography

1. Introduction

Among analytical techniques, reversed phase (RP) HPLC is commonly used in pharmaceutical industry for quality control [1]. Consequently, around the world, each liquid chromatography equipment can potentially generate 1–1.5 L of liquid waste daily, leading to important issues for environment and operator health [2,3]. To meet this global challenge, the concept of Green Analytical Chemistry (GAC) has emerged from green chemistry and has gained increasing interest and acceptance among researchers [4–6]. Greening analytical chemistry offers the advantage to decrease the environmental impact while increasing operator safety, thus constituting a topic of interest for industrial groups [7–9]. The principles of GAC lie mainly in eliminating or reducing hazardous chemicals from analytical processes without compromising method performance [10,11]. Several guidelines have been published to develop green HPLC methods [2,3,12]. One strategy aims at eliminating toxic solvent consumption through a replacement of classically used organic solvents by greener ones [13,14]. In RP-HPLC, acetonitrile and methanol are the two common organic solvents used because of the low viscosity of their mixture with water and their low UV cut-off wavelength. However, they present health and environment issues [15,16]. In fact, they have been ranked as hazardous solvents because of their inherent toxicity and the great requirements to dispose their waste. Ethanol is a relevant green alternative solvent for RP-HPLC due to its sourcing, safety of handling by operators and low-cost [17]. But it presents some limitations for its routine use such as high UV cut-off wavelength, high viscosity especially when mixed with water, causing high backpressure [14,18], and the restrictions in trading. However, its UV absorbance is equivalent to methanol (*Figure 1A*) and ethanol has an eluotropic strength close to acetonitrile [3]. Unfortunately, the use of green analytical methods is still limited in pharmaceutical industry partly explained by regulatory texts such as the Pharmacopeia monographs which impose methods usually not ecofriendly [19]. Another reason is the lack of knowledge and experience about such new analytical approach.

This work is a contribution to the development of green analytical RP-HPLC methods by simply replacing the reagents in the mobile phase by green ones still using conventional apparatus. So, equipment or technology with better performance are not required, leading to cheaper methods for pharmaceutical analysis. Selectivity optimization is probably the most important aspect of HPLC method development as it influences the resolution of a separation and therefore the accuracy of quantification. The organic solvent of the mobile phase is an important parameter to tune the selectivity. Consequently, limiting the choice to ethanol reduces

the possibility for selectivity optimization. In addition, the high UV cut-off wavelength of ethanol has an impact on the accuracy of quantification, especially in the case of a gradient elution. So, greening RP-HPLC methods by substituting conventional solvents with ethanol requires new methodology of development. Artesunate (AS) and amodiaquine (AQ) therapeutic association is one of the WHO-recommended Artemisinin-based combination therapies to treat uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. In the International Pharmacopeia [20], the quantitative analysis of artesunate and amodiaquine in finished products is performed by two different RP-HPLC methods using acetonitrile and methanol for AS and AQ, respectively. Since AS and AQ fixed dose combination tablets are available on the market, a unique method allowing to quantify both active pharmaceutical ingredients (API) in the pharmaceutical product would be highly useful. Such method development is particularly challenging because of the antagonist physico-chemical properties of AS and AQ (Supporting information *Table SI*). These two APIs have large differences in UV absorption. Amodiaquine highly absorbs in UV and also in visible, whereas AS poorly absorbs in UV due to its lack of chromophore in its structure (*Figure 1B*). Moreover, these two compounds have different log P values, and considering their pKa values, there is not a common pH value at which both compounds are in their neutral forms. Besides, AQ is mainly positively charged at pH values under 9. Therefore, the elution of AQ may result in a high peak tailing in RP-HPLC due to its interaction with residual silanols of the stationary phase. To overcome symmetry peak concern for AQ, triethylamine is added to the mobile phase in the International Pharmacopeia method. In fact, triethylamine compete with AQ for interacting with the stationary phase, thus improving its peak shape. However, this reagent may stick to the columns and may only be removed after extensive flushing procedures, consuming high volumes of mobile phase and time, which is contrary to green chemistry principles. In the literature, there are some publications about the simultaneous HPLC analysis of AS and AQ in formulations [21–24], but they have not been developed according to green analytical chemistry criteria. Also, AQ peak appears asymmetrical except in one publication where an ion-pairing agent (octanesulfonate) was added to improve AQ peak shape [23].

The objective of this study was to develop a single and green RP-HPLC method for the analysis of AS and AQ in formulations using ethanol as organic modifier. To support this investigation and for a more comprehensive approach of the development, some AQ and AS structurally related molecules were added to the study (Supporting information *Table SI*). A new strategy of development was followed to satisfy green chemistry principles and to tackle

difficulties intrinsic to the use of ethanol and green pH modifiers. The main limitation of ethanol was due to its low UV cut-off which affects the detection of weak UV chromophore such as AS, especially in gradient mode. The impact of the nature and the concentration of green pH modifiers on the detection of low absorbing compounds was also studied. The pH of the mobile phase and the stationary phase were investigated as critical parameters on peak shape, which was of major concern for this development, especially for AQ peak. Up to 19 columns featuring different chemistry to reduce the number of residual silanols or to limit their access were screened using Principal Component Analysis. This work demonstrates how green RP-HPLC methods can be developed for quality control of pharmaceutical products while keeping good method performance [25].

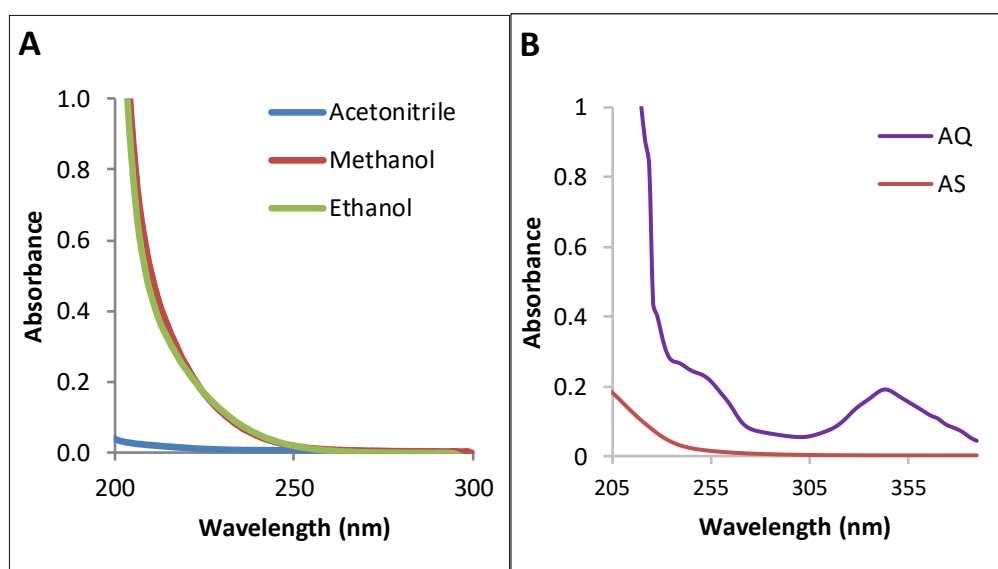


Figure 1. UV spectra; **A:** HPLC solvents; **B:** AQ at 0.005 mg/mL in 10 mM formic acid and AS at 0.1 mg/mL in 10 mM formic acid in EtOH

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Amodiaquine hydrochloride (AQ, > 99%) and artesunate (AS, > 99%) United States Pharmacopeia (USP) reference standards, chloroquine diphosphate (CQ, 99%), and 7-chloro-4-(4-hydroxyphenylamino)quinolone (CHPAQ) were supplied from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). 4-acetamido-2-diethylaminomethylphenol (ADEAMP, > 95%) was purchased from Carbosynth Ltd (Berkshire, UK). Dihydroartemisinin (DHA) was bought from Mangalam

Drugs and organics Ltd (India). Tablet excipients (microcrystalline cellulose, maize starch, croscarmellose sodium, crospovidone, povidone, talc, magnesium stearate, colloidal silica, and calcium carbonate) were kindly provided by LTPIB (Laboratoire de Technologie Pharmaceutique Industrielle de Bordeaux, France). Ethanol (EtOH) 96% HPLC grade, acetic acid (AA) HPLC grade ($\geq 99.9\%$), formic acid (FA) LC/MS grade (99%), and ammonium acetate (AcNH₄) (99%) were purchased from VWR chemicals (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium formate was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). HPLC grade water (minimum resistivity of 18.2 M Ω) was produced in house by ELGA Millipore system (France). Artesunate/amodiaquine 100 mg / 270 mg fixed dose tablets were from Sanofi Winthrop (Morocco).

2.2. Instrumentation

Column screening was performed on an Accela UHPLC system (Thermo Scientific, USA) equipped with a pumping device, an autosampler, a column oven, and a diode array detector. Method optimization and validation was performed on a Dionex U3000 system (Thermo Scientific, USA) equipped with a pumping device, an autosampler, a column oven, and a diode array detector. UV spectra of AS, AQ, solvents, and pH modifiers were acquired with the UV-Visible spectrophotometer Evolution 201 (from Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3. Analytical conditions

2.3.1. pH and stationary phase screenings

All analyzes were performed in gradient mode. Mobile phase A was an aqueous solution with pH modifiers to reach the desired pH. *Table 1* describes the composition of pH modifiers added to mobile phases during pH screening. Mobile phase B was composed of 96% EtOH (v/v) containing the same nature and concentration of pH modifiers as mobile phase A to prevent an ionic concentration change during the gradient. Because of their low solubility in EtOH, carbonate modifiers were not added in the corresponding mobile phase B. The gradient profile consisted in a linear ramp from 5% to 100% of mobile phase B, which corresponded to a variation of 91.2 % in pure ethanol from 4.8% to 96%.

Table 1. pH values tested during the screening study and composition of green pH modifiers in mobile phases

pH of aqueous mobile phase A	Composition of pH modifiers
2.40	80 mM FA
2.70	20 mM FA
2.85	10 mM FA
3.20	20 mM AA
5.00	20 mM AcNH ₄ pH adjusted with 20 mM AA
6.90	20 mM AcNH ₄
10.00	20 mM CO ₃ Na ₂ , pH adjusted with 20 mM HCO ₃ Na

Table 2 summarizes the various columns studied during screening. Because columns had not the same dimensions, the gradient time applied for each column was adapted using the following formula for comparison purpose [26]:

$$T_G = k^* S \cdot \Delta\%_{strong\ solvent} \frac{V_m}{F}$$

With T_G the gradient time in min; k^* : the gradient retention factor; F : the flow rate in mL/min; S : the shape selectivity factor; V_m : the dead volume of the column, and $\Delta\%$: the increase in mobile phase B. Parameters were fixed as followed: $k^*=5$, $S=5$ (for analytes < 1000 Da), and $\Delta\% = 0.912 \approx 1$, consequently $T_G = 25 V_m/F$.

Flow rate and injection volume were fixed depending on column dimensions (*Table 2*). Column temperature was fixed at 30°C.

Chromatograms were systematically recorded in UV from 200 to 400 nm for peak identification. Peak integrations were performed at 210 nm for AS and DHA, and at 254 nm for AQ, CQ, CHAPQ, and ADEAMP.

Peak shape was evaluated through the symmetry factor (A_s) which was calculated from the expression as specified in the European Pharmacopeia chapter 2.2.46 [27]:

$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$ where $w_{0.05}$ is the width of the peak at 5% of its height and d is the distance between the perpendicular dropped from the peak apex and the leading edge of the peak at 5% of its height.

Table 2. Stationary phases tested during column screening

Columns	Brand	L (mm)	i.d (mm)	dp (μ m)	Grafting	Silica type	Inc. grp.	T _G (min)	F (mL/min)	Inj. vol. (μ L)
Acquity UPLC HSS C18	Waters	50	2.1	1.8	Trifunctional C18	End-capped		6	0.5	5
Aeris widepore XB-C18	Phenomenex	50	2.1	3.6	C18	End-capped		6	0.5	5
Accucore C18	Thermo Scientific™	50	4.6	2.6	C18	End-capped		10	1.0	10
Cortecs C18+	Waters	100	3.0	2.7	Trifunctional C18	End-capped	Yes	18	0.5	10
Luna Omega Polar C18	Phenomenex	50	2.1	1.6	Hydrophilic / C18	End-capped	Yes	6	0.5	5
Luna Omega PS C18	Phenomenex	50	2.1	1.6	Hydrophilic / C18	End-capped	Yes	6	0.5	5
PuriFlash BIO 100 C18-XS	Interchim	150	3.0	5	Monofunctional C18	End-capped		29	0.5	10
Supelcosil ABZ+Plus	Supelco	150	3.0	5	C18	Deactivated silica	Yes	33	0.5	10
Uptisphere C18-NEC	Interchim	150	3.0	5	Monofunctional C18	No end-capping		29	0.5	10
Uptisphere C18-ODB	Interchim	150	3.0	5	Monofunctional C18	End-capped		31	0.5	10
Uptisphere PLP	Interchim	150	3.0	5	Polyfunctionnal	End-capped	Yes	38	0.5	10
Uptisphere Strategy C12	Interchim	150	3.0	5	Monofunctional C12	End-capped		29	0.5	10
Uptisphere Strategy C18-HQ	Interchim	150	3.0	5	Monofunctional C18	End-capped		27	0.5	10
Uptisphere Strategy C18-RP	Interchim	150	3.0	5	Monofunctional C18	End-capped		27	0.5	10
XBridge BEH C18	Waters	150	3.0	5	Trifunctional C18	Ethylene hybrid		20	0.5	10
XBridge BEH Shield RP18	Waters	50	4.6	2.5	Trifunctional C18	Ethylene hybrid	Yes	12	1.0	10
XTerra Phenyl	Waters	150	4.6	3.5	Phenyl	Methylene hybrid		43	1.0	10
XTerra RP18	Waters	150	4.6	3.5	C18	Methylene hybrid		39	1.0	10
YMC-ODS-AQ	YMC	150	4.6	3.5	Hydrophilic / C18	End-capped	Yes	45	1.0	10

L: length, i.d: internal diameter, dp: particle size, Inc. grp: incorporated group, Inj. Vol.: injection volume.

2.3.2. Artesunate and amodiaquine quantification method

Quantification methods for AS and AQ were validated on three columns: XBridge BEH C18 (150 x 3 mm; 5 μ m) from Waters (Milford, Massachusetts, United States), Uptisphere Strategy C18-RP (150 x 3 mm; 5 μ m) from Interchim (Montluçon, France), and Luna Omega Polar C18 (50 x 2.1 mm; 1.6 μ m) from Phenomenex (Torrance, California, United States) (Table 2). A gradient elution was used. Mobile phase A was an aqueous solution with 10 mM FA (pH 2.85). Mobile phase B was composed of 96% EtOH containing 10 mM FA. The gradient profile consisted in a linear ramp from 5% to 85% of mobile phase B. A gradient slope of 3.85 %/min of mobile phase B was used for the XBridge BEH C18 and Uptisphere Strategy C18-RP columns. For the Luna Omega Polar C18 column, a slope of 5.4 %/min was used. Flow rate was set at 0.4 mL/min for XBridge BEH C18 and Uptisphere Strategy C18-RP columns and at 0.2 mL/min for the Luna Omega Polar C18 one. Injection volume was 10 μ L for XBridge BEH C18 and Uptisphere Strategy C18-RP columns and 5 μ L for the Luna Omega Polar C18 one. Column temperature was fixed at 30°C. Detection was performed at 210 nm for AS and 254 nm for AQ.

2.4. Sample preparations

2.4.1. Screening phase

Stock solutions for AQ, CQ, CHPAQ and ADEAMP were prepared at 1 mg/mL in 96% EtOH. Stock solutions for AS and DHA were prepared at 5 mg/mL in 96% EtOH. Working solutions of AQ, CQ, CHPAQ and ADEAMP were prepared at 0.015 mg/mL by diluting stock solutions in water/96% EtOH (95/5, v/v). Working solutions of AS and DHA were prepared at 1 mg/mL by diluting stock solutions in water/96% EtOH (50/50, v/v) for solubility reasons.

2.4.2. Artesunate and amodiaquine method validation

An excipient mixture was prepared in water/96% EtOH (50/50, v/v) and centrifugated. The supernatant was then injected to assess method specificity.

Method linearity, precision, and accuracy were assessed using total error approach based on accuracy profile. For the calibration set, one concentration level (100%) was used corresponding to 0.5 mg/mL for AS and 0.0135 mg/mL for AQ. AS calibration standard was prepared by dissolving 25.0 mg of reference standard in a volumetric flask of 50 mL using water/96% EtOH (50/50, v/v) as dilution solvent. AQ calibration standard was prepared by dissolving 67.5 mg of reference standard in a volumetric flask of 50 mL using water/96% EtOH (50/50, v/v) as dilution solvent. This solution was then diluted by 100 with water/96% EtOH

(95/5, v/v) to reach a concentration of 0.0135 mg/mL for AQ. Calibration standards were prepared in duplicate. For the validation set, three concentration levels: 80%, 100%, and 120 % were used for each compound corresponding to: 0.4, 0.5, and 0.6 mg/mL for AS and 0.0108, 0.0135, and 0.0162 mg/mL for AQ. Validation standards were prepared in triplicate. For AS validation standards, solutions were obtained by weighting the appropriate amount of AS, AQ, and the excipient mixture and dissolving them in a volumetric flask of 50 mL with water/96% EtOH (50/50, v/v) to reach the desired concentration of AS (0.4, 0.5 and 0.6 mg/mL) and a concentration of AQ according to the level (1.08, 1.35, and 1.62 mg/mL). Preparations were then centrifugated before injection. For AQ validation standards, AS validation standards were diluted by a factor of 100 in water/96% EtOH (95/5, v/v) to reach the desired concentrations: 0.0108 mg/mL, 0.0135 mg/mL, and 0.0162 mg/mL. The whole validation procedure was repeated at three different days.

2.4.3. Tablet analysis

Tablets from 2 different batches were analyzed. Tablets were weighed and powdered. A quantity of powder containing about 25 mg of AS (corresponding to about 67.5 mg of AQ) was transferred to a 50 mL volumetric flask and dissolved in water/96% EtOH (50/50, v/v) to obtain a preparation at a concentration of 0.5 mg/mL for AS and 1.35 mg/mL for AQ. This solution was then centrifugated and the supernatant was directly injected to determine the content of AS in the tablets. For AQ quantification in tablets, the supernatant was diluted by a factor of 100 using water/96% EtOH (95/5, v/v), as dilution solvent.

2.5. Software

Principal Component Analysis (PCA) was performed using PLS_Toolbox (version 8.2.1.) in MATLAB environment (R2015a), using peak symmetry factors as variables which were “mean centered” i.e. the average was subtracted from each variable.

3. Results and discussion

This study was devoted to the development of a green RP-HPLC method for AQ and AS quantitative analysis in pharmaceutical tablets. To support such methodology of development in green chromatography, additional compounds with closely related structures to AS and AQ were added to the study. One objective of this work was to identify critical parameters impacting method performance such as selectivity and peak shape, that need to be taken into account when ethanol is used as an organic modifier to green RP-HPLC methods. These compounds were structurally related molecules to either AQ or AS (Supporting

information *Table S1*). CHPAQ and ADEAMP are related substances produced during AQ synthesis while CQ is a basic active substance with antimalarial properties which is used in the suitability test of AQ quantification in the International Pharmacopeia [20]. DHA is the main degradation product and the active metabolite of AS.

3.1. Screening phase

This step consisted in evaluating the effects of the pH and the nature of pH modifiers of the mobile phase, and the stationary phase on peak shape since it was found to be of major concern in this method development due to the acido-basic properties of the studied compounds. To support this investigation, a more comprehensive approach of the development was achieved by analyzing some AQ and AS structurally related molecules. Taking into account the differences in terms of LogP and the ionizable / non-ionizable nature of studied molecules, an exploratory gradient elution was required.

3.1.1. pH screening

The effects of the pH of the mobile phase and the nature of pH modifiers were studied on compound retention, peak shape, and background noise. Indeed, the pH of the mobile phase was expected to be a critical parameter since the analyzed molecules could be ionized depending on the pH value, thus impacting their retention and peak shape due to possible interaction with the free silanols of the stationary phase. Given the pKa values of compounds (Supporting information *Table S1*), a pH range between 2.4 and 10.0 (*Table 1*) was wide enough to cover the ionization states of the studied molecules. For this study, a XBridge BEH C18 stationary phase was selected owing to its stability over a broad pH range (1 to 12). Furthermore, due to the grafting of ethylene functions on the silica surface, the number of free residual silanols is reduced which limits undesired interactions with the stationary phase. However, even with this property, asymmetric peaks may be observed for positively charged molecules such as AQ and CQ, that would depend on the pH of the mobile phase.

In order to comply with the principles of green chemistry, the pH was fixed using various environmentally friendly modifiers. Acetic or formic acid alone at different concentrations or in combination with their corresponding salts, ammonium acetate or formate, or carbonate buffer for the alkaline condition, were preferentially considered (*Table 1*). *Figure 2A* presents the absorbance spectra of the various pH modifiers tested in this study when dissolved in water. Although at 254 nm the absorbance of these different pH modifiers was weak, and had nearly no impact on the baseline drift during chromatographic gradient elution, at 210 nm, a high concentration of FA (i.e. 80 mM, required to obtain the lowest pH value of

2.4) induced an important increase of absorbance (*Figure 2A*) and thus a high background noise (*Figure 2B*). For AS and DHA no peak was observed at pH 2.4 due to the background noise and the baseline drift. However, 20 mM FA corresponding to pH 2.7 led to acceptable baseline drift and background noise for their detection. Also, sodium carbonate buffer appeared inappropriate to be used in gradient elution due to a pronounced negative drift of the baseline. So, the nature and the concentration of the green pH modifiers added to the mobile phase appeared to be a critical parameter for the detection of molecules with weak chromophores.

Figure 3 summaries the symmetry factors and retention times obtained for each compound according to the different pH values and modifiers. The two peaks observed for DHA, coming from an equilibrium in solution between two isomers (α -DHA and β -DHA) [28], were baseline separated, and identified as DHA1 and DHA2 peaks.

As shown in *Figure 3A*, the pH value of the mobile phase had a great impact on the peak shape of AQ, CQ, and AS. Symmetric peaks were observed for AQ and CQ at pH values between 2.4 and 3.2 and at pH 10 but the symmetry factor was high at pH 5 and 6.9 for both peaks. The improved peak shape of AQ and CQ at pH under 3.2 can be explained by a neutralization of the residual silanols present at the surface of the stationary phase, thus reducing ionic interactions between AQ and CQ positively charged compounds and the residual silanols. On the contrary, at pH 5 and 6.9, silanols are negatively charged, which increases interactions with AQ and CQ compounds, leading to peak tailing and broadening. The best symmetry factor was observed at pH 10 due to the molecular state of AQ and CQ, which avoids interaction with silanols. For AS, high symmetry factors were observed at pH values superior or equal to 5. At such pH, AS was partially or totally ionized, leading probably to a repulsion phenomenon with residual silanols that may prevent AS penetration through the hydrophobic structure of the stationary phase. In addition, AS is injected at a high concentration due to its low UV absorbance and this overloading effect may worsen peak symmetry [29]. For other compounds, pH has not a critical impact on peak shape. Consequently, especially for AQ and AS, the use of a stationary phase involving a strategy to reduce the number of residual silanols is not sufficient. The pH value remains thus a critical parameter. Acidic pH values provide better peak shape, however, using FA or AA as green acidic pH modifiers, a compromise has to be found between an increase in pH modifier concentration to decrease the pH value and the resulting increase of the background noise.

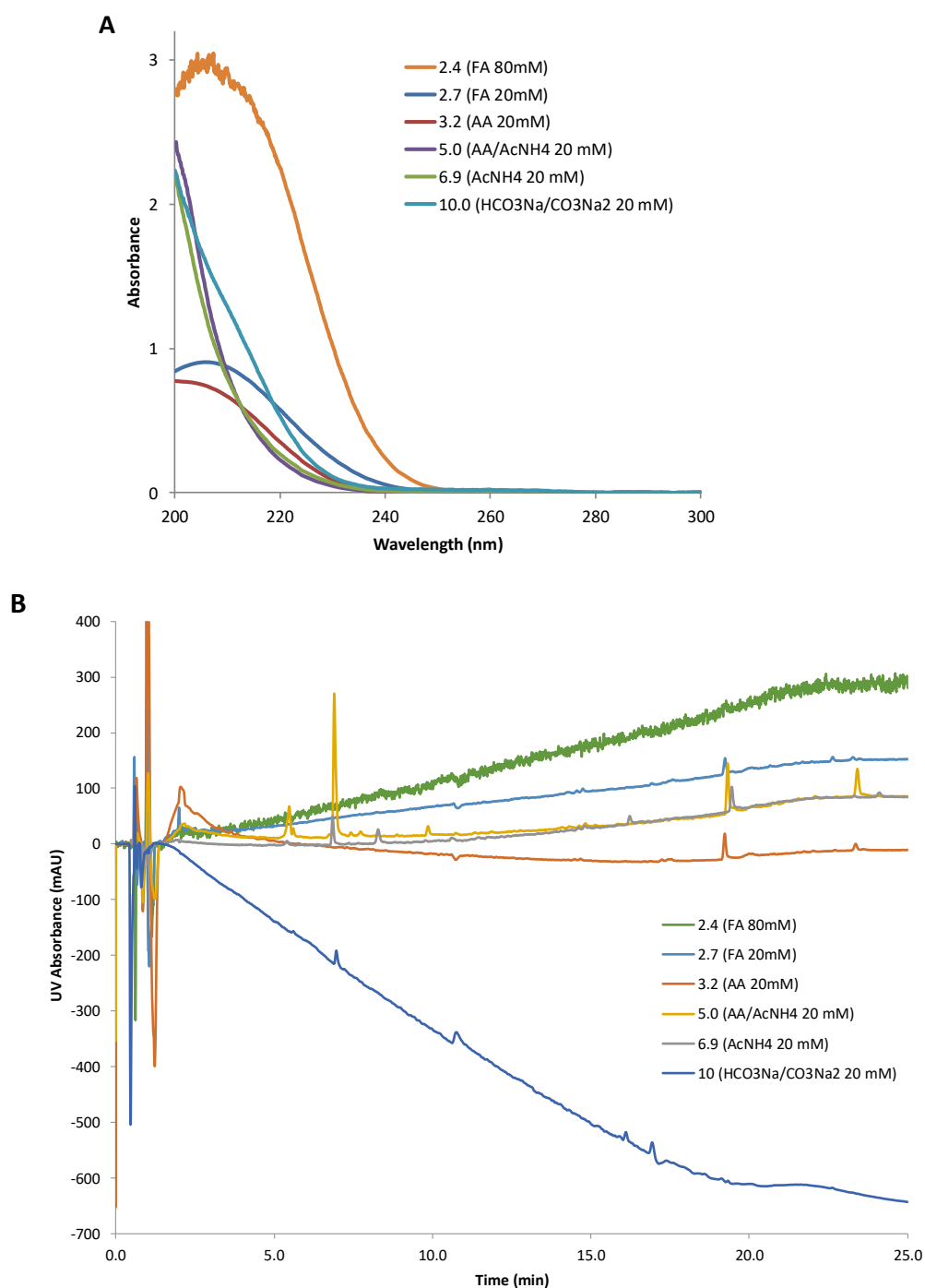


Figure 2. Comparison of pH modifiers solubilized in water; **A:** UV spectra; **B:** Blanks of gradient elution with XBridge BEH C18, 150 x 3 mm, 5 μm, at 210 nm. Gradient time of 20 min from 5% to 100% of mobile phase B.

To conclude, pH range between 2.7 (20 mM FA) and 3.2 (20 mM AA) allowed the best compromise in terms of peak shape and baseline noise for the analysis of compounds of interest. Regarding retention times, (*Figure 3B*) the closest retention between AS and AQ that would allow an isocratic analysis was between pH 6.9 and 10.0. However, at acidic pH, the difference in retention times between AS and AQ is too important to avoid the use of a gradient elution.

Nevertheless, it is known that gradient elution mode has a benefit effect on peak shape due to gradient compression mechanism which decreases peak tailing [30,31].

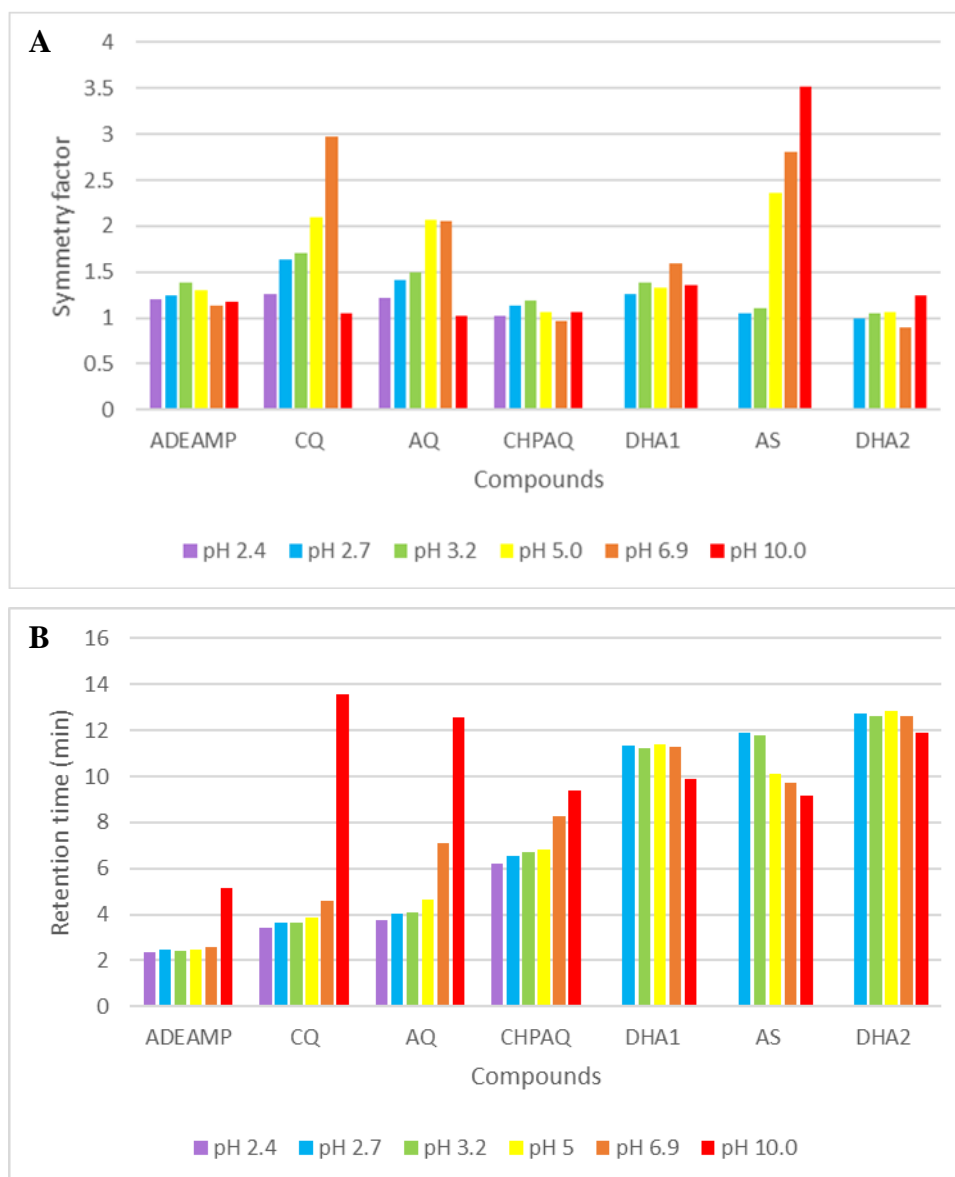


Figure 3. **A:** Symmetry factor; **B:** retention times at different pH values. Column: XBridge BEH C18, 150 x 3 mm, 5 μ m. Gradient time of 20 min from 5% to 100% of mobile phase B

3.1.2. Column screening

In RP-HPLC, the nature of the organic modifier in the mobile phase is a key parameter to tune the selectivity. In the context of limiting its choice to ethanol, another important factor that should be screened to gain in selectivity, is the nature of the stationary phase. This screening was carried out on 19 stationary phases at the two previously selected pH values: 2.7 and 3.2 using 20 mM FA and 20 mM AA, respectively. Most of the columns have at least one strategy

to reduce silanol interactions (*Table 2*), either by limiting silanol accessibility (steric hindrance grafting) or by reducing their number (end-capping, hybrid silica) or by generating a competition with silanols (polar incorporated groups). Unsurprisingly, results showed that AQ and CQ peaks had the largest variation in symmetry factors according to column grafting properties (Supporting information *Table S2*). Also, as observed during pH screening, peak symmetry was generally better at pH 2.7 than pH 3.2 on a given column.

To highlight similarities and differences between stationary phases, a principal component analysis (PCA) was carried out using symmetry factors of all peaks at pH 2.7 and 3.2 as variables (*Figure 4*).

The stationary phase Uptisphere PLP was finally not included in the PCA study as it was found to be outside the 95% confidence level due to high values of symmetry factors for DHA peaks at pH 2.7. Indeed, the two peaks of DHA isomers were not baseline resolved at pH 2.7 on this column, as opposed to what was observed on others columns and were detected as a large and almost unique peak, leading to high symmetry factor values. At pH 3.2 a single large but symmetric peak was obtained for DHA isomers. Due to its polyfunctional grafting, this column material has a more heterogeneous surface than monofunctional ones, which may not ensure a homogenous retention of each DHA isomer.

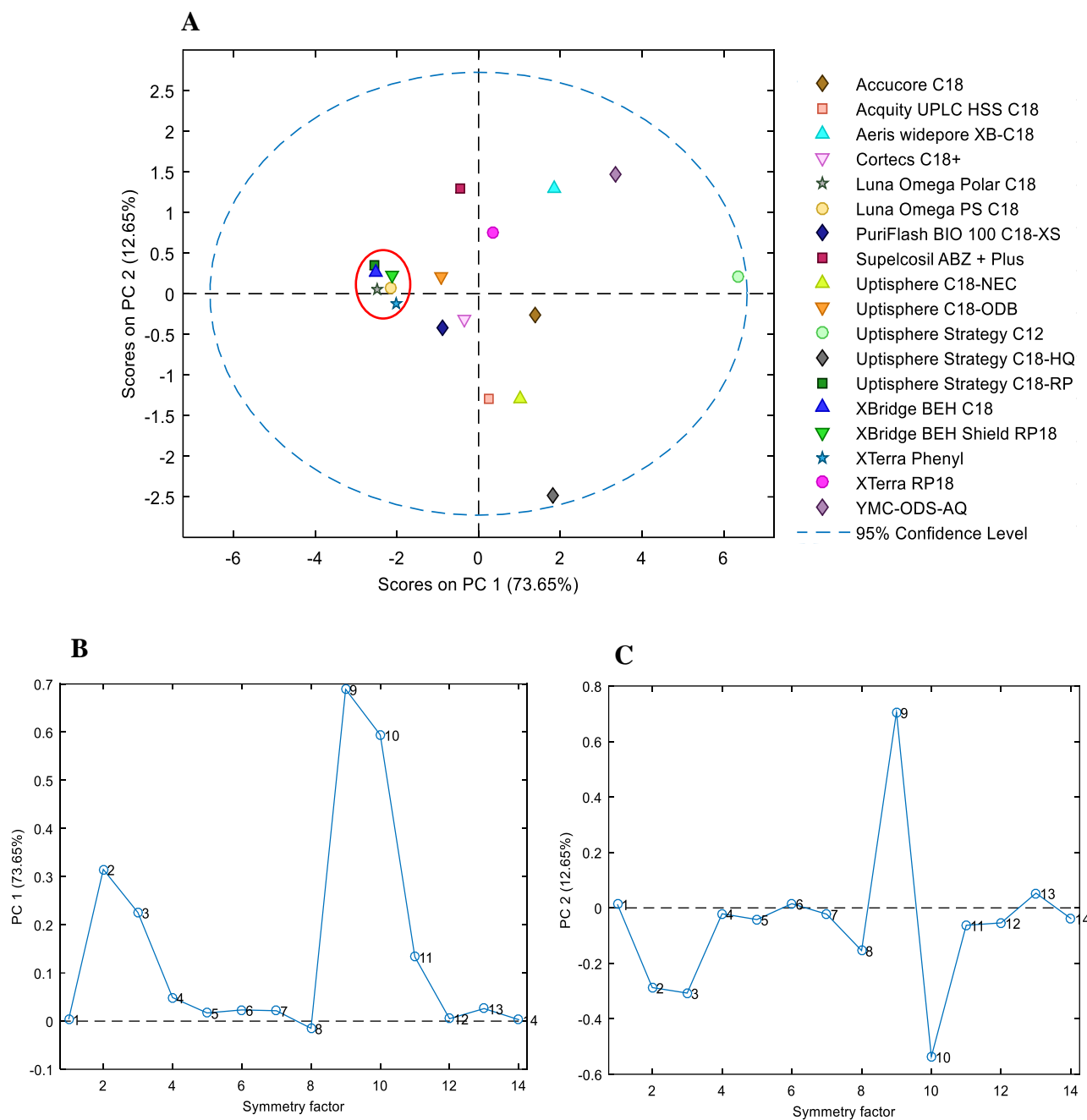


Figure 4. PCA of asymmetry factor values at pH 2.7 and 3.2 obtained on the different columns. **A:** Scores; **B:** PC1 Loadings; **C:** PC2 Loadings. **1.** ADEAMP pH 2.7, **2.** CQ pH 2.7, **3.** AQ pH 2.7 **4.** CHPAQ pH 2.7, **5.** DHA1 pH 2.7, **6.** AS pH 2.7, **7.** DHA2 pH 2.7, **8.** ADEAMP pH 3.2, **9.** CQ pH 3.2, **10.** AQ pH 3.2, **11.** CHPAQ pH 3.2, **12.** DHA1 pH 3.2, **13.** AS pH 3.2, **14.** DHA2 pH 3.2

PCA was therefore performed on 18 columns. PC1 explained more than 70% of the total variance (*Figure 4A*) and its loading plot showed that it was mainly influenced by symmetry

factors of AQ and CQ at the two studied pH values (*Figure 4B&C*). Along PC1, the higher the score value, the higher the symmetry factors for AQ and CQ peaks. Columns with positive values on PC1, were therefore not suitable for AQ and CQ quantification purposes. PC2 explained more than 10% of the total variance, and its loadings are also related to the symmetry factors of AQ and CQ, but only at pH 3.2. PC1-PC2 score plot represented more than 85% of the variability in the data and allowed to highlight a group of six stationary phases providing the best peak shape for basic compounds. These columns are: XBridge BEH C18, XBridge BEH Shield RP18, Uptisphere Strategy C18-RP, XTerra Phenyl, Luna Omega Polar C18, and Luna Omega PS C18.

The two stationary phases, XBridge BEH C18 and XBridge BEH Shield RP18 feature a double strategy to reduce the number of silanols with a bidentate end-capping group and a trifunctional C18 grafting. The XBridge BEH Shield RP18 has also an embedded polar group which competes with basic compounds through interaction with residual silanols. The two stationary phases, Luna Omega Polar C18 and Luna Omega PS C18 possess a mixed grafting of polar and non-polar functions on a silica with great inertness, limiting secondary interaction and thus improving peak shape. In addition, the polar function of the Luna Omega PS C18 is positively charged, promoting interactions with silanols, leading consequently to better peak shape for basic compounds. The Uptisphere Strategy C18-RP is composed of a high-quality silica, decreasing silanol acidity, and multistep end-capping. Finally, the XTerra Phenyl features a hybrid silica and is the only one with a phenyl grafting which permits π - π interactions with AQ and CQ and maybe reduces the secondary ionic interactions between the stationary phase and the positively charged compounds. These columns have in common at least two or three processes which limit the interaction of basic compounds with residual silanols.

On the contrary, YMC-ODS-AQ and Uptisphere Strategy C12 had the highest values along PC1 probably because of two reasons: their low retention and their lower loading capacity compared to classical C18 stationary phases due to their specific grafting (hydrophilic/C18 and C12, respectively), both worsening peak shape due to overloading effect.

This step allowed to select adapted stationary phases to the analysis of the studied molecules.

3.2. Application to artesunate and amodiaquine quantification in tablets

Based on the results of the screening phase, methods, allowing to determine content of AS and AQ in pharmaceutical formulations, were optimized and validated.

3.2.1. Optimization

Among the group of the six columns, the XBridge BEH C18, Uptisphere Strategy C18-RP and Luna Omega Polar C18 were chosen to continue the method development for AS and AQ quantitative analysis. Two reasons support this selection: first, they presented the best symmetry factor for AQ and second, they are from different brands to demonstrate the advantage of column screening during pharmaceutical development in order to be less manufacturer dependent. pH was fixed with 10 mM FA (pH 2.85) because it offered better peak shape for AQ while minimizing noise at 210 nm to be suitable for AS quantification. Gradient elution was retained because of the great retention difference between AQ and AS at the selected pH value. Also, it allowed improving AQ peak shape compared to the isocratic mode. For XBridge BEH C18 and Uptisphere Strategy C18-RP columns, a gradient slope of 3.84 %/min (from 5% to 85%) of mobile phase B was selected to reduce analysis time while maintaining method selectivity. In fact, it allowed a good separation between AS and its degradation product DHA, and between AQ and its related substances. For the Luna Omega PS C18 column, a gradient slope of 5.44 % was chosen for the same reasons.

Experiments showed that sample preparation was a critical parameter. On the one hand, AQ which was early eluted required to be prepared in a low percentage of EtOH (under 10%) to avoid peak tailing and peak broadening. On the other hand, AS was not soluble at such low percentage of EtOH. In addition, the amount of AQ was 2.7 times higher than AS in tablets. To solve this problem and allow tablet analysis, two sample preparations were carried out. The first preparation resulted in a solution composed of AS at 0.5 mg/mL and AQ at 1.35 mg/mL using water/96% EtOH (50/50, v/v) as dilution solvent. This preparation allowed AS analysis. For AQ analysis, a second preparation was performed by diluting by a factor of 100 the first preparation in water/96% EtOH (95/5, v/v) to reach a concentration of 0.0135 mg/mL. These optimized conditions allowed a good symmetry factor for AQ (under 1.5, which complied with the European Pharmacopeia) (*Figure 5*). The method was then validated to demonstrate its suitability for AS and AQ quantification in tablets.

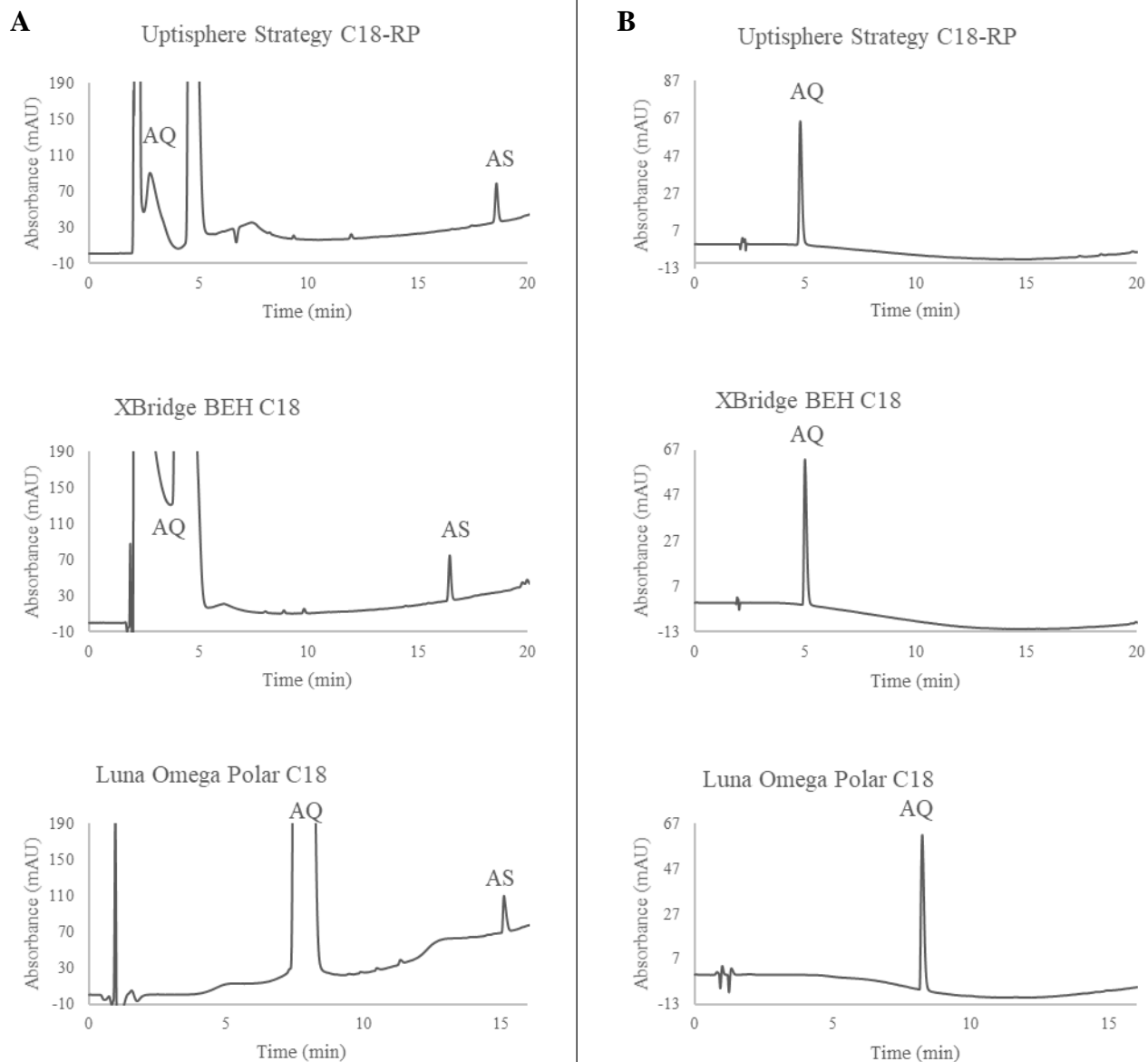


Figure 5. Chromatograms on the three columns. **A.** AS at 0.5 mg/mL and AQ at 1.35 mg/mL in water/96% EtOH (50/50, v/v) (detection at 210 nm). **B.** AQ at 0.0135 mg/mL in water/96% EtOH (95/5, v/v) (detection at 254 nm). Chromatographic conditions for the XBridge BEH C18 (150 x 3 mm, 5 μ m) and Uptisphere Strategy C18-RP (150 x 3 mm, 5 μ m) columns: 10 mM FA pH 2.85, 3.84 %/min mobile phase B, 0.4 mL/min, 30°C, 10 μ L of injection volume. Chromatographic conditions for the Luna Omega Polar C18 column (50 x 2.1 mm, 1.6 μ m): 10 mM FA pH 2.85, 5.44 %/min mobile phase B, 0.2 mL/min, 30°C, 5 μ L of injection volume.

3.2.2. Validation

The developed method was then validated on the three selected columns to demonstrate its reliability and performances [32]. Method specificity was demonstrated since no interfering peaks was found when the excipient mixture was injected on each column (Supporting information *Figure S1*). Accuracy, repeatability, intermediate precision, and linearity were assessed by accuracy profile approach using the concept of total error (bias + standard deviation) based on the β -expectation tolerance intervals [33]. The total error concept uses a single graph named “accuracy profile” and allows the representation of all validation criteria. On this graph, β -expectation tolerance interval is defined as an interval in which it is expected that each future result will fall inside with a defined probability β [34]. By joining the upper tolerance limits (max) on the one hand and the lower tolerance limits (min) on the other hand, the method defines an accuracy profile. If the profile stays within the acceptance limits, the method can be considered as valid. Accuracy profile methodology is fully compliant to ICH Q2 (R1) requirements [32]. This approach is based on the preparation of two sets of samples, one called the calibration set using only standard compounds and the other one called the validation set composed of reconstituted formulations. The calibration set allows the selection of the response equation that is used then for the quantification of the samples of the validation set. In this work, the calibration was obtained using only one concentration level (100% level consisting in 0.5 mg/mL for AS and 0.0135 mg/mL for AQ) while three concentrations were used for the validation set (80-120 % consisting in 0.4, 0.5, and 0.6 mg/mL for AS, 0.0108, 0.0135, and 0.0168 mg/mL for AQ). On each column, calibration set was used to back calculate concentrations of the validation set and assess the linearity, the relative bias, the repeatability, the intermediate precision, and the β -expectation tolerance intervals at 90% probability level. Acceptance limits were fixed at $\pm 10\%$ according to the International Pharmacopeia. As shown in *Figure 6*, the accuracy profiles were all within the fixed limits for both AS and AQ whatever the level of concentration on each column. Thus, the method was validated for the quantification of both compounds on each column.

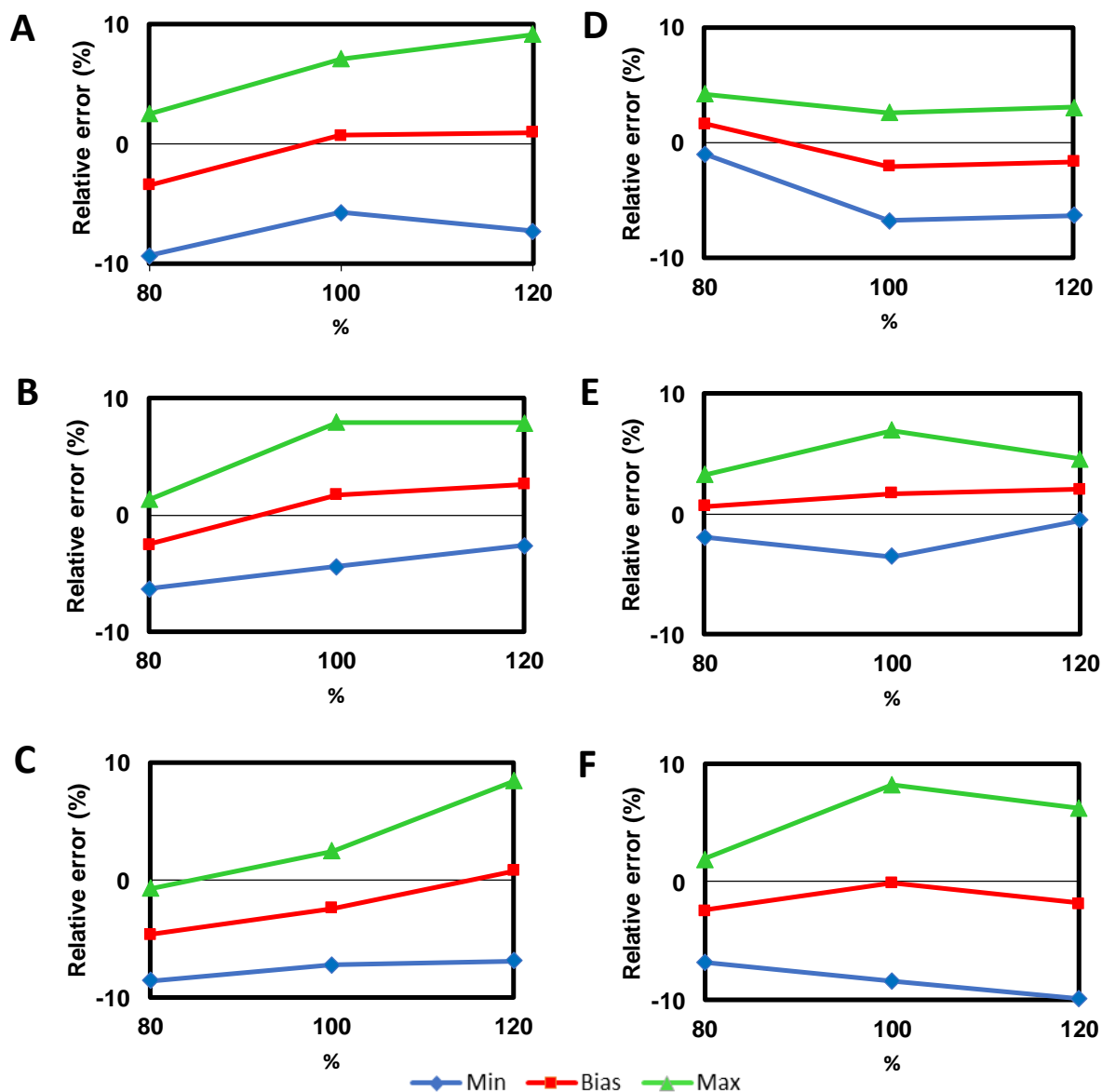


Figure 6. Accuracy profiles for AQ (A, B and C) and AS (D, E and F) on the three selected columns: Uptisphere Strategy C18-RP (A and D), XBridge BEH C18 (B and E) and Luna Omega Polar C18 (C and F).

3.3. Method greenness assessment

Different tools have been developed to assess the greenness of an analytical procedure. The most known are the National Environmental Methods Index (NEMI) [35], the Analytical Eco-Scale [36] and the Green Analytical Procedure Index [37].

NEMI evaluates the greenness of an analytical method through a pictogram which is divided into four quadrants which represent: 1- PBT (persistent, bioaccumulative, and toxic), 2- Hazardous, 3- Corrosive, and 4- Waste [35,38]. The respective quadrant is shaded green if: 1- The utilized reagents are not defined as PBT by the Environment Protection Agency's Toxic

Release Inventory (EPA-TRI), 2- The used chemicals are not hazardous, thus, not listed on the TRI list, 3- The pH of the medium lies in the range of 2–12 and 4- The generated waste is less than 50 g [39]. If not, the corresponding quadrant is shaded blank.

The Analytical Eco-scale is a more quantitative approach, based on subtracting penalty points from a total of 100, considering the amount and hazard of reagents, energy consumption, occupational hazards, and amount of waste generated [36].

GAPI is a more recent tool which provides a comprehensive information on the entire analytical procedure, from sample collection to final determination [37]. GAPI consists in five pentagrams. Each pentagram represents one step of the procedure including sampling, sample preparation, reagents, solvents, instrumentation, and the purpose of the analytical procedure. GAPI allows 15 parameters to be investigated using color scale of three levels: green, yellow, and red, corresponding to a low, medium, and high environmental impact, respectively. Its visual presentation allows a comparison of various methods and easy selection of the greenest one.

Table 3 presents the greenness assessment of the developed method and other methods for AS and AQ analysis reported in the literature using Eco-scale, NEMI, and GAPI tools. The method developed in this study appears to be the greenest in comparison with existing methods, whatever the tool (Eco-scale of 93, four quadrants of NEMI pictogram colored in green, no red color for the GAPI assessment).

3.4. Tablet analysis

The developed and validated HPLC methods were used to analyze two different batches of AS and AQ fixed dose combination tablets. All samples contained both active pharmaceutical ingredients in the adequate amount according to the International Pharmacopeia specifications between 90-110 % (*Table 4*).

Table 3. Greenness assessment of the developed method and other HPLC methods reported in the literature for the analysis of artesunate and amodiaquine in pharmaceutical formulations by Analytical Eco-scale, NEMI, and GAPI approaches

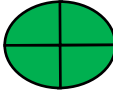
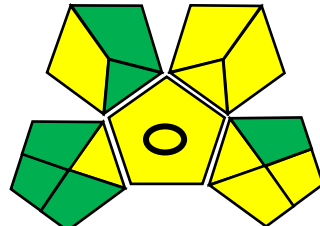

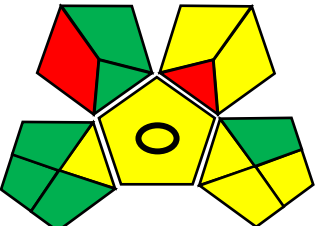

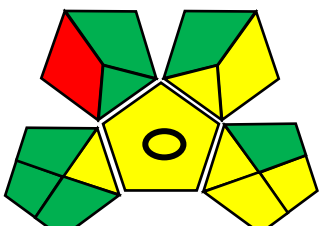

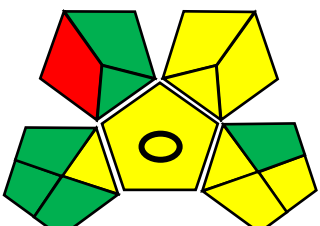
		Analytical Eco-scale	NEMI	GAPI
			Penalty points (pp)	
Developed method				
Reagents	Ethanol (< 50 mL)	2		
	Water (< 50 mL)	0		
	Formic acid (< 1 mL)	1		
Instruments	Energy (HPLC-UV < 1.5 kWh/sample)	1		
	Occupational hazard	0		
	Waste (< 10 mL)	3		
Total pp		7		
Eco-scale score		93		
Reported method 1 [21]				
Reagents	Acetonitrile (> 100 mL)	12		
	Water (< 50 mL)	0		
	KH ₂ PO ₄ (< 1 g)	1		
	Phosphoric acid (< 1 mL)	1		
Instruments	Energy (HPLC-UV < 1.5 kWh/sample)	1		
	Occupational hazard	0		
	Waste (< 10 mL)	3		
Total pp		18		
Eco-scale score		82		
Reported method 2 [22]				
Reagents	Methanol (< 50 mL)	8		
	Water (< 50 mL)	0		
	Ammonium formate (< 1 g)	1		
	Formic acid (< 1 mL)	1		
	Phosphoric acid (< 10 mL)	2		
Instruments	Energy (HPLC-UV < 1.5 kWh/sample)	1		
	Occupational hazard	0		
	Waste (< 10 mL)	3		
Total pp		16		
Eco-scale score		84		
Reported method 3 [23]				
Reagents	Acetonitrile (< 50 mL)	8		
	Water (< 50 mL)	0		
	KH ₂ PO ₄ (< 1 g)	1		
	Phosphoric acid (< 1 mL)	1		
	1-octanesulfonate (< 1 g)	1		
Instruments	Energy (HPLC-UV < 1.5 kWh/sample)	1		
	Occupational hazard	0		
	Waste (< 10 mL)	3		
Total pp		15		
Eco-scale score		85		

Table 4. Results of AS and AQ content (%) in tablets.

	Uptisphere Strategy C18-RP		XBridge BEH C18		Luna Omega Polar C18	
	AS	AQ	AS	AQ	AS	AQ
Batch 1	98.8	99.8	104.3	96.2	97.8	100.1
Batch 2	95.1	107.2	97.6	107.0	93.7	107.3

4. Concluding remarks

Reversed-phase HPLC methods traditionally use acetonitrile, as organic solvent, which causes environment and operator health issues due to its toxicity. Ethanol is among the best environmental friendly alternative organic solvents owing to its synthesis from renewable feedstocks and its low lifecycle impact on the environment. However, the development of green chromatographic methods, when using alternative solvents and reagents, introduces conceptual changes. First, the choice of green mobile phase constituents, i.e. organic solvent, and pH modifiers, is limited. Consequently, parameters that can alter method performance in terms of selectivity of analysis and peak shape of compounds are mainly reduced to the pH of the mobile phase and the nature of the stationary phase. Moreover, given its low UV cut-off, ethanol can lead to detection problems even more pronounced in gradient mode. The nature and the concentration of green pH modifiers are also influential parameters on background noise and baseline drift observed in gradient mode. To optimize peak shape, especially of basic compounds, a column screening appeared as a relevant and required strategy. The analytical development strategy presented in this work enabled to achieve a single and green quantification method of the two antimalarial APIs. This method was validated on three different columns, offering better flexibility in terms of method transfer from one column to another and better independence from manufacturer. In conclusion, this study demonstrates the possible conversion of quality control methods of drugs into green ones while achieving good method performances. As exemplified by the quantitative analysis of artesunate and amodiaquine in fixed-dose combination tablets, such green chromatography developments can be particularly of interest for resource-limited countries where the trade of falsified and substandard drugs is growing.

References

- [1] Görög S., The changing face of pharmaceutical analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 12–17.

- [2] Płotka J., Tobiszewski M., Sulej A. M., Kupska M., Górecki T., Namieśnik J., Green chromatography. *J. Chromatogr. A* 2013, 1307, 1–20.
- [3] Welch C. J., Wu N., Biba M., Hartman R., Brkovic T., Gong X., Helmy R., Schafer W., Cuff J., Pirzada Z., Zhou L., Greening analytical chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2010, 29, 667–680.
- [4] Anastas P. T., Green Chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1999, 29, 167–175.
- [5] Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 497–511.
- [6] Tobiszewski M., Mechlińska A., Namieśnik J., Green analytical chemistry—theory and practice. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 2869–2878.
- [7] Namieśnik J., Green analytical chemistry - Some remarks. *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 151–153.
- [8] Yang Y., Strickland, Z., Kapalavavi B., Marple, R., Gamsky C., Industrial application of green chromatography—I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase. *Talanta* 2011, 84, 169–174.
- [9] Greener Processes | Pfizer, <https://www.pfizer.com/purpose/workplace-responsibility/green-journey/greener-processes> (last time accessed: June 12, 2020).
- [10] Gałuszka A., Migaszewski Z., Namieśnik J., The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2013, 50, 78–84.
- [11] Mohamed H. M., Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015, 66, 176–192.
- [12] Pereira G. V. P. S. F. D. K. S. A., Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography, <http://www.chromatographyonline.com/green-chromatography-part-1-introduction-and-liquid-chromatography?id=&sk=&date=&pageID=6> (last time accessed: June 12, 2020).
- [13] Yabré M., Ferey L., Somé I.T., Gaudin K., Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules* 2018, 23, 1065.
- [14] Chen K., Lynen F., De Beer M., Hitzel L., Ferguson P., Hanna-Brown M., Sandra P., Selectivity optimization in green chromatography by gradient stationary phase optimized selectivity liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 7222–7230.
- [15] ICH Harmonised Tripartite. Impurities: guideline for residual solvents Q3C (R6), 2016.

https://database.ich.org/sites/default/files/Q3C-R6_Guideline_ErrorCorrection_2019_0410_0.pdf

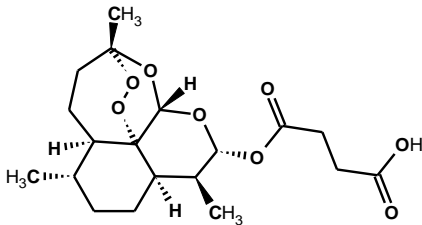
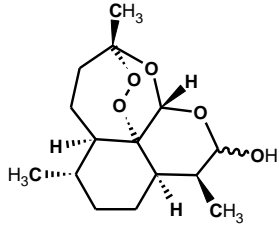
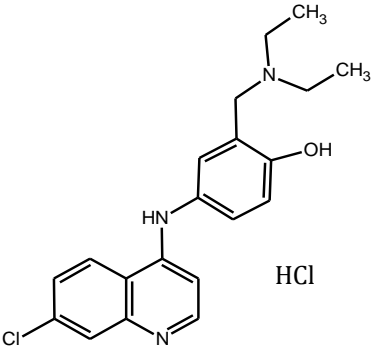
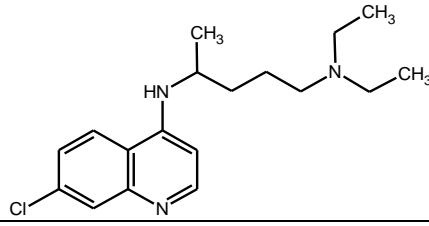
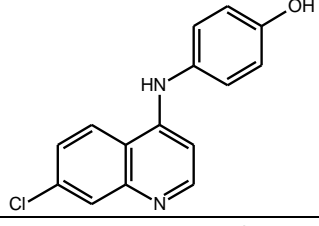
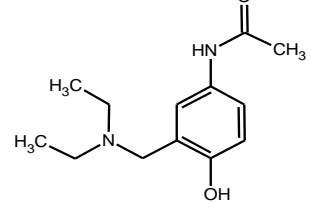
- [16] Welch C. J., Brkovic T., Schafer W., Gong X., Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC. *Green Chem.* 2009, 11, 1232.
- [17] Capello C., Fischer U., Hungerbühler K., What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* 2007, 9, 927–934.
- [18] Teutenberg T., Wiese S., Wagner P., Gmehling J., High-temperature liquid chromatography. Part II: Determination of the viscosities of binary solvent mixtures—Implications for liquid chromatographic separations. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 8470–8479.
- [19] Boussès C., Ferey L., Vedrines E., Gaudin K., Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 115, 114–122.
- [20] WHO Pharmacopoeia Library, <https://apps.who.int/phint/en/p/doc/> (last time accessed: May 12, 2020).
- [21] Phadke M. U., Jadhav V. K., Jadhav, R. K., Dave S. S., Patil D. S., Simultaneous RP-LC Determination of Artesunate and Amodiaquine in Pharmaceutical Preparations. *Chromatographia* 2008, 68, 1003–1007.
- [22] Mbinze J. K., Yemoa A., Lebrun P., Sacré P.-Y., Habyalimana V., Kalenda N., Bigot A., Atindehou E., Hubert P., Marini R. D., Fighting Poor Quality Medicines: Development, Transfer and Validation of Generic HPLC Methods for Analyzing Two WHO Recommended Antimalarial Tablets. *Am. J. Anal. Chem.* 2015, 06, 127–144.
- [23] Le Vaillant Y., Brenier C., Grange Y., Nicolas A., Bonnet P. A., Massing-Bias L. R., Rakotomanga P., Koumaré B., Mahly A., Absi M., Ciss M., Loueslati M. H., Chauvey D., Simultaneous Determination of Artesunate and Amodiaquine in Fixed-Dose Combination by a RP-HPLC Method with Double UV Detection: Implementation in Interlaboratory Study Involving Seven African National Quality Control Laboratories. *Chromatographia* 2012, 75, 617–628.
- [24] Jain P. S., Chaudhari A. J., Surana S. J., Selective High Performance Liquid Chromatographic Determination of Amodiaquine and Artesunate in bulk and pharmaceutical formulation. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2013.
- [25] Koel M., Do we need Green Analytical Chemistry? *Green Chem.* 2016, 18, 923–931.

- [26] Dolan J. W., Snyder L. R., Theory and practice of gradient elution in liquid chromatography in *Liquid Chromatography*. Elsevier 2017, pp. 389–402.
- [27] European Pharmacopoeia. <https://www.edqm.eu/> European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) 2020, pp. 80–87.
- [28] D'Acquarica I., Gasparini F., Kottoni D., Pierini M., Villani C., Cabri W., Di Mattia M., Giorgi F., Stereodynamic Investigation of Labile Stereogenic Centres in Dihydroartemisinin. *Molecules* 2010, 15, 1309–1323.
- [29] McCalley D. V., Overload for ionized solutes in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 2006, 78, 2532–2538.
- [30] Neue U. D., Marchand D. H., Snyder L. R., Peak compression in reversed-phase gradient elution. *J. Chromatogr. A* 2006, 1111, 32–39.
- [31] Gritti F., Guiochon G., Exact peak compression factor in linear gradient elution. *J. Chromatogr. A* 2008, 1212, 35–40.
- [32] ICH Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005.
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- [33] Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L., Rozet E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal–Part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45, 82–96.
- [34] Krier F., Brion M., Debrus B., Lebrun P., Driesen A., Ziemons E., Evrard B., Hubert P., Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 54, 694–700.
- [35] Keith L. H., Gron L. U., Young J. L., Green Analytical Methodologies. *Chem. Rev.* 2007, 107, 2695–2708.
- [36] Gałuszka A., Migaszewski Z. M., Konieczka P., Namieśnik J., Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2012, 37, 61–72.
- [37] Płotka-Wasyłka J., A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta* 2018, 181, 204–209.
- [38] Hemdan A., Magdy R., Farouk M., Response surface design as a powerful tool for the development of environmentally benign HPLC methods for the determination of two antihypertensive combinations: Greenness assessment by two green analytical chemistry evaluation tools. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 3213–3223.

- [39] Mohamed D., Fouad M. M., Application of NEMI, Analytical Eco-Scale and GAPI tools for greenness assessment of three developed chromatographic methods for quantification of sulfadiazine and trimethoprim in bovine meat and chicken muscles: Comparison to greenness profile of reported HPLC methods. *Microchem. J.* 2020, 157, 104873.

Supporting information

Table S1: Structures and physico-chemical properties of studied compounds

Compound	Structure	pKa	Log P	MW (g/mol)
AS		4.35	2.61	384.42
DHA		-	2.25	284.35
AQ	 HCl	9.12	3.70	355.86
CQ		10.10	4.63	319.87
CHPAQ		NA	2.00	270.71
ADEAMP		NA	2.26	236.16

NA : not available; DHA: dihydroartemisinin; CQ: chloroquine; CHPAQ: 7-chloro-4-(4-hydroxyphenylamino)quinolone; ADEAMP: 4-acetamido-2-diethylaminomethylphenol

Table S2: symmetry factors of compounds on the 19 columns at pH 2.7 and 3.2

Compound	ADEAMP	CQ	AQ	CHPAQ	DHA1	AS	DHA2	ADEAMP	CQ	AQ	CHPAQ	DHA1	AS	DHA2
Stationary phase	pH 2.7							pH 3.2						
Acquity UPLC HSS C18	1.88	2.39	2.46	1.42	1.02	1.23	1.02	2.07	2.35	4.29	1.51	0.98	1.17	1.01
Aeris widepore XB-C18	1.76	1.97	3.00	1.75	1.05	1.82	0.83	0.99	5.21	3.53	1.73	0.76	1.81	0.78
Accucore C18	1.93	3.10	2.84	1.77	1.98	1.67	1.71	1.81	3.90	3.69	1.59	1.48	1.51	1.46
Cortecs C18+	1.28	2.21	2.12	1.86	1.91	1.41	1.22	1.60	2.60	2.94	2.20	1.88	1.53	1.28
Luna Omega Polar C18	1.80	1.44	1.41	1.34	1.07	1.18	0.98	2.23	1.44	1.64	1.42	0.99	1.11	1.04
Luna Omega PS C18	1.64	1.63	1.56	1.31	0.92	0.99	0.90	1.95	1.68	1.82	1.42	0.86	1.08	0.91
PuriFlash BIO 100 C18-XS	1.32	1.68	1.94	1.43	1.33	1.06	0.86	1.69	2.16	3.05	2.05	1.24	1.18	1.04
Supelcosil ABZ+Plus	1.09	1.68	1.86	0.94	1.04	0.91	0.87	1.30	3.71	2.20	1.32	1.03	1.31	0.99
Uptisphere C18-NEC	2.11	2.30	2.63	1.41	1.22	1.08	0.92	2.86	2.97	4.73	1.96	1.29	1.09	0.95
Uptisphere C18-ODB	1.32	1.89	1.77	1.49	1.45	1.14	0.80	1.73	2.59	2.41	2.28	1.18	1.09	0.95
Uptisphere PLP	1.22	1.32	1.20	0.88	4.90	0.89	4.90	1.24	1.26	1.26	0.89	1.14	0.85	1.14
Uptisphere Strategy C12	1.37	4.54	3.41	1.84	1.42	1.20	1.09	1.35	7.54	6.48	3.47	1.27	1.28	1.12
Uptisphere Strategy C18-HQ	0.84	3.36	3.56	1.34	1.34	1.13	1.00	1.32	2.53	5.72	1.58	1.25	1.21	1.09
Uptisphere Strategy C18-RP	1.36	1.31	1.40	1.44	1.27	1.11	0.99	1.44	1.54	1.57	1.41	1.19	1.24	1.05
XBridge BEH C18	1.40	1.32	1.43	1.37	1.53	1.13	0.81	1.52	1.53	1.51	1.57	1.40	1.11	1.03
XBridge Shield RP18	1.36	1.65	1.63	1.30	1.19	1.20	1.16	1.21	1.75	1.70	1.40	1.25	1.16	1.16
XTerra Phenyl	1.48	1.51	1.62	1.29	1.48	1.23	1.16	1.69	1.60	2.09	1.47	1.46	1.28	1.15
XTerra RP18	1.51	1.16	1.88	1.05	1.27	1.10	0.97	1.65	3.90	3.62	1.16	1.19	1.19	1.01
YMC-ODS-AQ	1.59	2.60	1.76	1.47	1.29	1.08	1.15	1.90	6.49	4.84	1.44	1.31	1.21	1.00

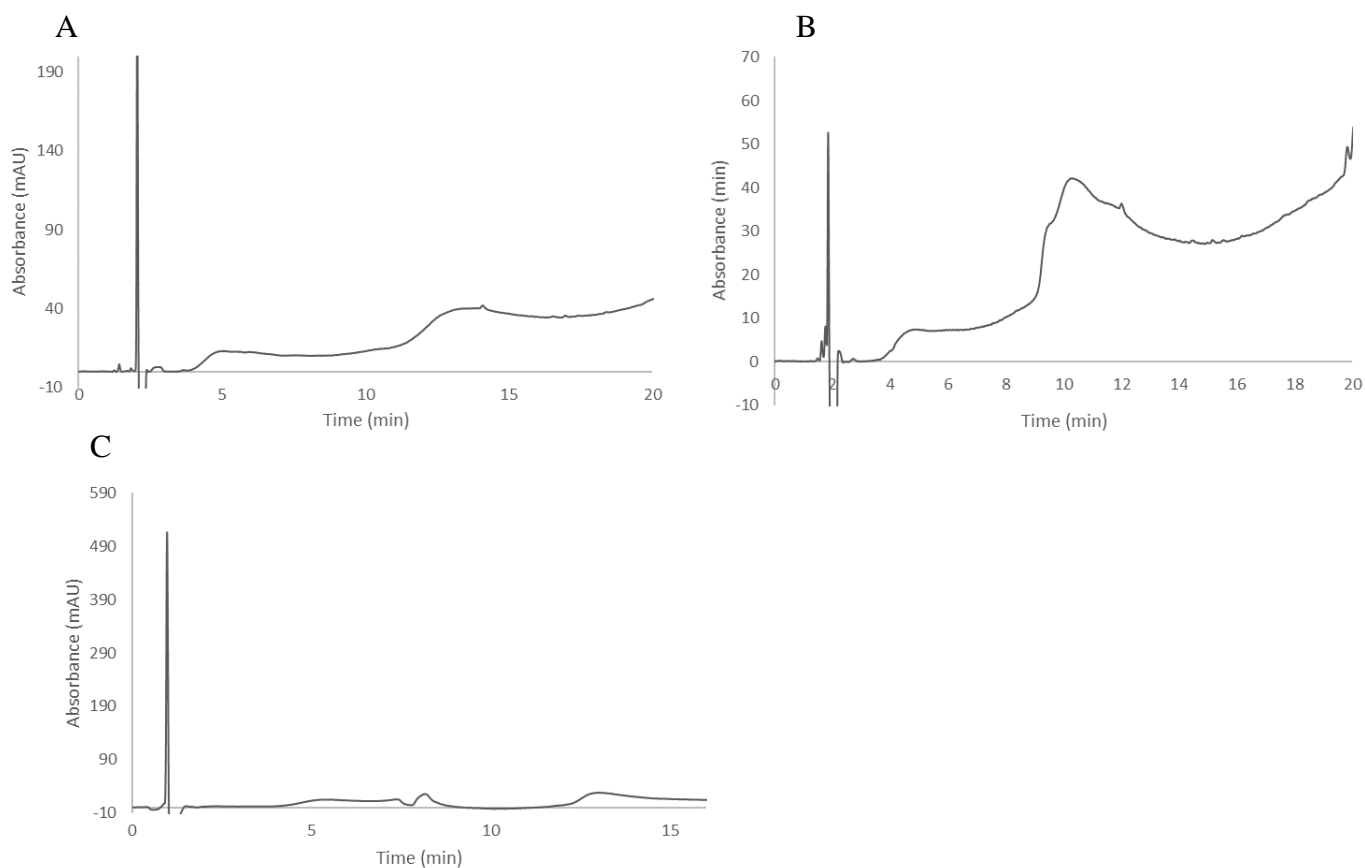


Figure S1. Chromatograms of excipient mixture on the three columns at 210 nm. **A.** Uptisphere Strategy C18-RP (150 x 3 mm, 5 μ m). **B.** XBridge BEH C18 (150 x 3 mm, 5 μ m). **C.** Luna Omega Polar C18 (50 x 2.1 mm, 1.6 μ m). Chromatographic conditions for the XBridge BEH C18 (150 x 3 mm, 5 μ m) and Uptisphere Strategy C18-RP (150 x 3 mm, 5 μ m) columns: 10 mM FA pH 2.85, 3.84 %/min mobile phase B, 0.4 mL/min, 30°C, 10 μ L of injection volume. Chromatographic conditions for the Luna Omega Polar C18 column (50 x 2.1 mm, 1.6 μ m): 10 mM FA pH 2.85, 5.44 %/min mobile phase B, 0.2 mL/min, 30°C, 5 μ L of injection volume.

Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre, des méthodes de CLHP en phase inverse vertes ont pu être développées et validées pour la quantification de l'artésunate et de l'amodiaquine dans des formulations pharmaceutiques. Nous avons démontré que cette séparation était possible en utilisant l'éthanol comme solvant d'élution et seulement l'acide formique comme modificateur de pH de la phase mobile. La préparation de la phase mobile et des échantillons avec ces seuls composants démontre le caractère vert des méthodes développées. L'élution qui a eu lieu en gradient, avec une dérive de la ligne de base, n'a pas empêché la quantification de l'artésunate.

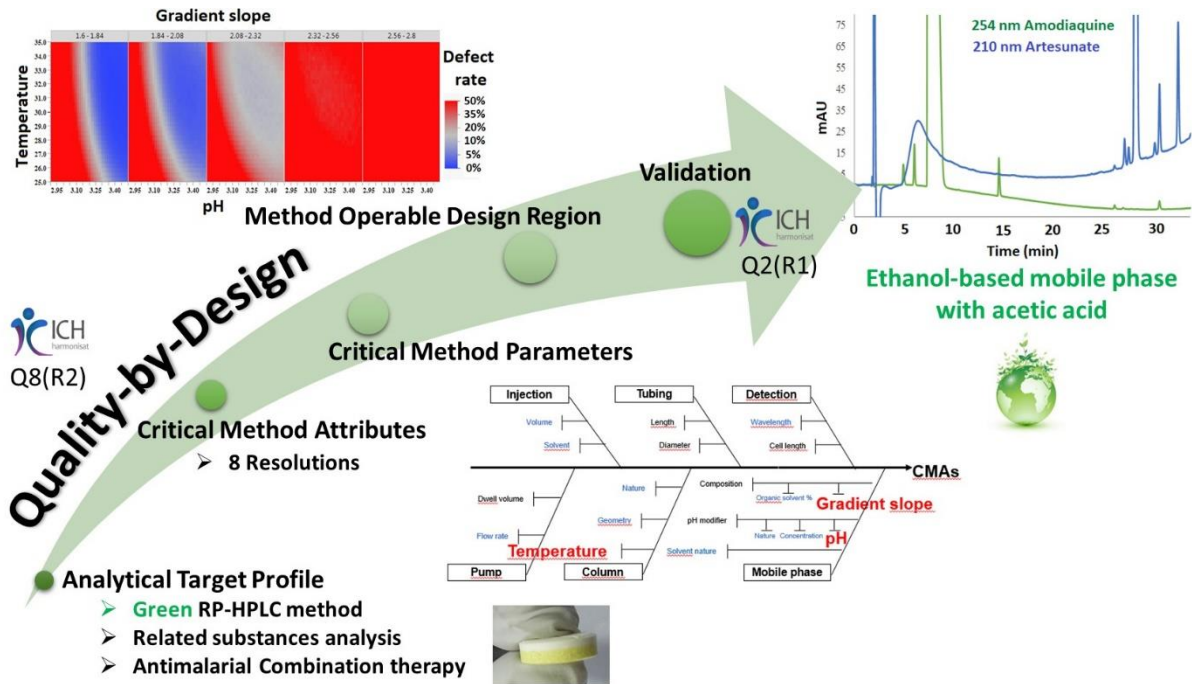
La quantification des deux substances actives est obtenue avec une même méthode et une précision à +/- 10%, en utilisant uniquement le point 100% pour l'étalonnage. Le temps d'analyse en fonction des colonnes varie entre 15 et 20 min. Malgré ce temps d'analyse un peu long, cette approche reste compétitive face à l'utilisation de méthodes indépendantes pour chaque substance active avec des colonnes, des préparations d'échantillons et des phases mobiles différentes.

Trois phases stationnaires de silice greffées C18 de trois fabricants différents, ont permis d'obtenir cette séparation et cette quantification, illustrant ainsi la flexibilité de cette approche de développement en chimie analytique verte pour le contrôle qualité. Dans ce travail, nous avons vu que lorsqu'on utilise l'éthanol comme solvant, les paramètres sur lesquels on peut jouer pour améliorer la sélectivité se trouvent limités au pH et à la phase stationnaire. Aussi, une attention doit être portée au choix des modificateurs de pH verts.

Le débit de la phase mobile doit être cependant limité pour deux raisons ; la première est de permettre une analyse avec une perte de charge restant en deçà des spécifications des appareils classiques de CLHP, et la seconde est de ne pas dégrader l'efficacité qui diminue avec l'augmentation du débit lorsqu'on utilise une phase mobile riche en éthanol (voir Annexe et le travail d'Assassi et al. dans *J. Chromatogr. A* **2015**, *1380*, 104–111).

Afin d'aller plus loin, la faisabilité de cette approche (consistant à rendre les méthodes de CLHP vertes en utilisant simplement l'éthanol comme le solvant organique) dans la quantification des substances apparentées est abordée dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Développement d'une méthode de CLHP verte d'analyse des impuretés d'artésunate et d'amodiaquine par Quality by Design



Contexte du chapitre 3

Dans ce chapitre, toujours appliqué à l'association artésunate/amodiaquine, nous avons démontré l'applicabilité de cette approche de chimie verte dans une problématique plus délicate du contrôle qualité pharmaceutique à savoir l'essai des substances apparentées ou analyse des impuretés des substances actives. En effet, les niveaux d'impuretés et de produits de dégradation aussi bien dans les matières premières de substances actives que dans les formulations pharmaceutiques doivent être strictement contrôlés et répondre aux spécifications exigées par les autorités réglementaires. L'analyse des impuretés est décrite dans la ligne directrice ICH Q3.

L'étude a porté sur le développement d'une méthode de CLHP verte et unique d'analyse des impuretés de l'artésunate et de l'amodiaquine en utilisant l'éthanol comme solvant organique. Le choix d'aborder cet essai a été fait sur la base de l'expérience du Centre Humanitaire des Métiers de la Pharmacie (CHMP), dans le contrôle qualité des spécialités pharmaceutiques à base de cette bithérapie. En effet, l'analyse des impuretés de cette association antipaludique repose sur l'utilisation de deux procédures de la pharmacopée internationale utilisant des techniques différentes et pour lesquelles la transposition est délicate. En raison de la complexité de mise en œuvre de ces méthodes et de l'avantage d'avoir une méthode unique, nous avons donc envisagé ce développement comme preuve que cette approche en chimie verte peut être appliquée à des analyses complexes.

L'analyse de la littérature a montré aussi que les impuretés de ces deux molécules étaient analysées en utilisant au moins deux méthodes différentes. L'étude a été effectuée sur la colonne Xbridge BEH C18 qui permet d'obtenir de bonnes symétries de pic notamment pour les composés basiques tels que l'amodiaquine, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Vu le nombre de neuf molécules à analyser au total et leur similarité chimique, le développement a été effectué selon l'approche Quality by Design (QbD) qui est recommandé par les autorités réglementaires pharmaceutiques et est décrite dans la ligne directrice ICH Q8. L'approche QbD permet de définir, grâce à des plans d'expériences, un espace de conception (*design space*) qui est un espace multidimensionnel de robustesse où la qualité de la performance de la méthode est assurée avec un niveau de probabilité défini. Dans cette approche, le développement commence par la définition du profil cible analytique (ATP) et des attributs critiques de la méthode (CMA). L'ATP se définit comme l'ensemble des objectifs et

caractéristiques visés par la méthode afin d'être adaptée à l'usage prévu. Quant aux CMA, ce sont les réponses à mesurer et qui doivent être dans une limite ou plage appropriée afin d'assurer la qualité de la méthode développée donc de se conformer à l'ATP (dans notre étude, il s'agissait des résolutions entre les différents pics). Une évaluation du risque de qualité est ensuite effectuée pour sélectionner les paramètres critiques de la méthode (CMP) qui sont les paramètres dont la variation a un impact sur les CMA (dans notre étude, il s'agit du pH, de la température et de la pente du gradient). Enfin, la réalisation d'un plan de surface de réponse associé à une analyse de l'incertitude du modèle de prédiction (effectué par simulations de Monte Carlo), permet de déterminer l'espace de conception c'est-à-dire la combinaison multidimensionnelle des CMP où les CMA répondent aux spécifications requises avec un niveau d'assurance défini.

La méthode développée a été ensuite validée selon la stratégie de l'erreur totale qui est conforme aux exigences de la ligne directrice ICH Q2 (R2) sur la validation des méthodes. Le caractère vert de la méthode a été évalué selon les approches NEMI et « *eco-scale* » analytique. Enfin, la méthode a été utilisée pour l'analyse des impuretés aussi bien dans les matières premières que dans des comprimés de la combinaison thérapeutique d'artésunate et d'amodiaquine.

Cette étude a fait l'objet d'une publication parue dans le « *journal of pharmaceutical and biomedical analysis* ».

Article 3

Development of a green HPLC method for the analysis of artesunate and amodiaquine impurities using Quality by Design

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 190 (2020) 113507.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113507>

Moussa Yabré^{1,2}, **Ludivine Ferey**¹, **Issa Touridomon Somé**², **Guilhem Sivadier**³, **Karen Gaudin**^{1*}

1 ChemBioPharm Team, ARNA Laboratory, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Bordeaux University, F-33000 Bordeaux, France

2 Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé (LATES), Université Joseph Ki-Zerbo, Ouaga 03 BP 7021, Burkina Faso

3 Centre Humanitaire des Métiers de la Pharmacie, 4 voie militaire des gravanches, 63100 Clermont-Ferrand, France

Received 22 April 2020, Accepted 24 July 2020

Key words: Green chromatography, Quality by Design, design space, impurity analysis, amodiaquine, artesunate, method validation

1. Introduction

Green Analytical Chemistry (GAC) emerged from green chemistry and has gained increasing interest and acceptance among researchers to reduce environmental impacts and improve the health safety of analysts [1,2]. GAC consists in eliminating or reducing hazardous chemicals from analytical processes to improve environmental and health friendliness, without compromising method performance [3]. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the reversed-phase mode is the most widely used analytical technique for pharmaceutical quality control (QC) and is involved in the analysis of active pharmaceutical ingredients (API) as well as their impurities [4]. However, RP-HPLC methods commonly use large amounts of hazardous organic solvents such as acetonitrile and produce high quantities of waste to be disposed, leading to important issues in terms of ecological impact and operator safety [5,6]. Developing green HPLC methods becomes therefore highly desirable [7].

Based on the 12 principles of green chemistry, some strategies are commonly implemented to achieve greener liquid chromatography methods [2,8]. One strategy is to reduce solvent consumption through a decrease of the length, internal diameter, and/or particle size of the column. However, this approach often implies the use of expensive ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) instruments which limits its access in QC laboratories especially in resource-limited countries. Another way to make liquid chromatography ecofriendly is to substitute classically used organic solvents, mainly acetonitrile and methanol by greener ones [9]. Ethanol is one of the best green alternative solvent because of its sourcing and safety of handling by operators [10].

Unfortunately, the use of green analytical methods is still limited in the pharmaceutical field, particularly in QC activities. This could be partly explained by analytical methods described in Pharmacopeia monographs which are usually not ecofriendly [11]. Other reasons may be the lack of knowledge or experience and the high cost of equipment renewal to reach higher performances, e.g. the purchase of an UHPLC instrument. However, green methods can be developed even with conventional apparatus without requiring expensive equipment or technology, leading to cheaper methods.

Artesunate (AS) and amodiaquine (AQ) association is one of the WHO-recommended Artemisinin-based combination therapies to treat uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Both artesunate and amodiaquine are part of the WHO Model lists of Essential Medicine [12] and their fixed dose combination tablets are available on the market. Besides the

quantitative determination of APIs, quality control also requires the determination of impurities in the bulk drugs as well as in the finished products. In the International Pharmacopeia [13], the related substances analysis of artesunate is done by RP-HPLC using acetonitrile while amodiaquine impurities are analyzed by Thin Layer Chromatography using chloroform which has toxicity concerns. In literature, many analytical methods are described for the determination of related substances and degradation products for either artesunate [14,15] or amodiaquine [16,17] but to the best of our knowledge, there is no published method for the single analysis of artesunate and amodiaquine impurities. Also, green chemistry principles were not applied during method developments.

In pharmaceutical QC, the simultaneous analysis of an API and its related impurities is most often challenging because of the similarity of their chemical structures and the high difference in quantities between API and impurities. To overcome these difficulties, a systematic approach to method development using Quality by Design (QbD) is highly recommended [18]. QbD is a concept of quality initially introduced by the Food and Drug Administration in 2004 to be applied in the pharmaceutical industry for manufacturing processes [19]. Since 2009, QbD methodology is supported by ICH through the ICH Q8 (R2) guideline [20]. When applied to analytical methods, QbD is commonly called Analytical Quality by Design (AQbD) and can be defined as a systematic approach to development that begins with predefined objectives and emphasizes analytical method understanding and control, based on sound science and quality risk management [21]. The main objective of QbD methodology is the definition of the design space also called the method operable domain region (MODR) corresponding to the multidimensional robustness space where any combination of variables has demonstrated to provide assurance of method quality [22,23]. Dealing with pharmaceutical analysis, QbD approach has been mainly applied to impurities or degradation products analysis [18,19,21]. This concept has also been used for the screening of APIs but to a lower extent [24,25]. However, examples combining QbD strategy with green chemistry principles remain limited [11,25].

In this work, an AQbD approach was developed to achieve a single and green RP-HPLC method for the analysis of artesunate and amodiaquine impurities. This development was particularly challenging due to the complexity of the mixture to be separated composed of 9 molecules including acidic, basic and structurally related compounds (*Figure 1*).

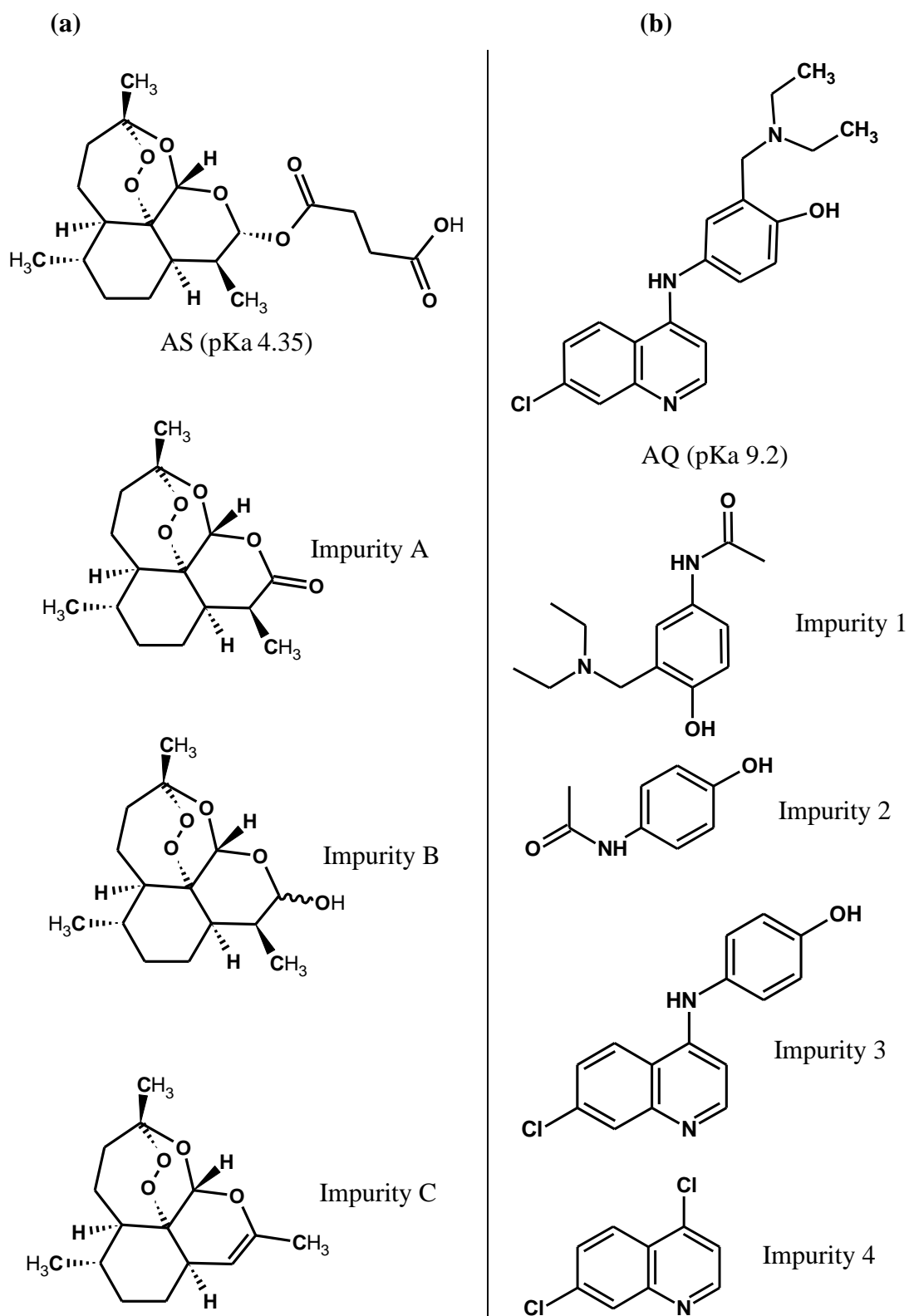


Figure 1. Chemical structures of (a) AS and its main impurities (A, B and C), (b) AQ and its main impurities (1, 2, 3 and 4).

Moreover, the use of an elution gradient was required raising detection concerns due to ethanol wavelength cut-off and the presence of compounds with poor detection in UV. The developed method was validated for impurity analysis of AS and AQ raw materials.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Amodiaquine hydrochloride (>99%) and artesunate (>99%) United States Pharmacopeia (USP) reference Standards, 7-chloro-4-(4-hydroxyphenylamino)quinolone (Impurity 3), 4,7-dichloroquinoline (Impurity 4, 99%), and artemisinin (Impurity A, 98%) were supplied from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). 4-acetamido-2-diethylaminomethylphenol (Impurity 1, >95%) and anhydrodihydro-artemisinin (Impurity C, 98%) were purchased from Carbosynth Ltd (Berkshire, UK). Paracetamol (Impurity 2, 99%), and dihydroartemisinin (Impurity B) were respectively bought from Cooper (Melun, France) and Mangalam Drugs and organics Ltd (India). Amodiaquine dihydrochloride dihydrate raw materials were obtained from Parke Davis (Senegal) while artesunate raw materials were purchased from Knoll BASF Pharma (Liestal, Switzerland). Ethanol (EtOH) 96% HPLC grade, acetic acid HPLC grade ($\geq 99.9\%$), formic acid LC/MS grade (99%), and ammonium acetate (99%) were purchased from VWR chemicals (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Ammonium formate was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). HPLC grade water (minimum resistivity of 18.2 M Ω) was produced in house by ELGA Millipore system (France). Artesunate/amodiaquine 100mg/270mg fixed dose tablets were from Sanofi Winthrop (Morocco).

2.2. Instrumentation

Chromatographic experiments were performed on an Accela UHPLC system (Thermo Scientific, USA) equipped with a pumping device, an autosampler, a column oven, and a diode array detector.

2.3. Analytical conditions

The chromatographic columns used in this study were Xbridge BEH C18 (150 mm x 3 mm, 5 μ m) purchased from Waters (Milford, MA, USA). All analyzes were performed in gradient mode.

UV spectra were systematically recorded from 200 to 400 nm for peak identification. To ensure a satisfactory sensitivity, peak integrations were performed at 210 nm for AS and its impurities, and 254 nm for AQ and its impurities. For all experiments, the sample injection volume was 10 μ L. An experimental design was used to vary simultaneously gradient slope, pH of mobile phase A, and column temperature.

Mobile phase A was an aqueous solution with pH modifiers to reach the desired pH. For method development, pH 2.9 was obtained by mixing 10 mM formic acid with 10 mM ammonium formate while pH 3.5 was fixed using a mixture of 10 mM acetic acid and 10 mM ammonium acetate. A pH of 3.2 was obtained with a 20 mM acetic acid solution. At the working point, a pH of 3.35 was fixed using 10 mM acetic acid. Mobile phase B was composed of 96% EtOH containing the same proportion of pH modifiers as mobile phase A to prevent ionic concentration change during the gradient. The gradient profile consisted in a linear ramp from 5% to 80% of mobile phase B, which corresponded to a variation of 72% in pure ethanol from 4.8% to 76.8%. Since an UHPLC system was used and for a suitable transfer of the method to a classical HPLC apparatus, an isocratic plate of 3 min consisting in 5% of mobile phase B was added, at the beginning of the gradient for all analyses. Flow rate was set 0.4 mL/min.

2.4. Sample preparation

2.4.1. Sample preparation for method development

Stock solutions of AQ and AS at 10 mg/mL and 40 mg/mL, respectively, were prepared in 96% EtOH. For each impurity, a stock solution of 1 mg/mL were prepared in 96% EtOH. Working concentration of AQ was set at 2 mg/mL while AS, which has low absorbance in UV, was injected at 20 mg/mL.

Each AQ impurity was studied at 0.5 % (0.01 mg/mL) of AQ concentration. Working concentration of AS impurities was set at 0.5% (0.1 mg/mL) for impurity A and 2.5 % (0.5 mg/mL) for Impurity B, relative to AS concentration. Concentration levels were determined according to the International Pharmacopeia related substance specifications of these two drugs [13].

For AQ and its impurities, solutions were prepared by diluting appropriate volumes of stock solutions in water - 96% EtOH (95/5, v/v) while solutions of AS and its impurities were obtained by diluting stock solutions using water - 96% EtOH (50/50, v/v). A higher percentage of EtOH was required for dilution of AS and its relative impurities samples because of solubility problems whereas at such high percentage of EtOH, the early eluted compounds, AQ and the

majority of its impurities, evidenced peak broadening. Two mixtures were prepared for design space checking and working point analysis by considering critical pairs of peaks. The first mixture was composed of AQ and its impurities at 1 mg/mL and 0.005 mg/mL, respectively in water - 96% EtOH (95/5, v/v). The second mixture was prepared in water - 96% EtOH (50/50, v/v) by adding AS at a concentration of 20 mg/mL, impurity A at 0.1 mg/mL, impurity B at 0.5 mg/mL, and impurity 4 at 0.01 mg/mL to check its critical separation with the second peak of impurity B.

Impurity C was not added during the method development due to its high price and preliminary studies which showed that it was the last eluted compound.

2.4.2. Sample preparation for method validation

2.4.2.1. Amodiaquine impurities

Each day, a stock solution of each impurity was prepared at 1 mg/mL in 96% EtOH. The target concentration of each impurity was 0.005 mg/mL (corresponding to 0.5% of an AQ concentration of 1 mg/mL).

For the calibration set, stock solutions of each impurity were diluted with water – 96% EtOH (95/5 v/v) containing 10 mM acetic acid to obtain three different concentration levels: 0.0025 mg/mL, 0.005 mg/mL, and 0.0075 mg/mL. Calibration standards were prepared in duplicate by repeating the dilution step.

For the validation set, five concentration levels were injected for each impurity: 0.0025 mg/mL, 0.004 mg/mL, 0.005 mg/mL, 0.006 mg/mL, and 0.0075 mg/mL. AQ was added to samples by mixing appropriate volumes of stock solutions and diluting in water – 96% EtOH (95/5 v/v) containing 10 mM acetic acid to reach the desired impurity concentration and a concentration of 1 mg/mL for AQ. Validation standards were prepared in triplicate by repeating the dilution step.

This procedure was repeated at three different days and each solution was analyzed under the chromatographic conditions of the working point.

2.4.2.2. Artesunate impurities

Each day, a stock solution of each impurity was prepared at 1 mg/mL in 96% EtOH.

For the calibration set, stock solutions of each impurity were diluted with water - 96% EtOH (50/50 v/v) containing 10 mM of acetic acid to obtain three different levels of concentrations: 0.05, 0.1, and 0.15 mg/mL for impurity A, 0.1, 0.3, and 0.6 mg/mL for impurity

B, 0.02, 0.04, and 0.072 mg/mL for impurity C. Calibration standards were prepared in duplicate by repeating the dilution step.

For the validation set, five concentration levels were injected: 0.05, 0.08, 0.1, 0.12, and 0.15 mg/mL for impurity A, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, and 0.6 mg/mL for impurity B, and 0.02, 0.03, 0.04, 0.06, and 0.072 mg/mL for impurity C. AS was added to samples by mixing appropriate volumes of stock solutions and diluting in water - 96% EtOH (50/50, v/v) containing 10 mM of acetic acid to reach the desired impurity concentration and a concentration of 20 mg/mL for AS. Validation standards were prepared in triplicate by repeating the dilution step.

This procedure was repeated at three different days and each solution was analyzed under the chromatographic conditions of the working point.

Because impurity B (dihydroartemisinin) exists in two forms in equilibrium (α -dihydroartemisinin and β -dihydroartemisinin), leading to two peaks in HPLC [26], its area was calculated taking the sum of areas of the two peaks.

2.4.3. Sample preparation for raw materials and tablets

AQ raw materials were prepared at 1 mg/mL in water - 96% EtOH (95/5 v/v) containing 10 mM acetic acid while AS raw materials were prepared at 20 mg/mL in water - 96% EtOH (50/50 v/v) containing 10 mM acetic acid.

For the analysis of fixed dose tablets, two preparations from the powdered tablets were done, one allowing to analyze AQ at 1 mg/mL in water - 96% EtOH (95/5 v/v) containing 10 mM acetic acid and the second allowing to analyze AS at 20 mg/mL in water - 96% EtOH (50/50 v/v) containing 10 mM acetic acid.

2.5. Software

JMP 11.0 software (package) (S.A.S Institute Inc, Cary, NC, USA) was used to build design of experiments, to model responses and to compute the Design Space using Monte Carlo Simulations. Iso-response surfaces were built using Design Expert 9.0.6 software (Stat-Ease Inc, Minneapolis, MN, USA).

3. Results and discussion

3.1. Method development and optimization

The development of the method was conducted according to AQBd approach which started with the definition of the analytical target profile (ATP) and the subsequent choice of critical method attributes (CMAs). Critical method parameters (CMPs) were then selected through a quality risk assessment and a design of experiment (DoE) was carried out to optimize method. Finally, Monte Carlo simulations were used to define the MODR i.e. the multidimensional combination of CMPs where CMAs simultaneously satisfied specifications with a defined probability [21,22].

3.1.1. Analytical target profile

ATP is defined as the purpose and the scope of the analytical method [18,22]. In our study, it consisted in developing a green and robust analytical method, able to implement in resource-limited laboratories, for the quantitative analysis of impurities of both AS and AQ. According to the International Pharmacopeia and literature, AS and AQ have three and four main impurities, respectively [13,16,17]. The structures of both APIs: AS and AQ, and their related compounds are reported in *Figure 1*.

Based on the ATP, RP-HPLC was chosen as the separation technique to achieve a baseline separation of AQ, AS and their impurities. In fact, HPLC instrument is a commonly used analytical tool for pharmaceutical analysis [4]. It is available even in resource-limited QC laboratories. In addition, the substitution of toxic solvents by more eco-friendly ones is a possible approach to green RP-HPLC [9].

3.1.2. Critical method attributes

To reach ATP, CMAs were selected. They are measured responses that should be within an appropriate limit or range to ensure the desired quality of the analytical method [22]. In this study, resolutions (R_s) between all peaks were retained as CMAs. In that case, since the elution order was kept the same on the whole experimental space investigated, R_s were expected to be monotonic responses, and thus could be well modelled with multiple linear regressions. As impurity C was not included during method development and two peaks were detected for impurity B, 8 resolutions between adjacent peaks were considered as CMAs. To achieve a good quantification, a separation between peaks with resolutions at least equal to 1.5 was targeted.

3.1.3. Critical method attributes

The next step was to define CMPs which are parameters whose variability has an impact on one or more CMA(s) and therefore should be monitored or controlled to ensure that the method meets the desired quality. As several factors can affect the performance of a chromatographic method, an approach based on quality risk assessment was followed. An Ishikawa diagram was used to identify parameters having the highest risk of affecting CMAs, to be further studied (*Figure 2*). This diagram gathers the different types of CMPs which could have a potential effect on CMAs. Three different categories were distinguished by a color: CMPs related to the HPLC equipment are in black, CMPs fixed from background knowledge are justified in the text below and appear in blue, and CMPs in red were optimized through DoE.

Two wavelengths were required to detect the two types of molecules. A low wavelength (i.e. 210 nm) was needed for AS and its impurities. However, this wavelength could not be used for AQ and its relative substances because of too high UV response. Therefore, a second wavelength was selected at 254 nm.

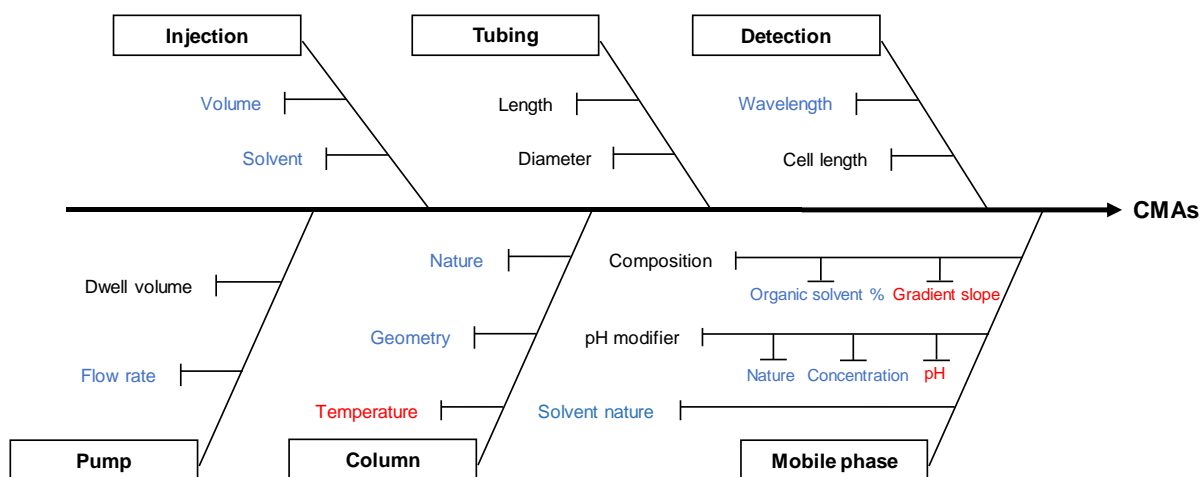


Figure 2. Ishikawa diagram for an HPLC method. Factors related to HPLC equipment are in black, factors fixed based on prior knowledge are in blue, and factors selected as CMPs are in red.

3.1.3.1. Column selection

The Xbridge BEH C18 column was selected because it offered, not only a high stability at low and high pH values but also satisfactory peak shape for basic compounds such as AQ and some of its impurities (Impurities 1 and 3). In fact, the presence of ethylene bridges

in the silica structure and the trifunctional bonding limits free residual silanols and their accessibility. It is well known that free silanols, when ionized, can interact with positively charged compounds (case of basic compounds at low pH), leading to peak tailing and peak broadening. The column geometry (150 mm x 3 mm, 5 μ m) was selected in order to be able to work with classical HPLC equipment. The internal diameter was selected as low as possible to remain compatible with the apparatus and limit the flow rate in order to limit solvent consumption.

3.1.3.2. Green organic solvent and reagent selection for mobile phase and sample preparation

Mobile phases in RP-HPLC are generally composed of an aqueous part with reagents to adjust pH and an organic solvent. Acetonitrile and methanol are the two common organic solvents used in RP-HPLC mainly because of the low viscosity of their mixture with water and their low UV cut-off wavelength [5]. However, they present environmental impact and health safety issues. In fact, they have been ranked as hazardous solvents due to their inherent toxicity and the great requirements to dispose their waste [6]. Greening RP-HPLC methods can be done by replacing acetonitrile and methanol by greener ones [5,6,9]. Among alternative solvents, ethanol has been selected due to its advantages: low toxicity, bio-sourcing and biodegradability. Nevertheless, its main drawbacks are baseline drift during gradient, especially at low wavelength, and a high viscosity of its mixture with water, leading to high column backpressure [9]. Therefore, in this study, flow rate was fixed at 0.4 mL/min to limit the backpressure at 200 bars and achieve a method compatible with a classical HPLC apparatus.

pH modifiers as green as possible were also investigated, preferentially acetic acid or formic acid alone or else in combination with their corresponding salt, ammonium acetate or ammonium formate.

Dealing with sample preparation, solvents selected were similar to those used for the mobile phase, thereby keeping the GAC approach also for this step of the analytical development. However, solvent composition of samples was adapted to the solubility and eluotropic strength requirement for the elution of each compound. Moreover, to limit the effect of sample solvent on the elution of early eluting peak, a 10 μ L injection volume was selected.

3.1.4. Response-surface DoE

A three level full factorial design was performed to establish the polynomial mathematical models linking the CMAs to the three CMPs (pH of the aqueous phase, gradient

slope, and column temperature). Five center points were added to estimate the experimental error allowing model lack of fit assessment. A total of 32 experiments ($3^3 + 5$) were therefore carried out by DoE. Experiments were performed in a random order to transform unknown systematic errors into random ones except for center points that were regularly distributed to be able to notice changes occurring in the responses during the whole DoE, and thus repeatability problems. The experimental matrix with the measured responses is reported in Supplementary data (*Table S1*).

Variation domains for the three CMPs were determined based on preliminary studies: pH of the aqueous phase between 2.9 and 3.5; gradient slope between 1.6 and 2.8 %/min; and column temperature between 25 and 35°C. The third level was the middle of the variation range of each parameter (3.2 for pH, 2.2%/min for gradient slope and 30°C for column temperature). pH range was restricted to allow good peak shape for basic compounds. In fact, working at a low pH range reduced the number of negative charges at the surface of the silica coming from free silanols and consequently, the interaction between positively charged basic compounds and column surface was weaker, limiting peak tailing. Moreover, temperatures above 35°C led to bad peak shape for impurity B peaks which were not baseline separated. The gradient slope range was fixed, thanks to preliminary studies, with the objective to minimize the risk of not finding any good separation within it.

During analysis, compounds were eluted in this order: impurity 1, impurity 2, AQ, impurity 3, first peak of impurity B, impurity A, AS, second peak of impurity B and lastly Impurity 4. Three responses were found more critical: R_s (impurity A; first peak of impurity B), R_s (AS; impurity A), and R_s (second peak of impurity B; impurity 4).

A full quadratic model was selected and fitted to obtain a predictive model for each CMA. The model is written as follows:

$$y(X_{1 \leq i \leq 3}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^3 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

Where $y(X_{1 \leq i \leq 3})$ represent the CMAs, X_i the CMPs, β_0 the intercept, β_i the linear coefficients, β_{ii} the quadratic coefficients, β_{ij} the first-order interaction coefficients, and ϵ the random error of the method.

The analysis of variance (ANOVA) was used to assess the significance of the models. Obtained results (*Table 1*) showed that all models were significant (p-values <0.0001).

Calculated R^2 ranging from 0.80 to 0.97 and insignificant lack of fit (p-values > 0.05) were obtained for all CMAs, indicating that a high proportion of variation in the responses could be explained by the models, and therefore proving the good quality of the models. Iso-response surfaces (contour plots) of the most critical resolutions are given in Supplementary data (*Figure S1*). Rs (impurity A; first peak of impurity B) and Rs (AS; impurity A) were mostly influenced by the gradient slope while Rs (second peak of impurity B; impurity 4) was particularly impacted by pH and temperature. The gradient slope had a negative effect on Rs (impurity A; first peak of impurity B) and Rs (AS; impurity A). On the contrary, pH and temperature had positive effects on Rs (second peak of impurity B; impurity 4).

In order to satisfy the ATP, the established mathematical models were used to determine the MODR.

Table 1. Coefficients of determination (R^2), p-values to test model significance (ANOVA) and lack of fit of the multiple linear regressions for the 8 CMAs.

CMAs	p-values model	R^2	p-values Lack of fit
Rs 1	<0.0001	0.82	0.3713
Rs 2	<0.0001	0.96	0.5675
Rs 3	<0.0001	0.97	0.2889
Rs 4	<0.0001	0.97	0.5415
Rs 5	<0.0001	0.81	0.7760
Rs 6	<0.0001	0.82	0.3524
Rs 7	<0.0001	0.80	0.1120
Rs 8	<0.0001	0.90	0.2450

Rs 1 = Rs (impurity 2; impurity 1), Rs 2 = Rs (AQ; impurity 2), Rs 3 = Rs (impurity 3; AQ), Rs 4 = Rs (first peak of impurity B; impurity 3), Rs 5 = Rs (impurity A; first peak of impurity B), Rs 6 = Rs (AS; impurity A), Rs 7 = Rs (second peak of impurity B; AS), Rs 8 = Rs (impurity 4; second peak of impurity B).

3.1.5. Method operable design region

The MODR is defined as a zone of robustness where the quality of the method is guaranteed with a high level of assurance [21]. In practice, it corresponds to the variation range of CMPs where CMAs simultaneously satisfy the specifications with a defined probability.

The MODR was established through Monte-Carlo simulations which take into account parameter uncertainty and propagate it to the modelled responses to be able to establish probability maps for the CMAs to meet the specifications, i.e. $R_s \geq 1.5$ [22].

Monte-Carlo simulation experiments were performed over the whole experimental space. The 3D experimental domain was divided in 1 million points and centered on each of them, 5000 random runs were simulated. From these simulations which take into account model error, a distribution of each CMA corresponding to prediction uncertainty was achieved. At each simulated point, an overall defect rate was then calculated, corresponding to the probability that at least one CMA is out of specification, i.e. Rs lower than 1.5. The MODR was then determined as the multidimensional combination of CMPs where the 8 predicted resolutions were at least 1.5 with a probability higher or equal to 95%. *Figure 3* represents the defect rate map as function of pH and temperature for different gradient slope ranges. The MODR is represented by the blue area for which the defect rate is inferior or equal to 5%, corresponding to the following ranges of CMPs: pH, 3.25-3.50; column temperature, 29.5-34.0°C; and gradient slope, 1.60-2.08 %/min.

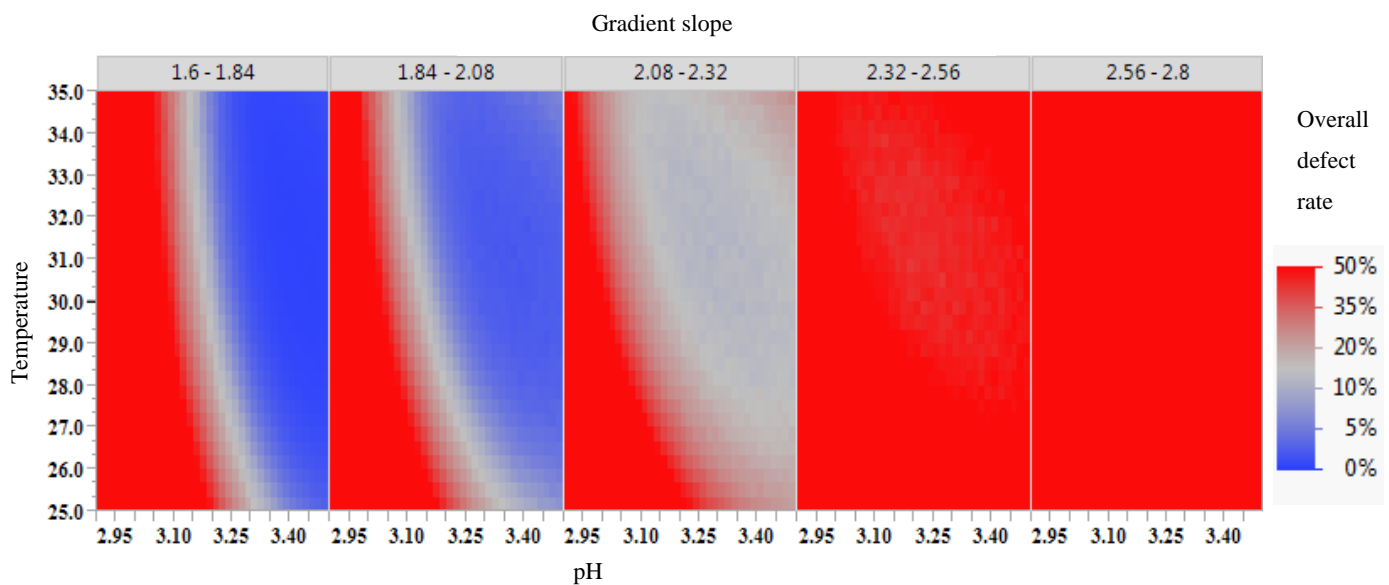


Figure 3. Defect rate maps as function of pH and temperature for different gradient slope ranges

The edge of the MODR was experimentally checked using a two-level full factorial design. Each CMP was varied between the limits of the MODR. For each tested point, a minimum resolution of 1.7 was obtained for all CMAs, as shown in *Table 2*. The requirements inside the MODR were therefore fulfilled.

Table 2. Experimental verification results at the border of the MODR

pH	Temperature (°C)	Gradient slope (%/min)	Rs 1	Rs 2	Rs 3	Rs 4	Rs 5	Rs 6	Rs 7	Rs 8
3.50	34.0	2.08	7.1	2.4	7.6	53.0	1.7	1.8	7.0	2.0
3.25	29.5	1.60	7.3	2.8	9.9	54.8	1.8	2.5	7.3	1.7
3.25	34.0	2.08	7.0	2.4	8.0	54.0	1.7	2.0	6.5	1.9
3.50	29.5	1.60	6.9	2.5	9.4	53.9	1.9	2.5	7.6	1.9
3.50	34.0	1.60	6.7	2.4	8.3	55.2	2.0	2.4	7.0	2.0
3.25	29.5	2.08	7.9	2.6	8.8	50.3	1.8	2.2	6.8	1.8
3.50	29.5	2.08	7.1	2.5	9.1	49.2	1.8	2.3	6.9	1.9
3.25	34.0	1.60	7.2	2.6	8.4	55.7	1.9	2.6	6.7	1.8

Rs 1 = Rs (impurity 2; impurity 1), Rs 2 = Rs (AQ; impurity 2), Rs 3 = Rs (impurity 3; AQ), Rs 4 = Rs (first peak of impurity B; impurity 3), Rs 5 = Rs (impurity A; first peak of impurity B), Rs 6 = Rs (AS; impurity A), Rs 7 = Rs (second peak of impurity B; AS), Rs 8 = Rs (impurity 4; second peak of impurity B).

3.1.6. Working point

Inside the MODR, the working point was selected based on green criteria. Therefore, a pH corresponding to 10 mM acetic acid only (pH 3.35) was chosen. In addition, this pH value was not at the edge of the MODR (pH range from 3.25 to 3.50) for a better robustness of the working point. Retained values for temperature and gradient slope were 30°C and 1.9%/min, respectively. The selected gradient slope was found as a good compromise between reducing analysis time and obtaining a robust separation. *Figure 4* presents the chromatograms obtained under the experimental conditions of the working point. The impurity C of AS, which was not included during method development because of its high price, was injected under the final conditions. As expected, because of its high lipophilic and neutral nature, it was the last eluting compound and was well separated from the other compounds. This impurity was therefore considered during the validation step.

The greenness of the developed method was assessed using two different tools: the National Environmental Methods Index (NEMI) [27] and the Analytical Eco-Scale [28]. NEMI labelling results in an easy-to-read pictogram including four terms: PBT (persistent, bio accumulative, and toxic), Hazardous, Corrosive, and Waste. Each term is colored green or blank depending on whether this particular criterion is fitting or not. The Analytical Eco-scale is a more quantitative approach, based on subtracting penalty points from a total of 100, considering the amount and hazard of reagents, energy consumption, occupational hazards, and amount of waste generated.

Results of the greenness evaluation with a NEMI pictogram colored in green for the four terms (Supplementary data *Figure S2*) and an Eco-scale score of 95 (Supplementary data *Table S2*), allowed to confirm the excellent greenness of the developed method.

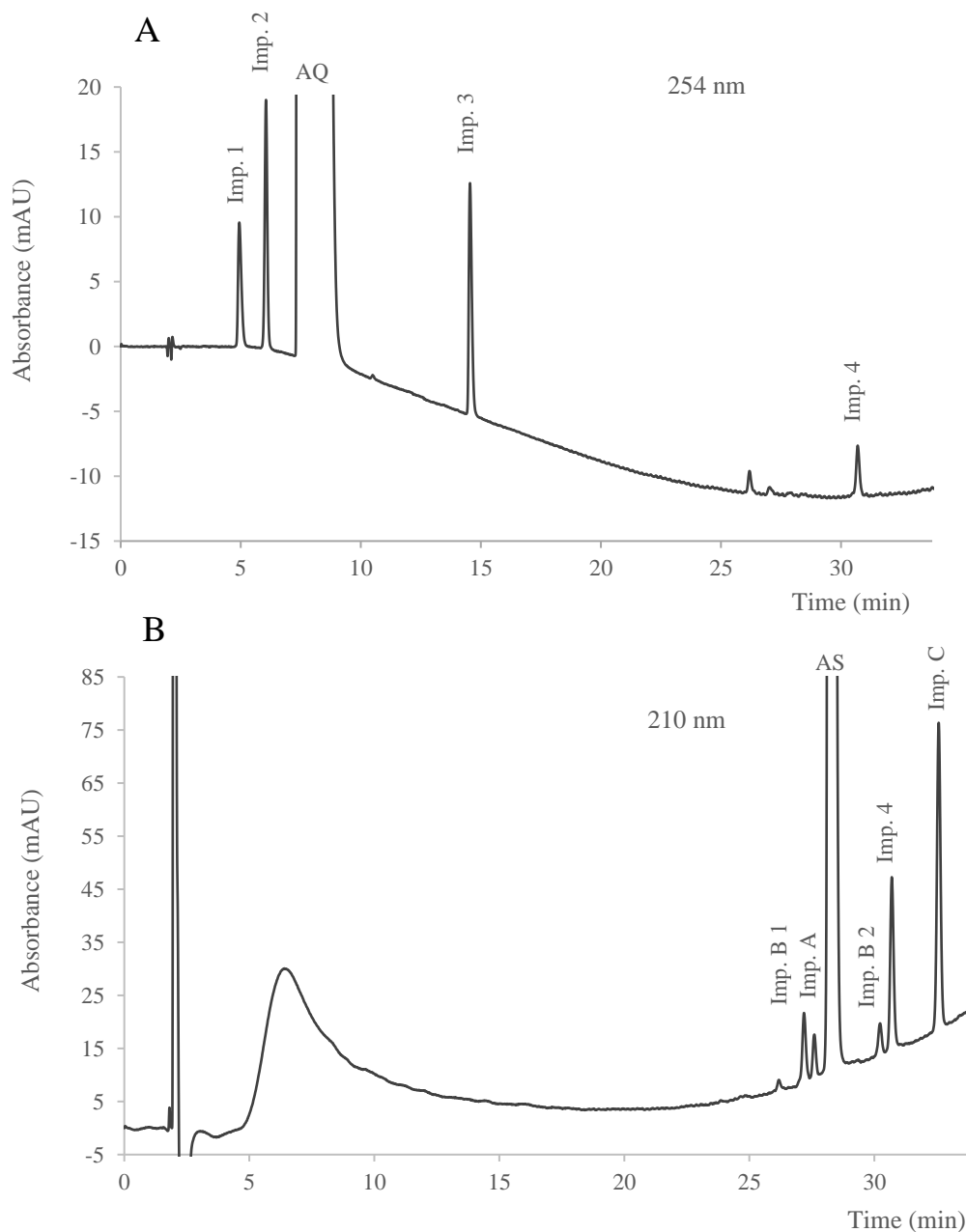


Figure 4. Chromatograms recorded at the working point (pH 3.35 with acetic acid 10 mM, temperature 30°C, gradient slope 1.9 %/min from 4.8% to 76.8 % of EtOH). A. AQ at 1 mg/mL with its impurities. B. AS at 20 mg/mL with its impurities and impurity 4. Concentrations of impurities 1, 2, 3 and 4: 0.005 mg/mL. Concentrations of impurities A, B and C: 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL and 0.06 mg/mL respectively.

3.2. Method validation

The developed RP-HPLC method was validated in order to quantify impurities in AQ and AS raw materials.

The validation step was performed using accuracy profile approach based on β -expectation tolerance intervals [29] with acceptance limits set at $\pm 15\%$ for each impurity. Such accuracy profile methodology is fully compliant to ICH Q2 requirements [30]. For each impurity, method validation was carried out during 3 days at 5 concentration levels performed in triplicates. The chosen calibration models were linear regression models through 0 for all impurities. Using the calibration curves, concentrations were back calculated to assess the linearity, the relative bias, the repeatability, the intermediate precision, and the β -expectation tolerance intervals at 95% probability level.

Taking into account the International Pharmacopeia specifications for AS and AQ related substance analysis, the concentration ranges were: 0.0025-0.0075 mg/mL for impurity 1, 2, 3 and 4, 0.05-0.15 mg/mL for impurity A, 0.1-0.6 mg/mL for impurity B, and 0.02-0.072 mg/mL for impurity C. The target concentrations were 0.1 mg/mL for impurity A, 0.3 mg/mL for impurity B, and 0.04 mg/mL for impurity C, corresponding to 0.5 %, 1.5%, and 0.2 % of AS concentration set at 20 mg/mL, respectively, based on International Pharmacopeia related substance specifications for AS.

For AS impurities, the selected ranges were slightly larger than those required by the specifications of related substance assay. The aim was to be able to use this method also for finished product control. In fact, concentration ranges were chosen in order to cover both finished product and raw material specifications.

Validation results are presented in *Table 3* for AS impurities and in *Table 4* for AQ impurities.

3.2.1. Selectivity

Since the objective of this method was to quantify AQ and AS impurities in raw materials, the selectivity was demonstrated by the fact that both APIs and their related impurities were separated with a resolution at least equal to 1.5, as guaranteed by the MODR.

3.2.2. Linearity

To assess linearity criterion, linear regression models were fitted between the back calculated concentrations and the introduced concentrations over the whole calibration range. Linearity results are presented in *Tables 3 and 4* for AS and AQ impurities, respectively. For all impurities, slopes were close to 1 with intercepts close to 0 and R^2 values were higher than 0.98, showing the good linearity of the developed method.

3.2.3. Trueness and precision

Trueness is defined as the mean bias observed between the concentrations back calculated from the calibration curves the series of measurements and the introduced concentrations. Trueness is expressed in terms of relative bias (%). As can be seen in *Tables 3 and 4* for AS and AQ impurities, respectively, relative biases were found lower than 10%, and thus acceptable given the scope of the method which was to quantify impurities at low concentrations.

Precision was determined by calculating the relative standard deviation (RSD (%)) of calculated concentrations for repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) at each level of validation standards. Precision results are shown in *Tables 3 and 4* for AS and AQ impurities, respectively. RSD values for repeatability and intermediate precision appeared to be lower than 5% for all impurities, indicating a good precision of the method.

3.2.4. Accuracy

Accuracy refers to the closeness of agreement between the test result and the accepted reference value, conventionally accepted as the true value. The accuracy takes into account the total error (random and systematic errors) i.e. the trueness and the precision associated to the analytical method. As shown in *Tables 3 and 4* for AS and AQ impurities, the β -expectation tolerance limits were between $\pm 15\%$ at 95% probability level for all impurities, proving that the method was able to provide accurate results over the whole concentration range for each impurity. The lower and upper limits of quantification (LLOQ and ULOQ) correspond to the dosing range for each impurity: 0.0025-0.0075 mg/mL for AQ impurities, 0.05-0.15 mg/mL for AS impurity A, 0.1-0.6 mg/mL for AS impurity B, and 0.02-0.072 mg/mL for AS impurity C.

Table 3. Validation results of AS impurities

Validation criteria		Impurity A		Impurity B		Impurity C	
Linearity	Range (mg/mL)	0.05-0.15		0.1-0.6		0.020-0.072	
	Slope	1.0922		1.0655		1.0665	
	Intercept	-0.0078		-0.0191		-0.0029	
	R ²	0.9952		0.9966		0.9975	
Trueness	Level	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)
	1	0.050	-5.35	0.100	-7.18	0.020	-5.76
	2	0.080	-1.04	0.200	-2.88	0.030	-3.88
	3	0.100	-0.67	0.300	-3.06	0.040	-1.24
	4	0.120	4.02	0.500	2.55	0.060	2.25
	5	0.150	4.02	0.600	4.14	0.072	2.66
Precision	Level	RSD% of Repeatability/ Intermediate Precision		RSD% of Repeatability / Intermediate Precision		RSD% of Repeatability / Intermediate Precision	
	1	1.40/1.74		1.81/2.00		2.89/3.35	
	2	2.32/2.70		1.47/1.47		0.78/0.78	
	3	1.49/2.85		2.25/2.58		2.84/2.84	
	4	0.84/0.84		0.68/0.68		1.50/1.99	
	5	1.45/1.45		2.18/2.18		1.36/1.36	
Accuracy	Level	β -expectation tolerance limits (%)		β -expectation tolerance limits (%)		β -expectation tolerance limits (%)	
	1	[-9.43, -1.27]		[-11.72, -2.64]		[-13.48, 1.97]	
	2	[-7.27, 5.19]		[-6.17, 0.40]		[-5.61, -2.15]	
	3	[-8.59, 7.24]		[-9.01, 2.89]		[-7.57, 5.10]	
	4	[2.15, 5.88]		[1.02, 4.08]		[-2.63, 7.12]	
	5	[0.78, 7.26]		[-0.73, 9.00]		[-0.37, 5.69]	

Table 4. Validation results of AQ impurities

Validation criteria		Impurity 1		Impurity 2		Impurity 3		Impurity 4	
Linearity	Range (mg/mL)	0.0025-0.0075		0.0025-0.0075		0.0025-0.0075		0.0025-0.0075	
	Slope	1.0378		1.0348		1.0804		1.0118	
	Intercept	-0.0003		-0.0003		-0.0004		0.000006	
	R ²	0.9921		0.9905		0.9892		0.9919	
Trueness	Level	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)	Conc. (mg/mL)	Relative bias (%)
	1	0.0025	-9.43	0.0025	-3.17	0.0025	-5.76	0.0025	2.38
	2	0.0040	-3.30	0.0040	-4.04	0.0040	-2.42	0.0040	4.62
	3	0.0050	-3.15	0.0050	-4.84	0.0050	-5.02	0.0050	2.25
	4	0.0060	-0.50	0.0060	-0.71	0.0060	0.52	0.0060	0.25
	5	0.0075	-0.82	0.0075	1.18	0.0075	3.46	0.0075	2.78
Precision	Level	RSD% of Repeatability / Intermediate Precision		RSD% of Repeatability / Intermediate Precision		RSD% of Repeatability / Intermediate Precision		RSD% of Repeatability / Intermediate Precision	
	1	1.44/1.44		3.24/3.79		2.28/3.41		2.38/3.68	
	2	4.66/4.66		2.06/2.06		1.97/1.97		2.39/2.39	
	3	2.75/3.53		1.25/2.83		2.72/2.72		1.52/2.86	
	4	2.30/2.30		1.80/1.80		3.36/3.36		0.86/2.33	
	5	2.65/3.09		1.26/1.26		3.06/3.13		2.41/3.47	
Accuracy	Level	β -expectation tolerance limits (%)		β -expectation tolerance limits (%)		β -expectation tolerance limits (%)		β -expectation tolerance limits (%)	
	1	[-12.64, -6.21]		[-11.92, 5.58]		[-14.37, 2.85]		[-6.93, 11.70]	
	2	[-13.70, - 7.10]		[-8.63, 0.54]		[-6.80, 1.97]		[-0.70, 9.94]	
	3	[-11.60, - 5.29]		[-12.72, 3.04]		[-11.10, 1.06]		[-5.67, 10.16]	
	4	[-5.64, - 4.64]		[-4.72, 3.31]		[-6.98, 8.02]		[-6.78, 7.28]	
	5	[-7.97, - 6.33]		[-1.63, 3.98]		[-3.55, 10.47]		[-5.95, 11.52]	

3.2.5. Column inter-batch repeatability

To check the column inter-batch repeatability, AS, AQ and their impurities were analyzed on 3 different column batches. As shown in *Table 5*, whatever the column batch, compounds were well separated ($R_s \geq 1.6$) with a good repeatability for most resolutions ($RSDs < 6\%$), except for the resolution between impurities 1 and 2 which was always satisfactory ($R_s > 2$) but varied greatly depending on the column batch ($RSD = 48.5\%$). This could be explained by the retention time variation observed for impurity 1 which was the first eluting compound. However, good column inter-batch repeatability of peak areas was achieved for all impurities ($RSDs < 4\%$) (*Table 6*).

Table 5. Column inter-batch repeatability of resolutions

	Rs 1	Rs 2	Rs 3	Rs 4	Rs 5	Rs 6	Rs 7	Rs 8	Rs 9
Batch 1	3.0	2.4	8.8	44.8	1.7	2.0	5.0	2.1	6.6
Batch 2	2.1	2.2	8.5	42.9	1.6	2.0	4.9	1.9	7.1
Batch 3	5.4	2.3	9.0	42.4	1.7	2.1	5.4	2.1	7.4
Mean	3.5	2.3	8.8	43.4	1.7	2.0	5.1	2.1	7.0
RSD (%)	48.5	5.3	2.4	2.9	3.3	2.1	5.3	5.7	5.7

Rs 1 = Rs (impurity 2; impurity 1), Rs 2 = Rs (AQ; impurity 2), Rs 3 = Rs (impurity 3; AQ), Rs 4 = Rs (first peak of impurity B; impurity 3), Rs 5 = Rs (impurity A; first peak of impurity B), Rs 6 = Rs (AS; impurity A), Rs 7 = Rs (second peak of impurity B; AS), Rs 8 = Rs (impurity 4; second peak of impurity B), Rs 9 = Rs (Impurity C; impurity 4).

Table 6. Column inter-batch repeatability of peak areas

	Impurity 1	Impurity 2	Impurity 3	Impurity 4	Impurity A	Impurity B	Impurity C
Batch 1	1.55	3.16	3.43	0.78	2.17	6.54	11.16
Batch 2	1.54	3.18	3.65	0.77	2.20	6.61	11.25
Batch 3	1.57	3.18	3.43	0.77	2.13	6.72	11.32
Mean	1.55	3.17	3.50	0.77	2.16	6.62	11.24
RSD (%)	1.15	0.43	3.67	0.82	1.64	1.39	0.69

3.3. Applications

The developed and validated method was applied to analyze two different batches of AS and AQ raw materials (Supplementary data *Tables S3 and S4*). For AS raw materials, impurities B and C were found below 0.5 % and 0.1 %, respectively. These values were largely under International Pharmacopeia specifications which are 1% and 0.2 % for impurities B and C, respectively. Impurity 3 and some unknown compounds were found in AQ raw materials at percentages inferior to 0.1 %, meeting International Pharmacopeia specification ($\leq 0.5\%$).

Although the method was validated for related substance assay of raw materials, , an analysis of excipient mixture and AS and AQ in fixed dose tablets, was attempted to evidence that this method can provide an analytical response for quality control of AQ and AS combination therapy. The excipient peaks were separated from the peaks of AQ, AS and their impurities (Supplementary data *Figure S3*). It highlighted an appropriate selectivity of the developed method for its potential application to analyze impurities in combination therapy of AS and AQ.

In addition, this study showed the potential of this method for finished product analysis. Impurity 4 of AQ was observed and separated during tablets analysis from AS and its degradation products (DHA), thereby they can be correctly quantified.

4. Conclusion

In this work, a single, green and robust RP-HPLC method using an ethanol-based mobile phase was developed according to Quality by Design approach for the quantitative analysis of impurities of both artesunate and amodiaquine drugs. This method development was particularly challenging since it targets single chromatographic condition for analyzing 9 molecules including acidic, basic, and structurally related compounds. A gradient elution using ethanol was therefore needed, raising detection issues due to the high UV cut-off of ethanol and the poor detection in UV of AS related compounds, requiring a detection at 210 nm. QbD strategy enabled to define the method operable domain region with a high assurance level of 95%. Inside the robustness space, a mobile phase composed of ethanol and 10 mM acetic acid was selected to achieve a green HPLC method as assessed by NEMI and Eco-scale approaches. This method was validated through a total error approach using accuracy profiles and successfully applied to the quality control of raw materials and artesunate/amodiaquine fixed

dose combination tablets. Moreover, the generated column backpressure under 200 bars showed that this analysis can be performed using conventional HPLC equipment and consequently could be implemented in resource-limited laboratories. Through the use of QbD development approach and the integration of green chemistry principles, this work opens new opportunities in greening HPLC methods in the framework of pharmaceutical quality control.

References

- [1] P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 686–694. <https://doi.org/10.1021/ar010065m>.
- [2] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [3] H.M. Mohamed, Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.010>.
- [4] S. Görög, The changing face of pharmaceutical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.07.011>.
- [5] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, Greening analytical chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 667–680. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.008>.
- [6] J. Płotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, J. Namieśnik, Green chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1307 (2013) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>.
- [7] M. Koel, Do we need Green Analytical Chemistry?, *Green Chem.* 18 (2016) 923–931. <https://doi.org/10.1039/C5GC02156A>.
- [8] E. A. Peterson, B. Dillon, I. Raheem, P. Richardson, D. Richter, R. Schmidt, H. F. Sneddon, Sustainable chromatography (an oxymoron?), *Green Chem.* 16 (2014) 4060–4075. <https://doi.org/10.1039/C4GC00615A>.
- [9] M. Yabré, L. Ferey, I.T. Somé, K. Gaudin, Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis, *Molecules.* 23 (2018) 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules23051065>.

- [10] A.L. Assassi, C.-E. Roy, P. Perovitch, J. Auzerie, T. Hamon, K. Gaudin, Green analytical method development for statin analysis, *J. Chromatogr. A.* 1380 (2015) 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.066>.
- [11] C. Boussès, L. Ferey, E. Vedrines, K. Gaudin, Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115 (2015) 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.07.003>.
- [12] WHO, 21st WHO Model List of Essential Medicines, (2019). <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1> (accessed February 26, 2019).
- [13] The International Pharmacopoeia, 9th ed., WHO Department of Essential Medicines and Health Product, 2019. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (accessed April 27, 2018).
- [14] C. Charrier, G. Bertho, O. Petigny, P. Moneton, R. Azerad, A new derivative detected in accelerated ageing of artesunate-amodiaquine fixed dose combination tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 81 (2013) 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.009>.
- [15] K. Gaudin, M.-H. Langlois, A. Barbaud, C. Boyer, P. Millet, F. Fawaz, J.-P. Dubost, Stability of artesunate in pharmaceutical solvents, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.09.039>.
- [16] V.G. Dongre, P.P. Karmuse, P.D. Ghugare, S.K. Kanojiya, S. Rawal, Investigation of amodiaquine bulk drug impurities by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2227–2233. <https://doi.org/10.1002/rcm.3605>.
- [17] L. Hoellein, U. Holzgrabe, Development of simplified HPLC methods for the detection of counterfeit antimalarials in resource-restraint environments, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.06.013>.
- [18] A. Dispas, H.T. Avohou, P. Lebrun, P. Hubert, C. Hubert, ‘Quality by Design’ approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances, *TrAC Trends Anal. Chem.* 101 (2018) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.028>.
- [19] K. Gaudin, L. Ferey, Quality by design: A tool for separation method development in pharmaceutical laboratories, *LC-GC Eur.* 29 (2016) 16–25.
- [20] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Quality risk management Q8 (R2), in: *Int. Conf. Harmon. Tech. Requir. ForRegistration Pharm. Hum. Use*, 2009.

- [21] R. Deidda, S. Orlandini, P. Hubert, C. Hubert, Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 161 (2018) 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.050>.
- [22] E. Rozet, P. Lebrun, P. Hubert, B. Debrus, B. Boulanger, Design Spaces for analytical methods, *TrAC Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.007>.
- [23] S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 443–450. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6302-2>.
- [24] B. Debrus, P. Lebrun, J.M. Kindenge, F. Lecomte, A. Ceccato, G. Caliaro, J.M.T. Mbay, B. Boulanger, R.D. Marini, E. Rozet, Ph. Hubert, Innovative high-performance liquid chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach, using design of experiments, independent component analysis and design space, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 5205–5215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.102>.
- [25] L. Ferey, A. Raimbault, I. Rivals, K. Gaudin, UHPLC method for multiproduct pharmaceutical analysis by Quality-by-Design, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018) 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.014>.
- [26] I. D'Acquarica, F. Gasparri, D. Kotoni, M. Pierini, C. Villani, W. Cabri, M. Di Mattia, F. Giorgi, Stereodynamic Investigation of Labile Stereogenic Centres in Dihydroartemisinin, *Molecules.* 15 (2010) 1309–1323. <https://doi.org/10.3390/molecules15031309>.
- [27] L.H. Keith, L.U. Gron, J.L. Young, Green Analytical Methodologies, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2695–2708. <https://doi.org/10.1021/cr068359e>.
- [28] A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.
- [29] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.027>.
- [30] J. Abraham, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: text and Methodology, Q2 (R1), in: International Conference On Harmonisation Of

Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: C. Tietje, A. Brouder (Eds.), *Handb. Transnatl. Econ. Gov. Regimes*, Brill | Nijhoff, 2010. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>.

Supplementary data

Table S1. Experimental matrix with studied factors and measured responses

Run	pH	Temp. (°C)	GS (%/min)	Rs 1	Rs 2	Rs 3	Rs 4	Rs 5	Rs 6	Rs 7	Rs 8
1	3.2	30	2.2	6.78	2.21	7.92	51.00	1.62	1.79	6.87	1.71
2	2.9	35	1.6	5.94	3.38	10.14	61.40	1.87	2.35	7.05	1.11
3	3.5	25	1.6	6.08	2.32	7.78	51.87	1.60	3.04	7.56	1.74
4	2.9	25	2.8	6.02	2.14	8.43	43.72	1.15	1.70	6.10	1.17
5	3.5	35	2.8	5.85	2.57	7.19	46.30	1.21	1.99	7.51	2.08
6	3.5	35	1.6	5.70	2.81	7.91	57.18	1.98	2.61	7.84	2.04
7	3.2	30	2.2	6.49	2.23	7.77	51.75	1.86	1.74	7.03	1.69
8	3.5	25	2.8	6.27	1.94	7.08	42.06	1.40	1.35	6.67	1.61
9	2.9	35	2.8	5.17	2.53	8.55	47.78	1.42	1.42	6.71	1.67
10	2.9	25	1.6	5.80	2.73	9.65	53.64	1.70	2.64	6.74	1.17
11	3.2	30	2.2	7.23	2.35	8.08	53.78	1.75	2.20	6.91	1.70
12	2.9	30	1.6	5.67	2.80	10.01	58.12	1.78	2.49	7.21	1.21
13	3.2	25	1.6	7.05	2.28	8.61	52.42	1.72	2.35	6.73	1.46
14	2.9	35	2.2	6.19	3.07	9.37	55.81	1.57	1.91	7.02	1.56
15	3.2	35	2.2	6.60	2.50	8.12	54.01	1.58	1.92	7.08	1.77
16	3.5	30	1.6	6.26	2.42	8.29	56.69	1.94	2.23	7.00	1.97
17	3.2	35	1.6	6.56	2.71	8.82	59.02	1.81	2.33	7.19	1.81
18	3.5	25	2.2	6.90	2.02	7.79	44.93	1.66	1.97	7.05	1.72
19	3.2	25	2.2	7.18	2.00	8.06	46.03	1.62	2.18	6.81	1.57
20	3.2	30	2.8	6.91	2.01	7.78	46.34	1.35	1.57	6.89	1.67
21	3.2	30	2.2	6.84	2.13	7.82	51.51	1.48	2.05	6.80	1.72
22	2.9	25	2.2	5.60	2.44	9.07	46.06	1.52	2.16	6.34	1.34
23	3.2	30	1.6	7.35	2.49	8.50	56.02	1.77	2.47	6.79	1.46
24	2.9	30	2.8	5.50	2.28	8.56	46.24	1.20	1.70	6.75	1.50
25	2.9	30	2.2	5.57	2.53	9.08	51.36	1.68	2.06	6.74	1.44
26	3.2	30	2.2	6.67	2.18	8.04	51.76	1.72	1.90	6.97	1.85
27	3.5	30	2.8	6.47	2.07	7.32	44.32	1.42	1.07	6.94	1.84
28	3.2	25	2.8	7.21	1.81	7.59	42.54	1.24	1.48	6.41	1.38
29	3.5	35	2.2	6.27	2.55	7.60	52.32	1.42	1.68	7.66	1.87
30	3.2	35	2.8	6.54	2.32	7.49	46.54	1.44	1.51	6.92	1.86
31	3.5	30	2.2	6.52	2.29	7.63	49.04	1.60	1.75	7.35	1.79
32	3.2	30	2.2	6.69	2.17	7.90	51.07	1.61	1.76	7.15	1.74

Temp. = temperature, GS = Gradient slope, Rs 1 = Rs (impurity 2; impurity 1), Rs 2 = Rs (AQ; impurity 2), Rs 3 = Rs (impurity 3; AQ), Rs 4 = Rs (first peak of impurity B; impurity 3), Rs 5 = Rs (impurity A; first peak of impurity B), Rs 6 = Rs (AS; impurity A), Rs 7 = Rs (second peak of impurity B; AS), Rs 8 = Rs (impurity 4; second peak of impurity B).

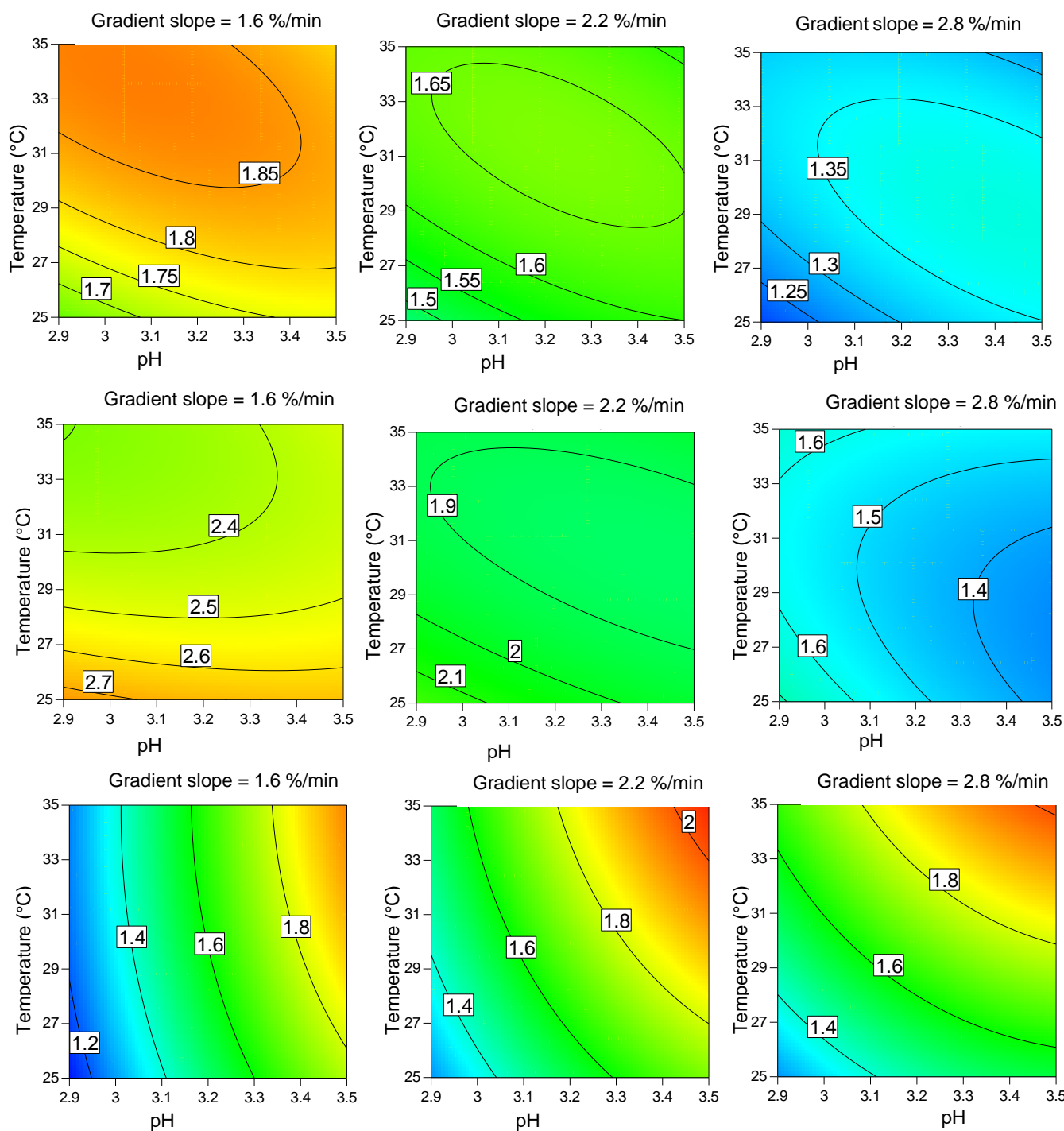


Figure S1. Contour plots of the most critical resolutions obtained by plotting temperature vs. pH at three different values of gradient slope (1.6, 2.2 and 2.8 %/min). A. Rs (impurity A; first peak of impurity B). B. Rs (AS; impurity A). C. Rs (second peak of impurity B; impurity 4).

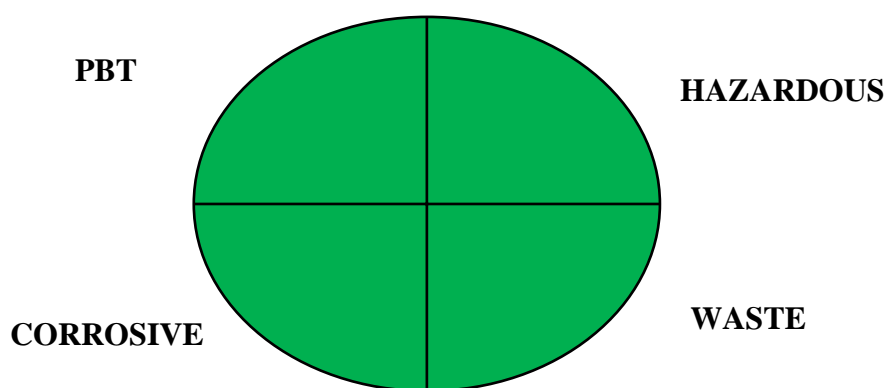


Figure S2. NEMI greenness profile of the developed method. Water and ethanol used in the method are neither defined as PBT nor hazardous by the Environmental Protection Agency's (EPA's) Toxic Release Inventory. The pH of the mobile phase is 3.35, i.e. not corrosive, and the waste generation is <50 g/sample.

Table S2. Eco-scale evaluation of the developed method

Chemical compound score			Sub-total PP	Total PP
Ethanol	Amount	<10 mL	1	1
	Hazard	Less severe hazard	1	
Water	Amount	<10 mL	1	0
	Hazard	none	0	
Acetic acid	Amount	<10 mL	1	1
	Hazard	1 pictogram-warming	1	
			$\Sigma = 2$	
Instrument score			Total PP	
Energy	≤ 0.1 kWh per sample		0	
Occupational hazard	Analytical process hermetization		0	
Waste	1-10 mL		3	
			$\Sigma = 3$	
Total penalty points (PP): 5				
Analytical Eco-scale score: $100-5 = 95$				

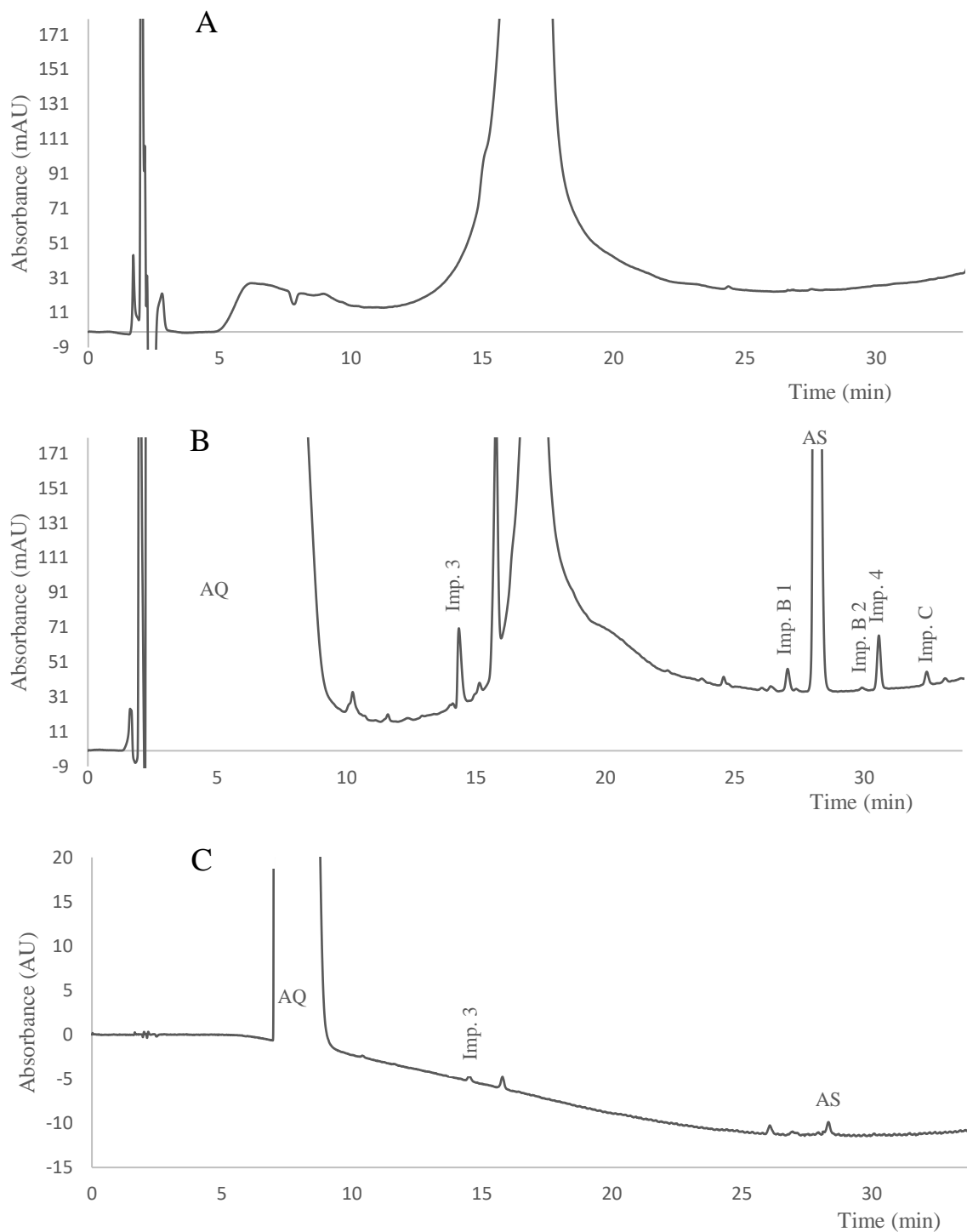


Figure S3. Chromatograms of excipient mixture and AS/AQ tablet analysis. A. Excipient mixture analysis at 210 nm. B. Tablet sample with AS at 20 mg/mL (detection at 210 nm). C. Tablet sample with AQ at 1 mg/mL (detection at 254 nm). Experimental conditions at the working point: pH 3.35, temperature 30°C, gradient slope 1.9 %/min (from 4.8% to 76.8 % of EtOH).

Table S3. Percentage of found impurities in AQ raw materials

	Unknown impurity at 10.5 min	Impurity 3	Unknown impurity at 15.3 min	Unknown impurity at 15.8 min
Batch 1	0.01	0.02	0.05	0.02
Batch 2	n.a.	0.02	0.07	0.04

Table S4. Percentage of found impurities in AS raw materials

	Impurity B	Impurity C
Batch 1	0.30	0.01
Batch 2	0.34	0.01

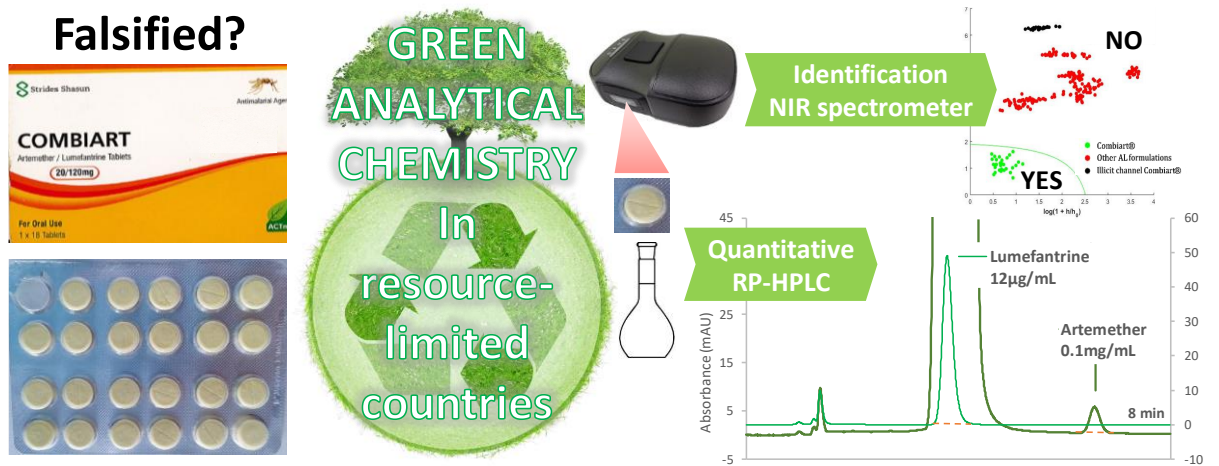
Conclusion du chapitre 3

L'utilisation de l'approche QbD a permis d'obtenir une méthode de CLHP verte et robuste permettant une analyse quantitative des impuretés de l'artésunate et de l'amodiaquine. En effet, le QbD a permis une meilleure connaissance des paramètres critiques de la méthode (pH, température et pente du gradient) et la définition d'une plage de valeur de chaque paramètre où les molécules sont bien séparées avec une probabilité élevée (95%). Ainsi la température peut varier entre 29,5 et 34 °C, la pente du gradient entre 1,6 et 2,08 mL/min et le pH entre 3,25 et 3,50. Ce dernier point est important puisque le pH est fixé uniquement en acidifiant la phase mobile avec de l'acide acétique, ce qui ne constitue pas un système tampon.

Cette robustesse a été aussi montrée par le test de lots différents de colonne. Le changement de lot de la colonne peut affecter la séparation jusqu'à une variation de la résolution de 50%, cependant la séparation complète de tous les constituants a été toujours observée et surtout les aires de pics n'ont pas été affectées.

Bien que la méthode développée ait été validée pour l'analyse des impuretés dans les matières premières de substances actives, nous avons montré qu'elle pouvait être aussi employée pour quantifier les impuretés dans les produits finis comme les comprimés. Enfin, la méthode, qui a été développée sur une chaîne de CLUHP, a pu être transférée avec succès sur une chaîne de CLHP classique sans que la séparation ne soit affectée.

Chapitre 4 : Approches analytiques vertes pour le contrôle qualité de comprimés antipaludiques à base d'artémether et de luméfantine



Contexte du chapitre 4

Dans ce chapitre, une stratégie de développement analytique en chimie verte pour le contrôle qualité de médicaments falsifiés est présentée. L'analyse a porté, cette fois, sur l'association artémether / luméfantine qui est l'un des médicaments antipaludiques les plus falsifiés. L'étude a porté sur deux approches analytiques complémentaires qui sont la spectroscopie proche infrarouge qui est adaptée au criblage et à l'identification des médicaments falsifiés et la CLHP qui est plus adéquate pour la quantification des substances actives.

L'analyse proche infrarouge a consisté à évaluer la capacité d'un spectromètre récent proche infrarouge et à bas prix (moins 1000 €), donc utilisable dans les laboratoires à ressources limitées. L'étude a eu pour objectif de tester la capacité du spectromètre à détecter des médicaments falsifiés et à identifier spécifiquement une marque de médicament. L'analyse a porté sur des comprimés de différentes marques, collectés au Burkina et au Togo. D'abord une analyse en composantes principales a été effectuée sur les données spectrales recueillies afin d'identifier les tendances, les similarités et les différences entre les différents échantillons. Ensuite, la capacité du spectromètre à identifier spécifiquement une marque donnée a été évaluée en utilisant le modèle chimiométrique de classification SIMCA. Les performances de la modélisation ont été évaluées aussi bien au niveau de la spécificité qu'au niveau de la sensibilité.

Pour confirmer les résultats obtenus avec l'analyse proche infrarouge, une méthode de CLHP verte a été développée et validée pour la quantification de l'artémether et de la luméfantine dans les comprimés en utilisant une phase mobile à base d'éthanol avec l'acide acétique comme modificateur de pH.

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans le journal « *Molecules* ».

Article 4

Green Analytical Methods of Antimalarial Artemether-Lumefantrine Analysis for Falsification Detection Using a Low-Cost Handled NIR Spectrometer with DD-SIMCA and Drug Quantification by HPLC

Molecules. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25153397>

Moussa Yabré ^{1,2}, Ludivine Ferey ¹, Abdoul Karim Sakira ², Camille Bonmatin ¹, Clotilde Fauré ¹, Touridomon Issa Somé ² and Karen Gaudin ^{1,*}

¹ ChemBioPharm Team, ARNA Laboratory, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, 146, Rue Léo Saignat, Bordeaux University, 33076 Bordeaux, France

² Laboratoire de Toxicologie, Environnement et Santé (LATES), Université Joseph Ki-Zerbo, Ouaga 03 BP 7021, Burkina Faso

Received 26 June 2020, Accepted 24 July 2020

Key words: antimalarial artemether-lumefantrine, green chromatography, accuracy profile, handheld NIR spectrometer, non-destructive analysis, drug falsification detection, PCA and DDSIMCA, quality control.

1. Introduction

The quality control (QC) of pharmaceutical products is a key issue in the medicine supply chain, as it guarantees drug reliability before consumption. It allows fighting against substandard and falsified drugs which present a serious threat of public health worldwide, but particularly in developing countries where monitoring systems are less effective. According to the World Health Organization (WHO), falsified medicines are defined as products that deliberately or fraudulently misrepresent their identity, composition or source and are not to be confused with counterfeit medicines, the latter term being associated with the protection of intellectual property rights [1].

QC is conventionally performed according to pharmacopeias in which methods are most often long and use harmful reagents for the technical staff, health, and environment. Greening analytical methods have received increasing attention and acceptance among researchers with the aim of minimizing the environmental impacts and improving analysts' health safety [2–4]. The green analytical chemistry (GAC) involves efforts to avoid the use of toxic or hazardous chemicals and their replacement by more ecofriendly ones, together with an important reduction in the consumption of energy, reagents, and solvents, proper management of analytical waste, and miniaturization of analytical devices [5]. From a green point of view, analytical techniques can be divided into two groups. The first group includes direct analytical techniques which are inherently green [6]. This is the case of vibrational spectroscopic techniques such as near-infrared (NIR) spectroscopy which are non-destructive and require neither reagents nor a sample preparation step. This technique associated to chemometric tools are nowadays more and more employed for both qualitative (product identification and particularly detection of falsified drugs) and quantitative (determination of drug content) analysis in a pharmaceutical quality control [7–9]. However, the high cost of instruments classically commercialized limits their use, particularly in resource limited laboratories. Fortunately, some innovative handheld and low-cost NIR spectrophotometers (less than 1000 EUR) have recently appeared on the market. In addition to their low cost, these portable devices can offer a promising performance comparable to bench-top instruments [10,11]. The second group of analytical techniques concerns methods that require reagents and sample preparation, and for which different modifications must be applied to be conformed as much as possible to GAC concepts [12]. One example is HPLC which is the most used analytical tool in a pharmaceutical analysis in QC and commonly use high amounts of hazardous organic solvents such as acetonitrile [13,14]. Greening HPLC methods can be solved by substituting the

commonly used organic solvents by greener ones [15–17]. Ethanol is one of the best green alternative solvents because of its low toxicity, biosourcing, biodegradability, and safety of handling by operators [18].

The artemether and lumefantrine (AL) association is one of the WHO-recommended artemisinin-based combination therapies to treat uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. AL formulations are part of the WHO Model lists of Essential Medicine [19]. However, it is also one of the most falsified class of antimalarial drugs in developing countries [20]. In the International Pharmacopeia [21], AL quantitative determination is carried out by RP-HPLC. However, this analytical technique has green issues since it is long (55 min) and employs acetonitrile as an organic solvent and an ion pairing agent (hexanesulfonate) to improve the lumefantrine peak shape. Moreover, ion-pair reagents most often drastically increase the equilibration time of the chromatographic column, leading to a high consumption of mobile phases and long analysis times. In the literature, there are some publications about the simultaneous HPLC analysis of AL in formulations [22–27]. However, they have not been developed according to the green analytical chemistry principles. Since AL formulations represent one of the most falsified antimalarial drugs, it is also of interest to have a fast-qualitative screening tool based on NIR spectroscopy associated with the principal component analysis (PCA) and data driven soft independent modeling of class analogy (DD-SIMCA) allowing to check the presence of the active pharmaceutical ingredient (API) and to authenticate a brand name, before performing further quantitative analysis.

In this report, for the first time two green analytical approaches have been combined: (a) For proper falsification detection in solid dosage forms of antimalarial artemether-lumefantrine in a fixed-dose combination. This is achieved by using a non-destructive analysis based on a low-cost handheld NIR spectrometer in association with PCA and DD-SIMCA as a screening tool to identify specifically a medicinal brand name and to detect quickly suspicious falsified medicines; (b) for quantitative analysis based on a green and fast RP-HPLC technique using ethanol as a green organic solvent and acetic acid as a green pH modifier.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Artemether and lumefantrine United States Pharmacopeia (USP) reference standards (>99%) were supplied from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Ethanol (EtOH) 96% HPLC

grade and acetic acid HPLC grade ($\geq 99.9\%$) were purchased from VWR chemicals (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). HPLC grade water (minimum resistivity of 18.2 M Ω) was produced in house by ELGA Millipore system (France). Tablet excipients (microcrystalline cellulose, lactose, maize starch, hypromellose, croscarmellose sodium, crospovidone, povidone, talc, magnesium stearate, colloidal silica, polysorbate 80, sodium lauryl sulfate) were kindly provided by LTPIB (Laboratoire de Technologie Pharmaceutique Industrielle de Bordeaux, France). Artemether-Lumefantrine (AL) 20-120 mg tablets were collected in local pharmacies in Burkina Faso and Togo. Also, some suspected designated Combiart samples were bought with illicit street vendors (*Table 1*).

Table 1. Artemether-Lumefantrine (AL) tablets

Brand name	AL dosage (mg)	Sales channel	Test batches
AL Ipca	20 -120	Pharmacy	2
AL Macleods	20-120	Pharmacy	5
Artefan®	20-120	Pharmacy	2
Artefan® Dispersible	20-120	Pharmacy	4
Combiart®	20-120	Pharmacy	6
Combiart®	20-120	Street vendors	3
Komefan®	20-120	Pharmacy	5

2.2. Near-infrared analysis

2.2.1. Instrumentation

NIR-S-G1 is a low-cost handheld dispersive spectrophotometer (less than 1000 EUR) from Innospectra (Hsinchu, Taiwan). It is a very compact instrument (136 g of weight, 82 × 63 × 40 mm of dimensions) which can operate autonomously using batteries. It is provided with wired USB and Bluetooth wireless connections to be driven by computers, tablets, or cell phones. NIR-S-G1 allows monitoring the 900–1700 nm near-infrared spectral region with a nominal resolution of 10 nm. With two integrated tungsten halogen lamps, it analyzes the diffuse reflection of a sample surface through a scratch-resistant sapphire window. Light in the 900–1700 nm range is dispersed via the digital light processing technology (Texas Instruments Inc., Dallas, TX, USA) which utilizes a digital micromirror device to project light within selected spectral bands onto a single element InGaAs detector.

2.2.2. Data acquisition

Tablet samples, before the HPLC analysis, were directly scanned through their blister. Spectra of ten tablets per batch were recorded for each formulation. Each spectrum was an average of six scans.

2.2.3. Chemometric tools

2.2.3.1. Preprocessing

Spectral data were preprocessed using a Savitzky-Golay smoothing and differentiation filter (second-degree polynomial and second derivative) followed by a multiplicative scatter correction (MSC). Chemometric analysis was performed on the spectral range between 1085 nm and 1601 nm.

2.2.3.2. Principal component analysis (PCA)

A PCA was performed on the collected AL spectra to have an overview of the distribution of the sample set.

2.2.3.3. Data driven soft independent modeling of class analogy (DD-SIMCA)

Class modeling methods such as SIMCA (soft independent modeling of class analogy) was used to evaluate the ability of the low-cost device to identify specifically the AL brand name. In this study, a data driven SIMCA (DD-SIMCA) has been employed. Similar to any SIMCA model, DD-SIMCA starts with the decomposition of the calibration spectra of the target class by PCA [10,28]. Then, the results of PCA decomposition is used to calculate a score distance (h_i) and an orthogonal distance (v_i) for each training sample. These distances are used to define the acceptance area or thresholds for the target class at a given significance level α . The DD-SIMCA results are most often shown using a two-dimensional plot through the coordinates $\ln(1 + h_i/h_0)$ vs. $\ln(1 + v_i/v_0)$, together with the limit/threshold curve which allows determining whether or not the samples belong to the target class [29]. The number of principal components (PC) mainly influences the quality of the classification and determines the complexity of the model. The model parameters (number of PCs and α) were optimized in a sequential way. Similar to any classification model, the performance of the DD-SIMCA model was assessed based on sensitivity and specificity. Sensitivity is related to the percentage of samples from the target class that are properly attributed as a member of the target class while specificity is the percentage of samples from non-members of the target class, which are properly attributed as non-members of the target class [29].

Three DD-SIMCA models were built for the formulations for which at least five batches have been collected: Licit channel Combiart[®], Komefan[®], and AL Macleods. Spectra of three batches were used as a training set to build the models and the two remaining batches were used as a test set to evaluate the model sensitivity. The other AL formulations were employed to mimic high quality fake drugs and test model specificity. All DD-SIMCA models were auto-scaled.

2.2.4. Software

Spectral preprocessing and PCA were carried out using the PLS_Toolbox version 8.2.1. while the DD-SIMCA analysis was done using DDSGUI, a graphical user interface freely available online [30]. All chemometric procedures were performed in a MATLAB environment (R2015a).

2.3. HPLC method

2.3.1. Instrumentation and analytical conditions

The HPLC analyses were carried out on the Dionex U3000 HPLC system (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a pumping device, an autosampler, a column oven, and a diode array detector. The quaternary solvent delivery pump was able to work up to a pressure of 600 bars. The columns evaluated were J'sphere ODS-H80 (150 × 4.6 mm, 5 μm) from YMC CO., LTD (Kyoto, Japan), Symmetry C18 (150 × 3.0 mm, 5 μm), and XTerra RP18 (50 × 3.0 mm, 3.5 μm) both from Waters (Milford, MA, USA). The column temperature was maintained at 30 °C and UV detection performed at 210 nm. UV spectra from 200 nm to 400 nm were recorded for peak identification. The injection volume was 10 μL. An isocratic mobile phase containing EtOH 96% and 10 mM of acetic acid aqueous solution, pH 3.35 (60:40, v/v) was used at a flow rate of 0.5 mL/min. The quality of separation between artemether and lumefantrine was evaluated in different proportions of solvents and for each condition, retention factors (k), resolutions (Rs), and symmetry factors were calculated. The best conditions were achieved using the Symmetry C18 column and a mobile phase composed of EtOH 96% and 10 mM of acetic acid aqueous solution, pH 3.35 (63:37, v/v).

2.3.2. Standard sample preparations

Stock solutions of artemether and lumefantrine were prepared at 1.0 and 1.2 mg/mL, respectively in EtOH 96% containing 0.5% of acetic acid which was added to improve the lumefantrine solubility. A mixture of artemether and lumefantrine at 0.1 and 0.6 mg/mL,

respectively was prepared by diluting the appropriate volumes of stock solutions with the mobile phase. A solution of lumefantrine at 0.012 mg/mL was prepared by diluting the lumefantrine stock solution with the mobile phase.

2.3.3. Validation

2.3.3.1. Specificity study

Considering excipients present in AL tablets, each excipient was prepared individually and in mixture using EtOH 96% containing 0.5 % of acetic acid, centrifuged and the supernatant was injected to evaluate possible interfering peaks.

2.3.3.2. Linearity, precision, and accuracy

Validation was performed according to the total error approach based on the accuracy profile. Each day, stock solutions of lumefantrine and artemether were prepared at 1.2 and 1.0 mg/mL in 96% ethanol acidified with 0.5% of acetic acid.

For the calibration set, one concentration level (100%) was used and consisted of 0.1 mg/mL for artemether and 0.012 mg/mL for lumefantrine. Calibration standards were prepared in duplicate by diluting appropriate volumes of stock solutions of each compound with the mobile phase.

For the validation set, three concentration levels (80–120%) were used for each compound: 0.08, 0.10, and 0.12 mg/mL for artemether, 0.0096, 0.0120, and 0.0144 mg/mL for lumefantrine. Based on excipients present in AL tablets and the amount commonly used, an excipient mixture composed of microcrystalline cellulose (36%), lactose (24%), maize starch (12%), hypromellose (4%), croscarmellose sodium (6%), crospovidone (6%), povidone (4%), talc (1%), magnesium stearate (2%), colloidal silica (1%), polysorbate 80 (2%), and sodium lauryl sulfate (2%) was prepared at a concentration of 5 mg/mL in ethanol acidified with 0.5% of acetic acid and was used as the matrix. Artemether validation sets were prepared by mixing appropriate volumes of artemether, lumefantrine stock solutions, and the excipient mixture and diluting with the mobile phase to reach the desired concentration of artemether, a concentration of 0.6 mg/mL for lumefantrine and a concentration of 0.5 mg/mL for the excipient mixture (excipients represent about 42% of the reconstituted form). Samples were centrifuged and the supernatant was injected. Validation standards were prepared in triplicate by repeating the dilution step. Lumefantrine validation sets were prepared by mixing appropriate volumes of lumefantrine, artemether stock solutions, and the excipient mixture and diluting with the mobile phase to reach the desired concentration of lumefantrine, a concentration of 0.002 mg/mL for

artemether and a concentration of 0.01 the excipient mixture. Samples were centrifuged and the supernatant was injected. Validation standards were prepared in triplicate by repeating the dilution step.

All of this validation procedure was repeated at three different days.

2.3.4. Tablet sample preparation

For each batch, five tablets were weighed and powdered. An appropriate amount of the powder was used to obtain a preparation containing lumefantrine at a concentration of about 1.2 mg (artemether at a concentration of about 0.2 mg/mL). Ethanol acidified with acetic acid (0.5%) was used as a dilution solvent. The obtained preparation was then centrifugated and the supernatant was used to perform two dilutions. The first dilution (1:2) with the mobile phase allowed reaching a concentration of 0.1 mg of artemether (0.6 mg of lumefantrine) and was used to determine the content of artemether in the tablets. The second dilution (1:100) allowed reaching a concentration of 0.012 mg/mL of lumefantrine and was used to determine the content of lumefantrine in the tablets.

3. Results and discussion

3.1. Near-infrared analysis

The aim was to evaluate the potential of a low-cost (less than 1000 EUR) handheld NIR spectrophotometer (NIR-S-G1, from Innospectra) as a screening tool for falsified drug identification. For this task, DD-SIMCA was used as a classification model which performed a PCA. This one-class classifier is a useful chemometric tool for the verification of product identity and for the detection of falsified drugs [31,32].

3.1.1. Data acquisition and preprocessing

The analysis was performed on artemether-lumefantrine tablets from different brands collected in local pharmacies (*Table 1*). Moreover, some suspicious designated Combiart samples from the illicit sales channel has been analyzed. The spectrophotometer allows acquiring spectra in the 900–1700 nm region. Tablet samples were directly scanned through their blister and spectra of ten tablets per batch have been recorded for each formulation. Therefore, a total of 270 spectra was acquired. Spectral data have been preprocessed to improve the signal-to-noise ratio. First, a Savitzky-Golay smoothing and differentiation filter (second-

degree polynomial and second derivative) was applied to remove noise and baseline signals. Second, a multiplicative scatter correction (MSC) was applied to the smoothed and differentiated signals. The chemometric analysis was carried out on the spectral range between 1085 and 1601 nm because under 1085 nm the area was found non-informative while upper 1601 it was found less reproducible and noisier. Preprocessed mean spectra are presented in *Figure 1*.

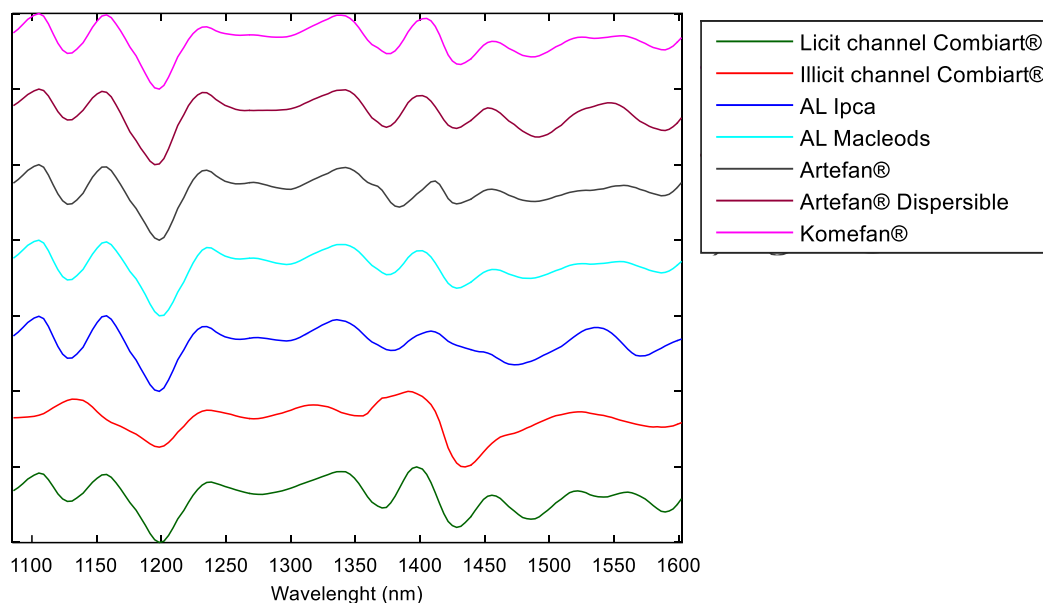


Figure 1. Artemether-lumefantrine (AL) preprocessed spectra in the 1085–1601 nm range.

3.1.2. PCA

A PCA was performed on the acquired and preprocessed spectra to have a visualization of the repartition of the dataset. In fact, PCA is a useful unsupervised model to enhance differences and similarities between the spectra, allowing the detection of underlying clusters [8,9]. The PC1-PC2 and PC1-PC3 score plots are presented in *Figure 2*. The three first PCs described more than 80% of variability. Along the PC1 score, samples of the suspicious designated Combiart®, from the illicit sales channel, were far from samples of the licit channel Combiart® and other products, being outside the 95% confidence level. These samples of the illicit channel seemed to be falsified. The PC1-PC2 score plot allowed the distinction of four AL products (Combiart®, Komefan®, Artefan®, and AL Macleods) between each other and from the two products Artefan® dispersible and AL Ipca which were not separated from each other. However, on the PC1-PC3 score plot these two products could be distinguished. Even if formulations from pharmacies can contain the correct active pharmaceutical ingredients, they could be differentiated by PCA. This can be explained by the fact that the analyzed medicines

may not have the same nature and composition of excipients and that NIR spectra are sensitive not only to chemical properties but also to physical properties.

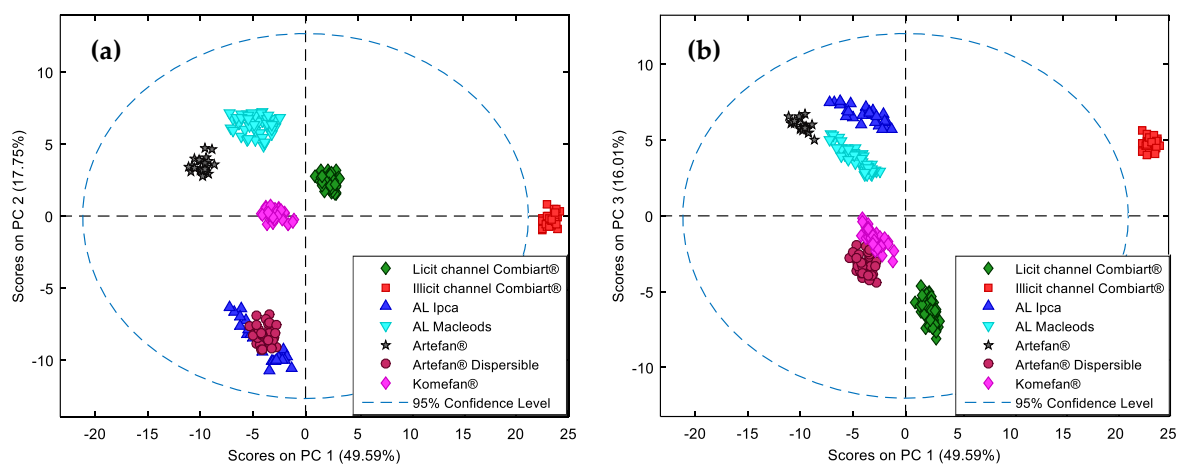


Figure 2. Results of the principal component analysis (PCA) applied on the preprocessed data. (a) PC1-PC2 score plot. (b) PC1-PC3 score plot.

3.1.3. DD-SIMCA analysis

Based on the results obtained with the PCA, a class modeling tool such as SIMCA in its data driven (DD) version was used to confirm the ability of the handheld device to identify specifically a brand name. The DD-SIMCA model is described in Section 2.2.3. Models were built for the formulations for which at least five batches have been collected (licit Combiart[®], Komefan[®], and AL Macleods). Therefore, three target classes were modeled.

For each class, the spectra of three batches were used as a training set to build the SIMCA models and the remaining batches were used as a test set to evaluate the model sensitivity. The other AL formulations were employed to mimic high quality fake drugs and test model specificity. Falsified AL Combiart[®] bought in the illicit sale channel was also used to prove model specificity. For each class, model parameters (number of PCs and significance level α) were optimized in a sequential way. Results of DD-SIMCA models built for the three brand products are shown in *Figure 3*. The DD-SIMCA models allowed an identification specific brand identification with 100% of both sensitivity and specificity in the studied cases. These results showed that despite the limited spectral range and low resolution (10 nm) of this low-cost spectrophotometer, it offers a promising qualitative performance for detection of falsified drugs.

For a better interpretation of NIR results, a green and fast HPLC technique has been developed and used to analyze AL tablets.

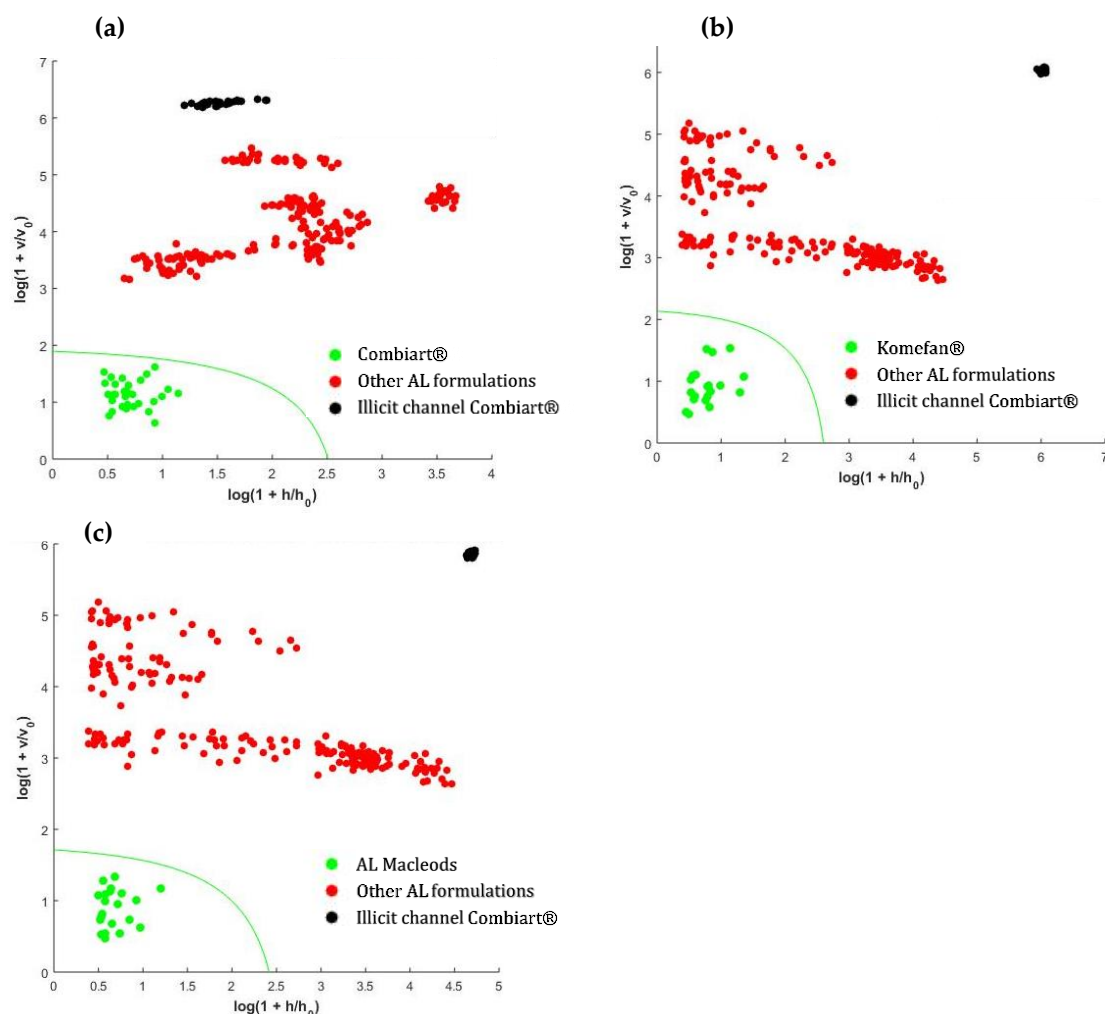


Figure 3. Data driven soft independent modeling of class analogy (DD-SIMCA) plots. (a) Combiart (two PCs, $\alpha = 10^{-6}$). (b) Komefan (two PCs, $\alpha = 10^{-5}$). (c) AL Macleods (two PCs, $\alpha = 10^{-4}$).

3.2. HPLC analysis

3.2.1. Method development

With the objective to develop a green HPLC technique, ethanol, which is one of the best green solvents, was selected as an organic solvent. Considering the high viscosity of ethanol mobile phases, the flow rate was set at 0.5 mL/min to avoid a high column backpressure. Artemether is a neutral compound with weak chromophores while lumefantrine has basic properties and greatly absorbs in UV (*Figure 4*). Due to the poor absorption of artemether, detection was done at 210 nm. A pH selection of the mobile phase is required only for lumefantrine since artemether is neutral. To limit the lumefantrine interaction with residual silanols a pH value higher than its pKa would be necessary. However, this will limit the stable stationary phases at pH 11. Therefore, the pH of the aqueous part of the mobile phase was fixed

using 10 mM of acetic acid (pH 3.35) which is a benign and low toxic pH modifier to respect the green analytical principles. At this pH, lumefantrine is in its ionic form with a positive charge, which could interact with the free silanols of the stationary phase, leading to peak tailing. Therefore, column testing was carried out regarding selectivity and peak shape of the positively charged basic compound. An initial mobile phase containing EtOH 96% and 10 mM of acetic acid aqueous solution, pH 3.35 (60:40, v/v) was used. Considering that the amount of lumefantrine was six times higher than the artemether amount in tablets, a mixture of both molecules at 0.1 mg/mL for artemether and 0.6 mg/mL for lumefantrine were initially used. However, it was found that the lumefantrine peak was asymmetrical at this concentration (As > 2.5), whatever the column. The acceptable peak shape for lumefantrine was reached at a concentration under 0.020 mg/mL corresponding to a concentration of 0.0033 mg/mL of artemether in respect to the formulation ratio. Unfortunately, artemether could not be detected at such low concentration due to its lack of chromophore even at 210 nm. Consequently, two solutions were therefore prepared for the method optimization. The first one was a mixture of artemether and lumefantrine at 0.1 and 0.6 mg/mL, respectively, to be able to detect artemether with a signal-to-noise ratio above 70 and to be able to assess the retention and separation quality between these two compounds. The second one was composed of lumefantrine at 0.012 mg/mL to be able to observe a satisfactory peak shape for its quantification.

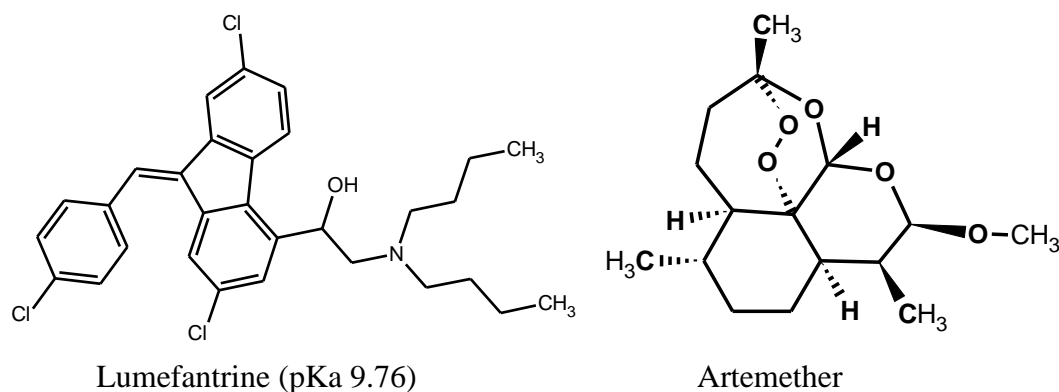


Figure 4. Chemical structures of lumefantrine and artemether.

The chromatographic parameters mainly retention factors and symmetry factors were evaluated on the three columns using a mobile phase composed of ethanol 96% and 10 mM of acetic acid (60:40, v/v). The results are presented in *Table 2*. In these conditions, artemether and lumefantrine were satisfactorily retained on the three columns with retention factors higher than 2, as required for drug quality control. The J'sphere ODS-H80 column was the most

retentive, while the XTerra one presented a poor symmetry factor for lumefantrine. The Symmetry C18 column appeared the best choice in terms of retention and peak shape compared to the two other columns. It was therefore selected for method development. Using this column, different proportions of mobile phase solvents were evaluated to reduce the analysis time while maintaining a sufficient retention and resolution between artemether and lumefantrine peaks. A mobile phase composed of ethanol 96% and 10 mM of acetic acid pH 3.35 (63:37, v/v) allowed a minimal retention factor of two, a resolution of six, and a run time under 7 min (*Figure 5*). These conditions were therefore adopted as the final mobile phase composition.

Table 2. Chromatographic parameters of artemether and lumefantrine according to the columns.

Columns	Artemether		Lumefantrine	
	Retention Factor (k)	Symmetry Factor (As)	Retention Factor (k)	Symmetry Factor (As)
Symmetry C18	4.60	1.10	2.78	1.22
J'sphere ODS-H80	6.47	1.16	3.40	1.28
Xterra RP18	2.50	1.31	4.48	1.75

The greenness of the developed method was assessed using two different tools: The National Environmental Methods Index (NEMI) [6] and the Analytical Eco-Scale [33]. NEMI labeling results in an easy-to-read pictogram including four terms: PBT (persistent, bio accumulative, and toxic), Hazardous, Corrosive, and Waste. Each term is colored green or blank depending on whether this particular criterion is fitting or not. The analytical Eco-scale is a more quantitative approach, based on subtracting penalty points from a total of 100, considering the amount and hazard of reagents, energy consumption, occupational hazards, and amount of waste generated. A NEMI pictogram with the four terms colored in green (*Figure 6*) and an Eco-scale score of 93 (*Table 3*), allowed confirming the green character of the developed method.

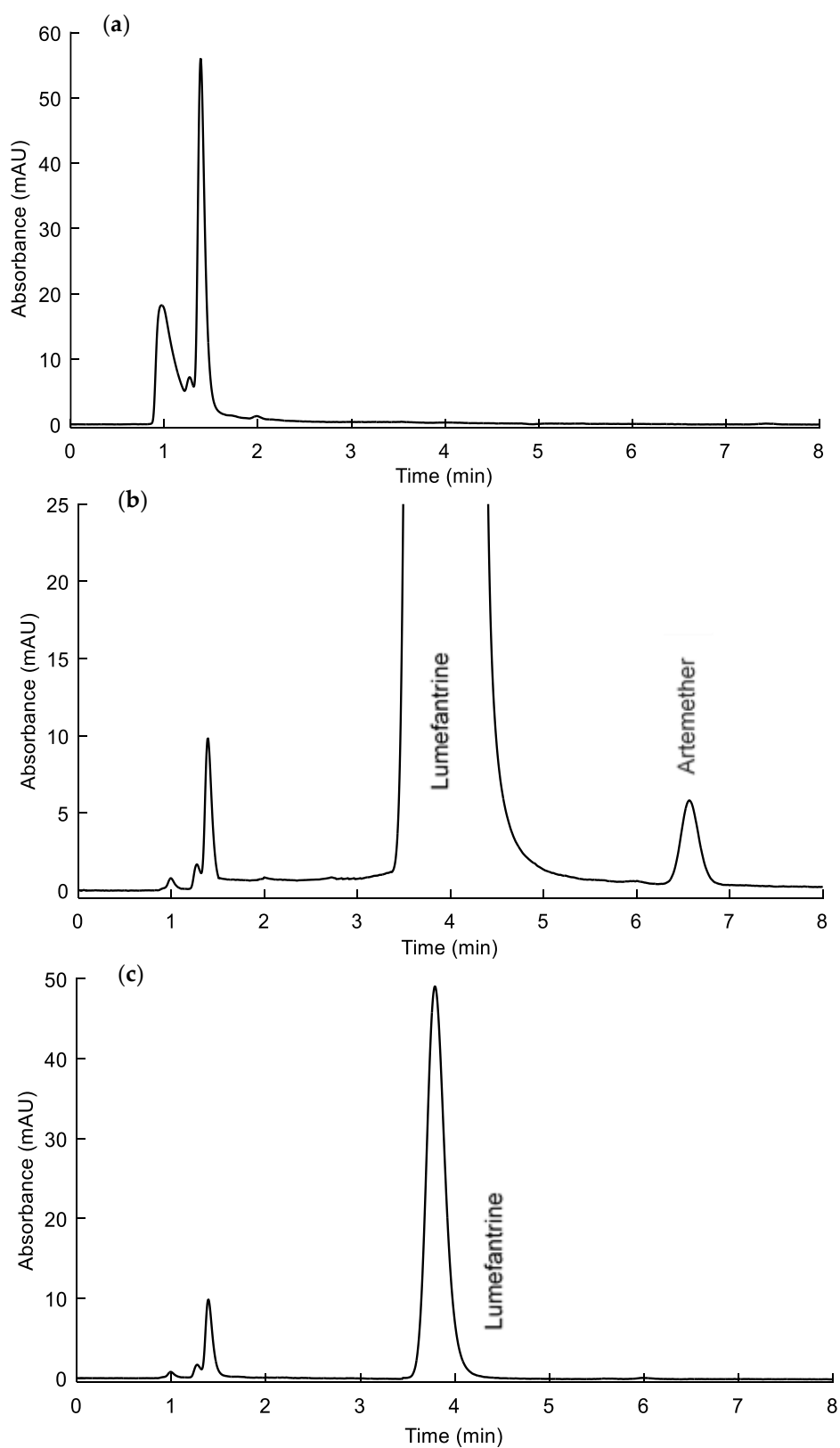


Figure 5. Chromatograms. (a) Excipient mixture, (b) artemether and lumefantrine at 0.1 and 0.6 mg/mL, respectively. (c) Lumefantrine at 0.012 mg/mL. Column: Symmetry C18, mobile phase: Ethanol 96%, and 10 mM of acetic acid pH 3.35 (63:37, v/v), 0.5 mL/min, 210 nm.

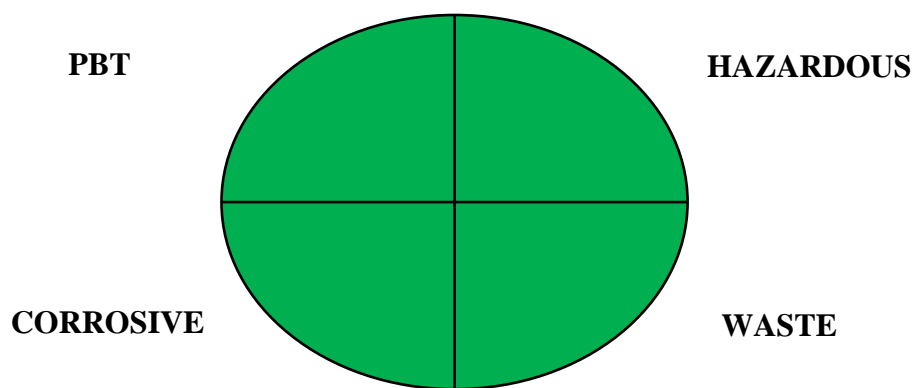


Figure 6. National Environmental Methods Index (NEMI) greenness profile of the developed method. Water and ethanol used in the method are neither defined as persistent, bio accumulative, and toxic (PBT) nor hazardous by the Environmental Protection Agency's (EPA's) Toxic Release Inventory. The pH of the mobile phase is 3.35, i.e., not corrosive, and the waste generation is < 50 g/sample.

Table 3. Eco-scale evaluation of the developed method.

Chemical Compound Score			Sub-Total PP	Total PP
Ethanol	Amount	< 10–100mL	2	2
	Hazard	Less severe hazard	1	
Water	Amount	< 10–100 mL	2	0
	Hazard	none	0	
Acetic acid	Amount	< 10 mL	1	1
	Hazard	1 pictogram-warming	1	
				$\Sigma = 3$
Instrument score				Total PP
Energy		≤ 1.5 kWh per sample		1
Occupational hazard		Analytical process hermetization		0
Waste		1–10 mL		3
				$\Sigma = 4$
Total penalty points (PP): 7				
Analytical Eco-scale score: $100 - 7 = 93$				

3.2.2. Method Validation

The developed analytical method based on the RP-HPLC technique with a classical univariate calibration was validated to assess its ability to achieve the quantitative determination of artemether and lumefantrine in tablets according to ICH Q2(R1) [34]. Specificity, accuracy, repeatability, intermediate precision, and linearity must be established in the case of validation of the quantitative determination method. Method specificity was assessed through the injection of commonly used tablet excipients. Validation of the developed method was carried out during three days with three replicates for each concentration level. The accuracy, repeatability,

intermediate precision, and linearity were assessed by the accuracy profile approach using the concept of total error (bias + standard deviation) based on the β -expectation tolerance intervals [35,36]. The β -expectation tolerance interval defines an interval in which it is expected that each future result will fall with a defined probability β [37]. By joining the upper tolerance limits on the one hand and the lower tolerance limits on the other hand, the method defines an accuracy profile. If this profile stays within the acceptance limits set according to the needs of the final user or to regulatory expectations, the method can be considered as valid. The accuracy profile methodology is fully compliant to the ICH Q2 requirements [34].

The individual injection of all excipients and in the mixture showed no interference with the peaks of artemether and lumefantrine (*Figure 5a*). Therefore, the method specificity was demonstrated.

The regression model between the chromatographic pic area and the concentration of artemether or lumefantrine was studied using the 100% level of the calibration set. This allowed to back calculate concentrations of the validation set (80–120%) composed of reconstituted form samples and assess the linearity, the relative bias, the repeatability, the intermediate precision, and the β -expectation tolerance intervals at a 90% probability level. Acceptance limits were fixed at $\pm 10\%$ according to the International Pharmacopeia. The validation results are shown in *Table 4*. The linearity criterion was assessed by fitting linear regression models between the back calculated concentrations and the introduced concentrations over the dosing range. Slopes close to 1 of the regression models and R^2 values higher than 0.99 demonstrated the good linearity of the developed method. The relative standard deviation (RSD%) values for repeatability and intermediate precision were below 4%, indicating an acceptable precision of the method. The trueness of the method was also found satisfactory since the relative biases were below 6% at each concentration level, in compliance with the acceptance limits of $\pm 10\%$. The β -expectation tolerance intervals at a 90% probability level were within the acceptance limits ($\pm 10\%$) for each concentration level, indicating that the method was able to provide accurate results over the concentration range for each compound. The accuracy profiles are shown in *Figure 7*. The lower and upper limits of quantification (LLOQ and ULOQ) correspond to the dosing range for each compound: 0.08 and 0.12 mg/mL for artemether, 0.0096 and 0.0144 mg/mL for lumefantrine.

Table 4. Validation results of artemether and lumefantrine.

Validation Criteria		Artemether		Lumefantrine	
Linearity	Slope	0.9986		1.0342	
	Intercept	0.0028		0.0001	
	R ²	0.992		0.993	
Trueness	Level	Concentration (mg/mL)	Relative Bias (%)	Concentration (mg/mL)	Relative Bias (%)
	80%	0.08	5.03	0.0096	5.22
	100%	0.10	-0.08	0.0120	1.72
	120%	0.12	0.77	0.0144	0.05
Precision	Level	Repeatability (RSD%)/Intermediate Precision (RSD%)		Repeatability (RSD%)/Intermediate Precision (RSD%)	
	80%	2.30/2.40		1.75/1.87	
	100%	1.33/2.86		2.36/3.36	
	120%	1.18/3.10		0.99/0.99	
Accuracy	Level	β -Expectation Tolerance Limits (%)		β -Expectation Tolerance Limits (%)	
	80%	[0.62, 9.43]		[1.75, 8.69]	
	100%	[-6.30, 6.15]		[-4.92, 8.37]	
	120%	[-6.40, 7.93]		[-1.77, 1.87]	

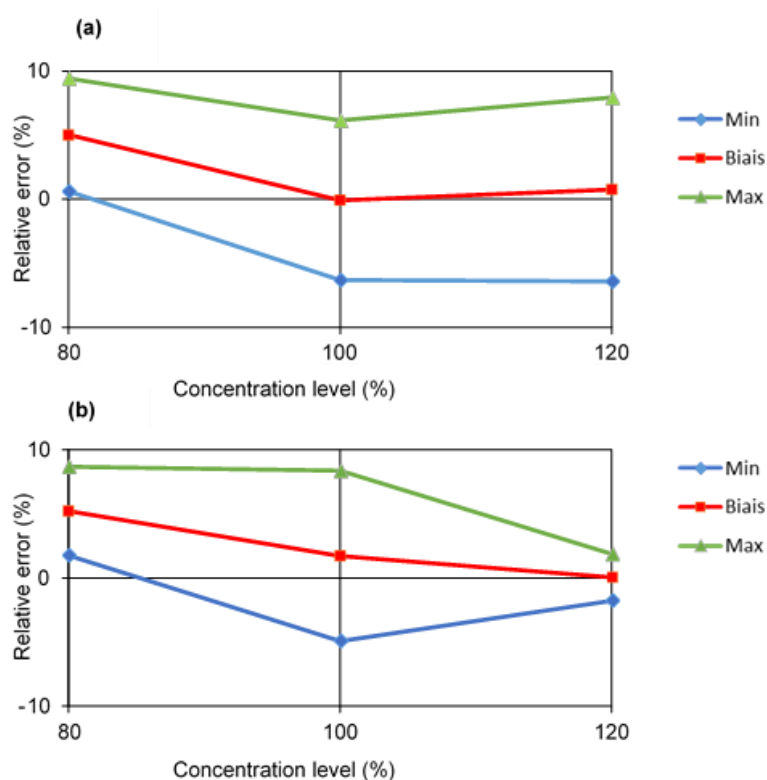


Figure 7. Accuracy profile. (a) Artemether. (b) Lumefantrine.

3.2.3. Tablet analysis

The developed and validated HPLC method was used to analyze the 27 AL samples. All samples bought in the licit channel contained both artemether and lumefantrine in the adequate amount between 94% and 106% (*Table 5*). As expected from the NIR analysis, no active pharmaceutical ingredient was found in samples of Combiart[®] from the illicit sales channel, confirming that they were falsified.

Regarding the secondary packaging, some differences can be noted for the brand logo and the batch identification (*Figure 8*). In the primary packaging, the number and arrangement of the tablets are also different. However, for a patient, these differences are not obvious and difficult to identify if they do not know the genuine product. In addition, the color of Combiart[®] tablets is due to the presence of lumefantrine which is a yellow powder. No excipient in this formulation is yellow. Therefore, the falsified product found was really intended to be fake.

Table 5. Results of the HPLC analysis of AL tablets.

Brand Name	Tested Batches	Artemether Content (%)	Lumefantrine Content (%)
		Range	Range
AL Ipca	2	94.5–99.5	96.7–98.7
AL Macleods	5	94.6–104.4	97.5–106.0
Artefan [®]	2	98.9–99.6	99.6–101.4
Artefan [®] Dispersible	4	97.0–101.2	98.4–101.6
Komefan [®]	5	95.6–98.8	97.8–100.9
Licit channel Combiart [®]	6	95.8–106.0	98.4–102.3
Illicit channel Combiart [®]	3	Not detected	Not detected



Figure 8. Representative photos of falsified (a) versus genuine (b) Combiart® samples.

4. Conclusions

The available results allow affirming that DD-SIMCA with a portable NIR spectrometer can be used as an analytical method for routine testing against pharmaceutical falsification of antimalarial artemether-lumefantrine drugs in their intact form and assisted with the quantitative analysis by the green RP-HPLC technique. These two analytical approaches are green and suitable for quality control of antimalarial artemether-lumefantrine tablets. They

are complementary and correspond to a global analytical strategy which contributes to the fight against falsified medicines. The first approach consisted of evaluating the qualitative performance of a low-cost handheld NIR spectrophotometer associated to chemometric models in the detection of falsified drugs. Despite its limited spectral range and low resolution, the device allowed detecting falsified drugs with no active pharmaceutical ingredient and identifying specifically a brand name. This innovated handheld NIR spectrophotometer offers a promising performance and could be used as a first line screening tool in the detection and fight against falsified drugs particularly in developing countries. The second approach was quantitative and consisted of developing a green and fast RP-HPLC technique using ethanol as a green organic solvent and acetic acid as a green pH modifier coupled to the classical univariate calibration. The developed method was validated and applied to the analysis of AL tablets. This method allowed confirming that falsified drugs detected with the NIR instrument, did not contain an active pharmaceutical ingredient.

References

1. WHO member state mechanism on substandard/spurious/falsely-labelled/falsified/counterfeit (ssffc) medical products. **2015**. https://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/A70_23-en1.pdf?ua=1.
2. Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 497–511, doi:10.1016/j.trac.2008.05.003.
3. Anastas, P.T.; Kirchhoff, M.M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686–694, doi:10.1021/ar010065m.
4. Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *50*, 78–84, doi:10.1016/j.trac.2013.04.010.
5. Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M. de la Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 578–591, doi:10.1016/j.trac.2009.12.012.
6. Keith, L.H.; Gron, L.U.; Young, J.L. Green Analytical Methodologies. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2695–2708, doi:10.1021/cr068359e.

7. Kovacs, S.; Hawes, S.E.; Maley, S.N.; Mosites, E.; Wong, L.; Stergachis, A. Technologies for Detecting Falsified and Substandard Drugs in Low and Middle-Income Countries. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90601, doi:10.1371/journal.pone.0090601.
8. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 683–700, doi:10.1016/j.jpba.2007.03.023.
9. Dégardin, K.; Guillemain, A.; Guerreiro, N.V.; Roggo, Y. Near infrared spectroscopy for counterfeit detection using a large database of pharmaceutical tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *128*, 89–97, doi:10.1016/j.jpba.2016.05.004.
10. Ciza, P.H.; Sacre, P.-Y.; Waffo, C.; Coïc, L.; Avohou, H.; Mbinze, J.K.; Ngono, R.; Marini, R.D.; Hubert, P.; Ziemons, E. Comparing the qualitative performances of handheld NIR and Raman spectrophotometers for the detection of falsified pharmaceutical products. *Talanta* **2019**, *202*, 469–478, doi:10.1016/j.talanta.2019.04.049.
11. Deidda, R.; Sacre, P.-Y.; Clavaud, M.; Coïc, L.; Avohou, H.; Hubert, P.; Ziemons, E. Vibrational spectroscopy in analysis of pharmaceuticals: Critical review of innovative portable and handheld NIR and Raman spectrophotometers. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *114*, 251–259, doi:10.1016/j.trac.2019.02.035.
12. Mohamed, H.M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 176–192, doi:10.1016/j.trac.2014.11.010.
13. Welch, C.J.; Wu, N.; Biba, M.; Hartman, R.; Brkovic, T.; Gong, X.; Helmy, R.; Schafer, W.; Cuff, J.; Pirzada, Z. Greening analytical chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 667–680, doi:10.1016/j.trac.2010.03.008.
14. Płotka, J.; Tobiszewski, M.; Sulej, A.M.; Kupska, M.; Górecki, T.; Namieśnik, J. Green chromatography. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1307*, 1–20, doi:10.1016/j.chroma.2013.07.099.
15. Yabré, M.; Ferey, L.; Somé, I.T.; Gaudin, K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules* **2018**, *23*, 1065, doi:10.3390/molecules23051065.
16. Bousès, C.; Ferey, L.; Vedrines, E.; Gaudin, K. Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 114–122, doi:10.1016/j.jpba.2015.07.003.

17. Ferey, L.; Raimbault, A.; Rivals, I.; Gaudin, K. UHPLC method for multiproduct pharmaceutical analysis by Quality-by-Design. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *148*, 361–368, doi:10.1016/j.jpba.2017.10.014.
18. Assassi, A.L.; Roy, C.-E.; Perovitch, P.; Auzerie, J.; Hamon, T.; Gaudin, K. Green analytical method development for statin analysis. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1380*, 104–111, doi:10.1016/j.chroma.2014.12.066.
19. WHO 21st WHO Model List of Essential Medicines 2019.
20. Newton, P.N.; Taberner, P.; Dwivedi, P.; Culzoni, M.J.; Monge, M.E.; Swamidoss, I.; Mildenhall, D.; Green, M.D.; Jähnke, R.; Oliveira, M. dos S. de; et al. Falsified medicines in Africa: all talk, no action. *Lancet Glob. Health* **2014**, *2*, e509–e510, doi:10.1016/S2214-109X(14)70279-7.
21. *The International Pharmacopoeia*; 9th ed.; WHO Department of Essential Medicines and Health Product, 2019;
22. Kalyankar, T.M.; Kakde, R.B. Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Artemether and Lumefantrine in Pharmaceutical Preparation Available online: <https://www.semanticscholar.org/paper/Reversed-Phase-Liquid-Chromatographic-Method-for-of-Kalyankar-Kakde/8490f08914507d441218793a72b704888fef8ffe> (accessed on Apr 27, 2020).
23. César, I. da C.; Andrade Nogueira, F.H.; Antônio Pianetti, G. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 951–954, doi:10.1016/j.jpba.2008.05.022.
24. Hoellein, L.; Holzgrabe, U. Development of simplified HPLC methods for the detection of counterfeit antimalarials in resource-restraint environments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *98*, 434–445, doi:10.1016/j.jpba.2014.06.013.
25. Mbinze, J.K.; Yemoa, A.; Lebrun, P.; Sacré, P.-Y.; Habyalimana, V.; Kalenda, N.; Bigot, A.; Atindehou, E.; Hubert, P.; Marini, R.D. Fighting Poor Quality Medicines: Development, Transfer and Validation of Generic HPLC Methods for Analyzing Two WHO Recommended Antimalarial Tablets. *Am. J. Anal. Chem.* **2015**, *06*, 127–144, doi:10.4236/ajac.2015.62012.
26. Mannemala, S.S.; Nagarajan, J.S.K. Development and validation of a generic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of five commonly used antimalarial drugs: Application to pharmaceutical formulations and human plasma. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 1521–1528, doi:10.1002/jssc.201401465.

27. Habyalimana, V.; Mbinze, J.K.; Yemoa, A.L.; Ntokamunda, J.-L.K.; Hubert, P.; Djang'eing'a, R.M. Simple LC Isocratic Methods Development, Validation, and Application in the Analysis of Poor Quality Antimalarial Medicines. *Am. J. Anal. Chem.* **2017**, *08*, 582–603, doi:10.4236/ajac.2017.89042.
28. Zontov, Y.V.; Rodionova, O.Ye.; Kucheryavskiy, S.V.; Pomerantsev, A.L. DD-SIMCA – A MATLAB GUI tool for data driven SIMCA approach. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2017**, *167*, 23–28, doi:10.1016/j.chemolab.2017.05.010.
29. Mazivila, S.J.; Páscoa, R.N.M.J.; Castro, R.C.; Ribeiro, D.S.M.; Santos, J.L.M. Detection of melamine and sucrose as adulterants in milk powder using near-infrared spectroscopy with DD-SIMCA as one-class classifier and MCR-ALS as a means to provide pure profiles of milk and of both adulterants with forensic evidence: A short communication. *Talanta* **2020**, *216*, 120937, doi:10.1016/j.talanta.2020.120937.
30. *GitHub*. <https://github.com/yzontov/dd-simca>; 2019;
31. Rodionova, O.Ye.; Oliveri, P.; Pomerantsev, A.L. Rigorous and compliant approaches to one-class classification. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2016**, *159*, 89–96, doi:10.1016/j.chemolab.2016.10.002.
32. Rodionova, O.Ye.; Titova, A.V.; Pomerantsev, A.L. Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *78*, 17–22, doi:10.1016/j.trac.2016.01.010.
33. Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.M.; Konieczka, P.; Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 61–72, doi:10.1016/j.trac.2012.03.013.
34. Abraham, J. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: text and Methodology, Q2 (R1), in: International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Tietje, C., Brouder, A., Eds.; Brill | Nijhoff, 2010 ISBN 978-90-04-18156-4.
35. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 579–586, doi:10.1016/j.jpba.2004.07.027.
36. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; et al. Harmonization of strategies

for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 70–81, doi:10.1016/j.jpba.2007.06.013.

37. Krier, F.; Brion, M.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Driesen, A.; Ziemons, E.; Evrard, B.; Hubert, P. Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 694–700, doi:10.1016/j.jpba.2010.10.022.

Conclusion du chapitre 4

L'évaluation des performances qualitatives de ces nouveaux équipements proche infrarouge à bas prix associé aux méthodes chimiométriques a montré un grand potentiel pour leur utilisation en première ligne dans la détection et la lutte contre les médicaments falsifiés notamment dans les pays en voie de développement. En effet, dans cette étude, nous avons montré qu'ils permettaient de détecter l'absence ou la présence de substances actives et ainsi identifier spécifiquement une marque donnée de comprimés d'artéméther / luméfantrine.

La méthode de CLHP développée, verte, rapide, simple et validée, a permis de confirmer ces résultats en donnant un complément d'information quantitative. Des comprimés sans aucune substance active, ni artéméther, ni luméfantine, ont été trouvés dans une boîte libellée Combiart. Les comprimés étaient jaunes et très ressemblant à ceux de cette marque. Les comprimés ont cette couleur en raison de la présence de la luméfantrine, les excipients utilisés pour cette formulation sont tous blancs. Par conséquent ce médicament falsifié provient d'une volonté de tromper et de nuire, et n'est pas juste un cas de déconditionnement de comprimés ou de mauvaise conservation lors du stockage.

Ce cas précis montre la complémentarité de ces deux approches analytiques vertes dans la détection des médicaments falsifiés. Une des méthodes est plus adaptée à l'analyse sur le terrain et l'autre plus sophistiquée permet d'apporter des informations complémentaires sur la nature de la falsification.

Une perspective intéressante et complémentaire à cette étude serait d'évaluer la performance, cette fois, quantitative de ces spectromètres dans le dosage des substances actives. Cela permettrait de faire de ces outils à bas coût des instruments puissants à la fois de détection des falsifications mais aussi de quantification des principes actifs.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de contribuer à l'amélioration du contrôle qualité pharmaceutique à travers la conception de méthodes d'analyses peu polluantes et implantables dans des laboratoires à ressources limitées. Des méthodes de CLHP vertes par remplacement des solvants organiques classiques par un solvant vert ont ainsi été développées. En effet, les méthodes de CLHP en phase inverse utilisent traditionnellement des solvants comme l'acétonitrile et le méthanol reconnus dangereux pour l'homme et l'environnement en raison de leur toxicité, et du traitement difficile de leurs déchets. Dans le cadre d'une revue bibliographique sur les différents solvants verts de substitution pour la CLHP en phase inverse (Yabré et al. dans *Molecules*), l'éthanol s'est révélé être la solution la plus prometteuse aussi bien d'un point de vue écologique qu'économique. En effet, ce solvant fait partie des meilleurs solvants organiques verts en raison de la possibilité de le synthétiser à partir de matières premières renouvelables et du faible impact de son cycle de vie sur l'environnement. En outre, il est facilement disponible et de faible coût. Cependant, l'éthanol présente deux principaux inconvénients qui font qu'il est généralement peu utilisé en CLHP. Le premier est sa viscosité élevée lors de son utilisation dans des mélanges avec un co-solvant aqueux, ce qui peut entraîner des pressions élevées incompatibles avec les appareils de CLHP classiques. Le deuxième inconvénient est son absorbance élevée dans l'UV comparativement à celle de l'acétonitrile, ce qui peut entraîner des problèmes de détection des composés ayant peu de groupements chromophores. Malgré ces inconvénients, nous avons démontré à travers ce travail que l'éthanol pouvait être utilisé avec les appareils classiques de CLHP pour développer des méthodes d'analyses de composés y compris ceux absorbant peu dans l'UV et ceci dans un contexte réglementé qu'est le contrôle qualité pharmaceutique.

Afin de démontrer la pertinence et la faisabilité de cette approche, différentes méthodes de contrôle de médicaments ont été développées en utilisant le matériel conventionnel d'un laboratoire de contrôle qualité. Les analyses ont porté sur les combinaisons thérapeutiques à base des dérivés d'artémisinine, qui présentent l'intérêt d'être des cas complexes à traiter en contrôle qualité en raison du nombre et de la nature des molécules à analyser et du cycle de vie de ces formulations qui sont fréquemment falsifiées.

Le chapitre 2 rapporte une étude des paramètres pouvant influencer la sélectivité ainsi que la forme des pics. Ces paramètres se trouvent limités au pH et à la phase stationnaire lorsque l'éthanol est utilisé comme unique solvant organique en CLHP. Il est alors nécessaire de cribler différentes phases stationnaires et pH afin d'obtenir la sélectivité adaptée à la séparation et la quantification des composés. Aussi, la nature et la concentration des modificateurs de pH doivent être judicieusement choisis. En effet, ils peuvent jouer sur le bruit de fond et la dérive de la ligne de base (surtout si l'analyse est effectuée en gradient), et masquer la détection des composés absorbant peu dans l'UV. Enfin, le débit de la phase mobile doit être limité pour permettre une analyse avec des pressions inférieures aux spécifications des appareils classiques, et ne pas altérer l'efficacité de la colonne qui diminue avec l'augmentation du débit particulièrement lorsque le solvant utilisé est l'éthanol. Cette étude a fait l'objet d'une publication de Yabré et al. dans le « *Journal of separation science* ».

Dans le chapitre 3, nous avons démontré l'applicabilité de cette approche de chimie verte dans une problématique plus délicate du contrôle qualité pharmaceutique à savoir l'essai des substances apparentées. En raison du nombre de molécules à analyser et de leur similarité chimique, le développement de la méthode a été effectuée selon l'approche *Quality by Design* permettant d'obtenir des méthodes robustes et flexibles. Cette démarche a permis de déterminer les paramètres critiques ainsi que leur étendue pour le pH, la température et la pente du gradient où les composés étaient correctement séparés. Cette étude a fait l'objet d'une publication de Yabré et al. dans le « *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* ».

Dans le chapitre 4, nous avons montré la complémentarité entre deux approches analytiques vertes que sont la spectroscopie proche infrarouge et la CLHP utilisant l'éthanol, dans la détection et la lutte contre les médicaments falsifiés à base d'artéméther et de luméfantine. La première approche a consisté à utiliser un spectromètre proche infrarouge portable et à bas prix comme un outil de criblage en première ligne pour détecter qualitativement les contrefaçons. Malgré son faible coût, sa zone spectrale réduite et sa faible résolution, ce spectromètre a été capable de détecter des médicaments falsifiés et d'identifier spécifiquement différentes marques de comprimés. Les résultats de cette analyse proche infrarouge ont pu être confirmés par une méthode quantitative basée sur une technique de CLHP utilisant l'éthanol. Cette étude a fait l'objet d'une publication de Yabré et al. parue dans « *Molecules* ».

Les différents résultats obtenus démontrent que les méthodes vertes peuvent être développées avec les appareils classiques de contrôle qualité. En outre, cela ne nécessite pas

forcément un investissement important, et peut même être mise en œuvre dans des laboratoires à ressources limitées. Ainsi, l'utilisation de méthodes d'analyse peu polluantes devrait donc être privilégiée dans le contrôle qualité pharmaceutique pour s'assurer de la fiabilité des médicaments tout en préservant l'environnement et les opérateurs.

2. Perspectives

La perspective immédiate des méthodes de CLHP développées dans ce travail sera leur transfert et utilisation dans les laboratoires de contrôle qualité, pour l'analyse des formulations à base d'artésunate et amodiaquine d'une part, et artéméther et luméfantrine d'autre part. Cela permettrait d'évaluer la performance de ces méthodes en situation réelle d'analyse de routine. Une perspective intéressante serait de réaliser des essais de reproductibilité en vue de l'évaluation et de la mise en place des méthodes développées dans le cadre d'une étude multicentrique incluant des laboratoires préqualifiés OMS, dont fait partie le CHMP, et des laboratoires nationaux de différents pays. Cela contribuerait à la standardisation des méthodes développées et militerait en faveur de leur incorporation dans une pharmacopée.

Par nos investigations, nous avons démontré que par une approche simple de substitution des solvants organiques d'élution en CLHP par de l'éthanol, il est possible de rendre des méthodes de contrôle de qualité pharmaceutique vertes. En plus d'être respectueuse de l'environnement, d'offrir une protection des personnels, cette approche est économique et performante. L'utilisation de l'éthanol diminue les coûts d'achat et de retraitement tout en ne nécessitant pas l'acquisition de matériel dédié. Par conséquent, cette approche devrait être généralisée et considérée dans les nouveaux développements en contrôle de qualité. Nous pensons dans un premier temps à son application pour le contrôle qualité d'autres médicaments essentiels comme ceux utilisés dans le traitement de la tuberculose ou du VIH/Sida et qui sont généralement aussi des bithérapies. Donc, il y aurait une véritable valeur ajoutée dans ces cas de revoir les méthodes de contrôle qualité afin d'une part, d'obtenir des méthodes d'analyse simultanée des substances actives de ces co-formulations et d'une part, que ces méthodes soient respectueuses de l'environnement. Cette étude est une contribution à montrer qu'il est possible de rendre verte beaucoup de méthodes d'analyse en contrôle de qualité.

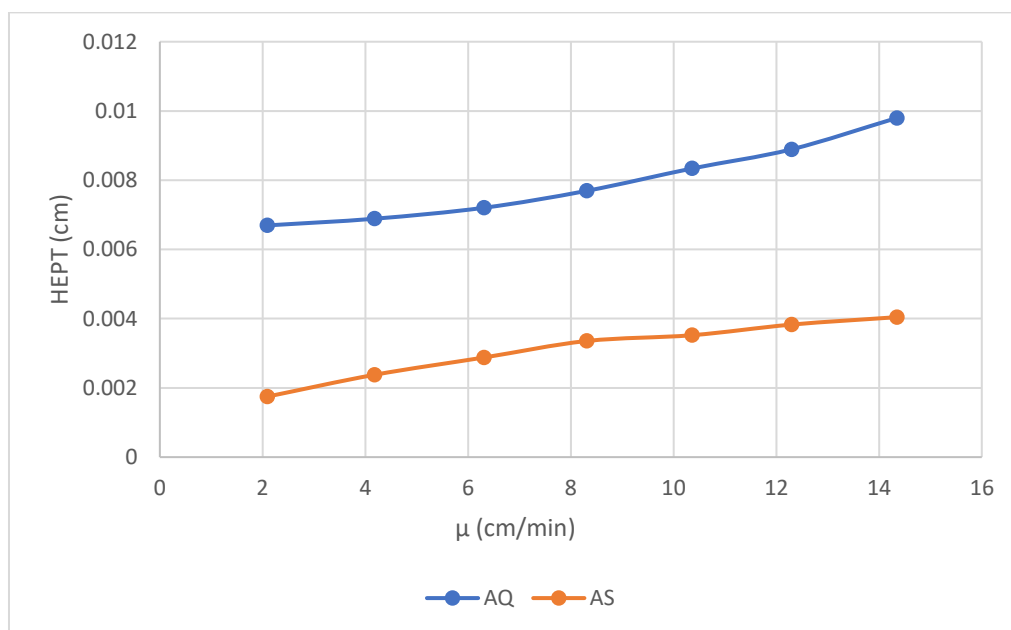
Concernant le spectromètre proche infrarouge portable, ses performances qualitatives pourraient être évaluées sur d'autres médicaments antipaludiques ou appartenant à d'autres classes thérapeutiques. Enfin, ses performances quantitatives dans le dosage des substances

actives dans les formulations peuvent être évaluées, ce qui pourrait en faire un instrument puissant permettant à la fois de détecter les falsifications et de quantifier les substances actives.

Le développement de méthodes peu polluantes pourrait être généralisé dans l'avenir dans le contexte du changement climatique et des initiatives de plus en plus pressantes pour réduire l'empreinte environnementale.

Annexe

Courbes de Van Deemter de l'artésunate et de l'amodiaquine avec l'éthanol comme solvant organique



HEPT : hauteur équivalente à un plateau théorique, μ : vitesse linéaire, AS : artésunate, AQ : amodiaquine.

Phase mobile pour artésunate : Acide formique 10 mM pH 2,85 / Ethanol 96% (50/50, v/v)

Phase mobile pour amodiaquine : Acide formique 10 mM pH 2,85 / Ethanol 96% (85/15, v/v)

Colonne : XBridge BEH C18 (150 x 3 mm, 5 μ m)

Débit : 0,4 mL

Temperature : 30°C

Volume d'injection : 10 μ L

Méthodes d'analyses innovantes et peu polluantes pour le contrôle qualité des médicaments essentiels : application aux antipaludiques

Le contrôle qualité des médicaments est une étape essentielle de la chaîne de distribution des médicaments. Il garantit leurs fiabilités avant leurs utilisations et contribue à la lutte contre les médicaments falsifiés ou de qualité inférieure. Il est conventionnellement réalisé selon les méthodes des monographies des pharmacopées. Ces méthodes se caractérisent souvent par la complexité de leur mise en œuvre et des temps longs consacrés à leurs réalisations. Surtout, ces méthodes nécessitent souvent l'utilisation de réactifs et solvants toxiques pour le personnel de laboratoire et l'environnement. L'objectif de ce travail est de contribuer à l'amélioration du contrôle qualité des médicaments à travers le développement de méthodes d'analyses peu polluantes et de mise en œuvre facile et faisable dans les laboratoires dont ceux à ressources limitées. Il s'est agi en particulier de développer des méthodes de chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée avec des phases mobiles à base d'éthanol qui est l'un des solvants les plus verts. Pour faire la preuve de la pertinence de cette approche, des formulations d'antipaludiques à base d'artésunate et d'amodiaquine d'une part, et d'artéméter et de luméfantine d'autre part, ont été choisis. La première partie du travail a commencé par une étude de criblage utilisant l'éthanol comme solvant organique afin d'évaluer l'effet de différents paramètres critiques tels que le pH et la nature de la phase stationnaire sur le comportement chromatographique des molécules en termes de symétrie de pic, de rétention et de détection. L'association artésunate/amodiaquine a été choisie comme preuve de concept car il s'agit d'un modèle intéressant impliquant une molécule à caractère acide avec peu de groupements chromophores et une molécule à caractère basique. Les résultats du criblage ont permis d'optimiser différentes méthodes en phase inverse verte à base d'éthanol permettant d'analyser l'artésunate, l'amodiaquine et leurs impuretés. L'approche « Quality by Design » recommandée par les autorités réglementaires pharmaceutiques et permettant d'obtenir des méthodes plus flexibles et robustes, a été choisie comme stratégie de développement. Les méthodes ont été ensuite validées selon le guide ICH Q2 (R1), en utilisant la stratégie du profil d'exactitude. La deuxième partie du travail a consisté à démontrer le potentiel d'un spectromètre proche infrarouge portable et à bas prix, en association avec les outils chimiométriques, dans la détection de médicaments falsifiés. L'analyse a porté sur l'association artéméter/luméfantine qui est l'un des médicaments antipaludiques les plus falsifiés. Malgré sa zone spectrale réduite et sa faible résolution comparativement aux appareils classiques, le spectromètre portable a permis de détecter des médicaments falsifiés ne contenant aucune substance active et d'identifier spécifiquement les différentes marques de comprimés. Les résultats obtenus ont démontré le grand potentiel de ces nouveaux équipements proche infrarouge innovants et à bas prix pour leur utilisation en première ligne dans la détection et la lutte contre les faux médicaments. Afin de mieux interpréter les résultats de l'analyse proche infrarouge, une méthode de chromatographie liquide en phase inverse, verte et rapide a été aussi développée pour doser l'artéméter et la luméfantine dans les comprimés. Ces différentes approches ont montré qu'il est possible de mettre en œuvre le concept de chimie analytique verte pour le contrôle qualité sans nécessité d'acquisition de nouveaux équipements pour obtenir des méthodes performantes qui respectent la réglementation pharmaceutique.

Mots clés : Contrôle qualité pharmaceutique, chimie analytique verte, chromatographie liquide verte, spectromètre proche infrarouge portable, antipaludiques.

Innovative and green analytical methods for quality control of essential medicines: application to antimalarial drugs

The quality control of pharmaceutical products is a key issue in the medicine supply chain. It guarantees the reliability before consumption and contribute to fight against substandard and falsified drugs. It is conventionally performed according to pharmacopeias in which methods are most often long and use harmful reagents for the technical staff and environment. The objective of this work was to improve the quality control of drugs through the development of green analytical methods easy to implement in laboratories including those with limited resources. It was consisted, particularly, to develop reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods with mobile phases based on ethanol which is one of the best green solvents. Analyzes were applied to the antimalarial combination therapies such as artesunate/amodiaquine and artemether/lumefantrine. The first part of the study started by a screening phase where impacts of critical parameters, such as mobile phase pH and stationary phase, on compound peak symmetry, retention and detection were investigated. Artesunate/amodiaquine combination therapy, which includes an acidic compound with few chromophores and a basic compound was chosen as proof of concept. Several pH modifiers selected for their ecofriendly character and stationary phases were screened. Based on the screening results, different green RP-HPLC methods using ethanol as organic solvent and allowing to analyze artesunate, amodiaquine and their related impurities were developed. Quality by Design approach, recommended by the pharmaceutical regulatory authorities and allowing to obtain robust methods, was chosen as development strategy. Developed methods were validated according ICH Q2 (R1) guideline by using accuracy profile methodology. The second part of the study consisted in investigating the qualitative performance of a low-cost handheld near infrared spectrophotometer associated to chemometric tools as screening tool in the identification of falsified drugs. Analysis was performed on artemether/lumefantrine tablets which are one of the most falsified drugs. Despite its limited spectral range and low resolution compared to bench top devices, the handheld device allowed to detect falsified drugs with no active ingredients and to identify specifically a tablet brand name. This innovated low-cost handheld near infrared spectrophotometer offers a promising performance and could be used as a first line screening tool in the detection and fight against falsified drugs. For a better interpretation of the near infrared results, a green and fast HPLC method was also developed, validated, and used to analyze artemether and lumefantrine in the tablets. These different approaches demonstrated that green analytical methods could be implemented in the pharmaceutical quality control field without the need of new equipment and with analytical performances in accordance with pharmaceutical requirements.

Keywords: Pharmaceutical quality control, green analytical chemistry, green liquid chromatography, handheld near infrared spectrometer, antimalarial drugs.