

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>%</b>	: Pourcentage
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>ACN</b>	: Acétonitrile
<b>AUC</b>	: Surface sous la courbe
<b>CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub></b>	: Acétate d'ammonium
<b>CLHP</b>	: Chromatographie liquide haute performance
<b>CMC</b>	: Concentration micellaire critique
<b>Di</b>	: Diamètre interne
<b>DAD</b>	: Détecteur à barrette de diode
<b>E</b>	: Champ électrique
<b>EC</b>	: Electrophorèse capillaire
<b>ECB</b>	: Electrophorèse capillaire budget
<b>ECZ</b>	: Electrophorèse capillaire de zone
<b>FEO</b>	: Flux électroosmotique
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	: Acide borique
<b>IUPAC</b>	: International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>kV</b>	: Kilo volt
<b>l</b>	: Litre
<b>LED</b>	: Diode électroluminescente
<b>mbar</b>	: millibar
<b>MEEKC</b>	: Chromatographie Electrocinétique en Microémulsion
<b>MEKC</b>	: Chromatographie Micellaire Electrocinétique

<b>MeOH</b>	: Méthanol
<b>mg</b>	: milligramme
<b>min</b>	: minute
<b>mL</b>	: millilitre
<b>mM</b>	: millimolaire
<b>mm</b>	: millimètre
<b>NACE</b>	: Electrophorèse en milieu non aqueux
<b>NaOH</b>	: hydroxyde de sodium
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	: Chlorure d'ammonium
<b>nL</b>	: nanolitre
<b>nm</b>	: nanomètre
<b>pH</b>	: potentiel hydrogène
<b>ppm</b>	: partie par millions
<b>s</b>	: seconde
<b>SDS</b>	: Sodium dodecyl sulfate
<b>UV</b>	: ultra-violet
<b>vep</b>	: Vitesse électrophorétique
<b>VIS</b>	: Visible
<b>μA</b>	: Micro-ampère
<b>μeo</b>	: mobilité électroosmotique
<b>μep</b>	: mobilité électrophorétique
<b>μg</b>	: micro gramme
<b>μm</b>	: micro mètre

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	: 2,6-Diméthyl-4-(2-nitrophényl)-1,4-dihydro-3,5-pyridine dicarboxylate de diméthyle.....	5
<b>Figure 2</b>	: Principe de séparation des molécules en électrophorèse capillaire de zone libre (ECZ).....	15
<b>Figure 3</b>	: Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire de zone libre (CZE).....	16
<b>Figure 4</b>	: Ordre de migration des anions, des cations et des espèces neutres lors d'une analyse en électrophorèse capillaire.....	19
<b>Figure 5</b>	: Principe de séparation des molécules en chromatographie micellaire électrocinétique capillaire (MEKC).....	20
<b>Figure 6</b>	: Appareil d'électrophorèse capillaire.....	31
<b>Figure 7</b>	: Tampon borate pH =9,3-10mM-injection 1.....	33
<b>Figure 8</b>	: Tampon borate pH =9,3-50mM-injection 1.....	34
<b>Figure 9</b>	: Nifedipine 2-100 ppm + tampon borate 10mM-100 ppm + Eau 800 ppm, injection 3 + 235 nm.....	34
<b>Figure 10</b>	: Acétone 10% + tampon borate 10 mM + nifedipine 100 ppm + eau 800 ppm + injection 3 + 235 nm.....	35
<b>Figure 11</b>	: Tampon NH <sub>4</sub> Cl pH =5,55 - 10mM-injection 1.....	36
<b>Figure 12</b>	: Tampon NH <sub>4</sub> Cl 10mM - 500 µL + 500 µL Nifedipine+235nm.....	36
<b>Figure 13</b>	: Micro-émulsion 3 - SDS +Acétate ammonium 10mM +Butan-1-ol + Octane + injection 3.....	38

**Figure 14** : Micro-émulsion 4 - Nifédipine 50 uL + SDS +Acétate ammonium 10mM + Butan-1-ol + Octane + injection 5..... 38

**Figure 15** : Micro-émulsion 3 - Acétone 50uL + Nifédipine 50uL + SDS + Acétate ammonium 10mM +Butan-1-ol + Octane + injection 1- 235 nm. .... 39

**Figure 16** : Micelle + SDS + tampon borate pH = 9,2+ 235 nm+ injection 3..... 40

**Figure 17** : Micelle +Acétone + SDS + tampon borate pH = 9,2 + 235 nm+ injection 7 ..... 40

**Figure 18** : Micelle 2 +Nifedipine 100 uL+ SDS + tampon borate pH = 9,2+ 235 nm+ injection 1 ..... 41

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>
---------------------------

**Tableau I** : Manuel de fonctionnement de l'appareil d'électrophorèse capillaire..... 30

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>PREMIERE PARTIE: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>4</b>
<b>1. GENERALITES SUR LA NIFEDIPINE</b> .....	<b>5</b>
1.1. Propriétés physico-chimiques.....	5
1.2. Méthode d'obtention, pharmacocinétique et utilisation thérapeutiques de la nifedipine.....	6
1.2.1. Méthode d'obtention de la nifedipine.....	6
1.2.2. Pharmacocinétique.....	8
1.2.2.1. Absorption.....	8
1.2.2.2. Biotransformation.....	9
1.2.2.3. Elimination.....	10
1.2.3. Indications thérapeutiques.....	10
1.2.3.1. Posologie et mode d'administration.....	10
1.2.3.2. Contre-indications.....	11
1.2.3.3. Mises en garde spéciales et précautions d'emploi.....	11
1.2.3.4. Interaction avec d'autres médicaments et autres formes d'interaction.....	12
1.2.3.5. Grossesse et allaitement.....	13
1.2.3.6. Effets indésirables.....	13
<b>2. GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE</b> .....	<b>14</b>
2.1. Electrophorèse capillaire de zone.....	15
2.1.1. Principe.....	15
2.1.2. Mode opératoire.....	16
2.1.2.1. Migration électrophorétique.....	17
2.1.2.2. Flux electro-osmotique (feo).....	17
2.1.2.3. Mobilité apparente.....	18
2.1.3. Avantages et inconvénients.....	19
2.1.4. Applications.....	20
2.2. Chromatographie micellaire électrocinétique capillaire : « MEKC ».....	20
2.2.1. Principe.....	20
2.2.2. Mode opératoire.....	21
2.2.3. Avantages et inconvénients.....	22
2.2.4. Applications.....	22

2.3. Electrophorèse capillaire non aqueuse : « NACE » .....	22
2.3.1. Principe .....	22
2.3.2. Mode opératoire .....	23
2.3.3. Avantages et inconvénients.....	24
2.3.4. Applications .....	24
2.4. Chromatographie électrocinétique en microémulsion (MEEKC) .....	25
2.4.1. Principe .....	25
2.4.2. Mode opératoire .....	25
2.4.3. Avantages et inconvénients.....	26
2.4.4. Applications .....	26
<b>DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL .....</b>	<b>27</b>
<b>1. OBJECTIFS .....</b>	<b>28</b>
1.1. Objectif général .....	28
1.2. Objectifs spécifiques.....	28
<b>2. CADRE D'ETUDE ET METHODOLOGIE .....</b>	<b>28</b>
2.1. Cadre et durée de l'étude .....	28
2.2. Méthodologie.....	28
2.2.1. Appareil d'électrophorèse capillaire.....	28
2.2.2. Petit matériel .....	31
2.2.3. Verrerie .....	32
2.2.4. Réactifs utilisés .....	32
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>33</b>
3.1. Electrophorèse capillaire de zone .....	33
3.2. Electrophorèse capillaire non aqueuse : « NACE » .....	35
3.3. La chromatographie électrocinétique en Microémulsion : « MEEKC ».....	37
3.4. Chromatographie micellaire électrocinétique capillaire : (MEKC) .....	39
<b>4. COMMENTAIRES .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>48</b>

# **INTRODUCTION**

L'électrophorèse capillaire (EC) est définie comme le mouvement d'ions chargés se déplaçant dans une solution d'électrolytes, sous l'influence d'un champ électrique, à l'intérieur d'un tube capillaire. Les premiers travaux sur cette technique furent entrepris par Hjerten, en 1967, qui utilisa des capillaires en quartz de 1 à 3 mm de diamètre pour séparer en différentes zones des mélanges de divers composés (protéines, peptides, ions organiques et inorganiques). Dès lors, l'EC prit le nom d'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) et ne devint populaire que dans les années 80 grâce aux travaux de Jorgensen et Lukacs qui améliorèrent la technique en utilisant des capillaires de 75  $\mu\text{m}$  en silice vierge fondue. D'autre part, ils furent les premiers à clarifier la théorie en décrivant les relations reliant les paramètres opérationnels à la qualité de la séparation. De nos jours, la séparation des analytes (sous forme ionisée) en ECZ est entreprise à l'intérieur d'un capillaire en silice vierge fondue revêtue d'une couche protectrice externe de polyimide. Ce capillaire est rempli d'un tampon de séparation (BGE) dont la composition est très variable (aqueux, organique, hydro-organique), mais qui contient toujours un ou plusieurs sels, lui conférant à la fois une certaine force ionique et un pH donné. Chacune des extrémités du capillaire est alors placée dans deux flacons remplis du même tampon, puis connectée à des électrodes reliées à une source de haute tension ( $\leq 30\text{kV}$ ). La dimension du capillaire varie en fonction des performances et du temps d'analyse désiré, mais également du type de détecteur utilisé. De manière générale, le diamètre interne (d.i) d'un capillaire se situe entre 25 et 150  $\mu\text{m}$  et sa longueur varie entre 30 et 100 cm. L'injection se fait à partir du flacon contenant l'échantillon par l'application soit d'une pression (injection hydrodynamique), soit d'une tension ou d'un courant (injection électrocinétique). Bien que l'injection électrocinétique permette un gain notable au niveau de la sensibilité, elle reste moins populaire que l'injection hydrodynamique à raison de son manque de répétabilité, de la discrimination

vis-à-vis des analytes injectés et du phénomène de déplétion sur l'échantillon [1].

Notre objectif consistera à montrer les différents modes d'électrophorèse capillaire que nous avons utilisé pour faire la mise au point du développement d'une méthode d'analyse de médicaments contenant de la nifédipine, antihypertenseur appartenant à la famille des inhibiteurs calciques, par électrophorèse capillaire.

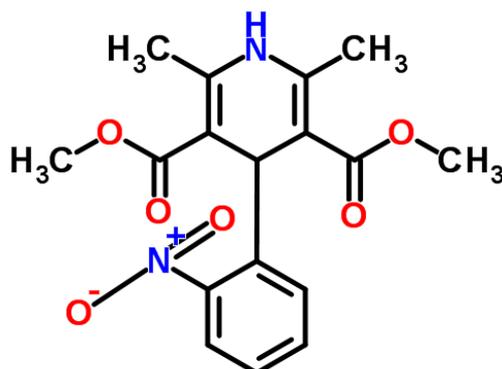
Ce travail sera présenté en deux parties:

- Une première partie qui fait un rappel sur les généralités sur la nifédipine ainsi que les différentes techniques employées en électrophorèse capillaire;
- Une deuxième partie qui fait la synthèse des travaux de développement d'une méthode d'électrophorèse capillaire pour l'analyse de la nifédipine

**PREMIERE PARTIE:**  
**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

# 1. GENERALITES SUR LA NIFEDIPINE

## 1.1. Propriétés physico-chimiques



**Figure 1 : 2,6-Diméthyl-4-(2-nitrophényl)-1,4-dihydro-3,5-pyridine dicarboxylate de diméthyle**

La Nifédipine est une poudre jaune de formule brute  $C_{17}H_{18}N_2O_6$ , de poids moléculaire **346,33 g/mol** et de dénomination chimique selon les règles de l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ou en français (*Union internationale de chimie pure et appliquée*) **2,6-Diméthyl-4-(2-nitrophényl)-1,4-dihydro-3,5-pyridinedicarboxylate de diméthyle** ou **2,6-diméthyl-4-(2-nitrophényl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle**. La Nifédipine a un point de fusion compris entre 172-174°C, et deux valeurs de pka :  $pK_{a1} = 3,93$  et  $pK_{a2} = 5,33$ . De plus elle est très peu soluble dans de l'eau : 5,9 mg/l à 25°C ; La Nifédipine est soluble dans les solvants organiques à 20°C: acétone (250 mg/l), éthanol (17 g/l), méthanol (26 g/l). [2, 3,4 ,5].

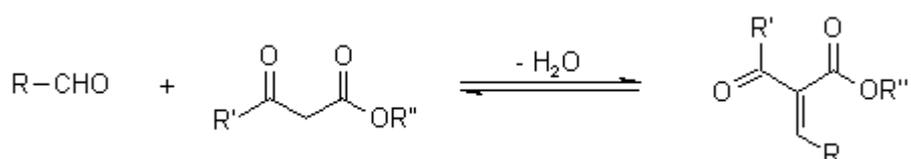
## 1.2.Méthode d'obtention, pharmacocinétique et utilisation thérapeutiques de la nifedipine

### 1.2.1. Méthode d'obtention de la nifedipine

La nifédipine est synthétisée à partir du 2-Nitrobenzaldéhyde et de l'acétylacétate de méthyle.

On distingue 3 étapes.

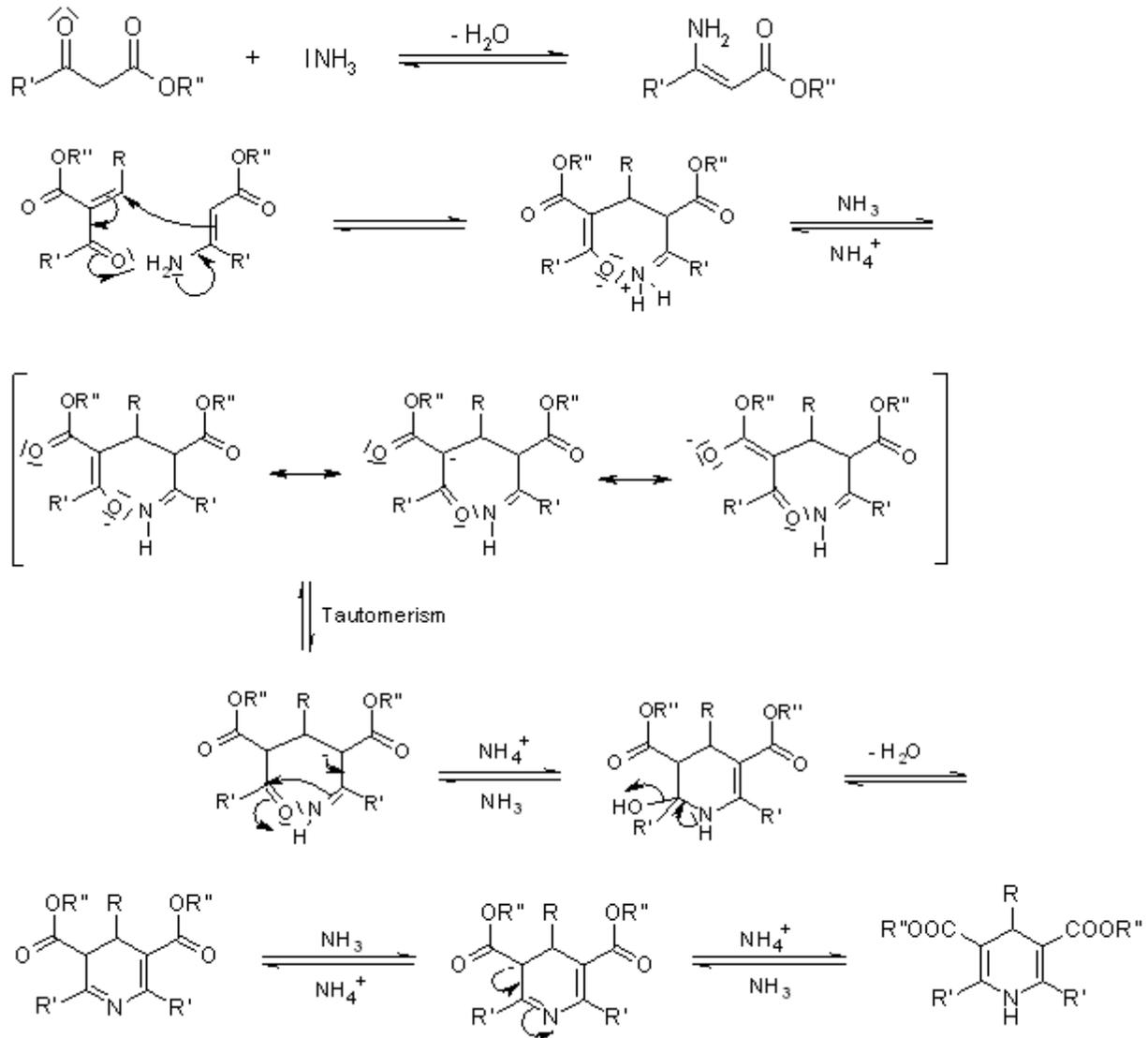
**1<sup>ère</sup> étape :**



En milieu basique, chauffé, l'acétylacétylate de méthyle perd un hydrogène du méthylène en  $\alpha$  de la fonction cétone. Il se forme un carbanion. Le carbanion va attaquer la fonction la plus réactive du nitrobenzaldéhyde : c'est la fonction aldéhyde, qui est non énolisable. Il y a formation d'un  $\beta$  cétole qui se déshydrate facilement par une réaction de crotonisation (d'où libération d'eau). Ceci donne une cétone éthylique. Ici, l'ammoniaque joue le rôle de solvant basique.

## 2<sup>ème</sup> étape simultanée :

L'ammoniaque joue le rôle de réactif nucléophile : le doublet libre de l'azote attaque la fonction carbonyle d'une deuxième molécule d'acétylacétyle de méthyle. On obtient une énamine.



### **3<sup>ème</sup> étape : addition de Michaël**

Cette étape correspond à l'attaque nucléophile de l'énamine (donneur de Michaël) sur la cétone éthylénique.

Le carbone en  $\beta$  du composé carbonylé insaturé formé lors de la 1<sup>ère</sup> étape constitue l'accepteur de Michaël.

#### Remarque:

- sous l'action de la lumière, la nifédipine se décompose en un composé nitrosé dépourvu d'activité. Ceci explique que la synthèse doit obligatoirement se faire à l'abri de la lumière et le transport dans des flacons opaques.
- pour qu'il y ait formation de nifédipine, il faut que l'énamine et la cétone éthylique soient en quantités équivalentes.

### **1.2.2. Pharmacocinétique**

Les dihydropyridines exercent l'effet vasodilatateur le plus puissant. Aux doses thérapeutiques habituelles, ces agents n'ont pratiquement pas d'influence sur la fonction des cellules myocardiques et le système de conduction du cœur. L'effet hypotenseur de ces médicaments est souvent contrecarré par une augmentation réflexe de l'activité nerveuse sympathique, cette dernière se traduisant au niveau du cœur par une accélération de la fréquence et un accroissement de la contractilité, ceci particulièrement lors de l'instauration du traitement [6]. Actuellement, cinq dihydropyridines inhibiteurs de flux calcique sont commercialisées en France, dont quatre existent sous une forme à libération prolongée pour leur indication dans l'hypertension.

#### **1.2.2.1. Absorption [7]**

La nifédipine est résorbée à plus de 90% par l'organisme. L'absorption est rapide, la molécule marquée au Carbone 14 apparaît dans le sérum 3 minutes après administration sublinguale et 20 minutes après administration orale. Pour

les deux voies, la concentration sérique maximale est obtenue une à deux heures après la prise [8]. La nifédipine subit un intense métabolisme de premier passage hépatique après administration orale. C'est pourquoi sa biodisponibilité après administration par voie orale est comprise entre 30 et 77 % [9-10-11].

#### 1.2.2.2. Biotransformation

La demi-vie d'élimination de la nifédipine est relativement brève, de 30 minutes à 2,8 heures après administration par voie orale, et il n'a jamais été observé de phénomène d'accumulation au cours d'un traitement continu [12-13]. La nifédipine et ses métabolites sont liés environ à 90 % aux protéines sériques. La nifédipine non liée aux protéines diffuse rapidement dans les organes et les tissus. A une concentration de nifédipine de 20 µg/ml, environ 92 % de la substance est liée aux protéines sériques chez l'homme et à une concentration de 0,2 µg/ml, la liaison est d'environ 98 % après administration orale de 20 mg sous forme de capsule. Il a été trouvé une relation entre les taux plasmatiques et la réduction de la résistance vasculaire [8].

La nifédipine est presque totalement métabolisée dans l'organisme puisqu'on ne retrouve que des traces de la substance inchangée dans l'urine. Le système cytochrome P-450 est probablement responsable de son métabolisme [17]. La nifédipine se transforme en un premier métabolite dont une des deux fonctions ester se trouve Hydrolysée pour donner un acide carboxylique (figure 5). Le deuxième métabolite est obtenu par oxydation de la fonction méthyl en ortho par rapport à la fonction acide pour donner un groupement hydroxyméthyl, ce deuxième métabolite est en équilibre avec son dérivé lactonique dont les proportions dépendent du pH. On peut détecter deux métabolites dans les urines. Ce sont des dérivés de la pyridine, contrairement à la nifédipine qui est un dérivé de la dihydropyridine. Ces deux métabolites sont pharmacologiquement inactifs. L'effet de premier passage hépatique est important [17]

### **1.2.2.3. Elimination**

Après administration d'une dose sublinguale ou orale de 10 mg de nifédipine, 80% de la substance est éliminée sous forme de métabolites par le rein. La part non excrétée par le rein est éliminée par voie hépatobiliaire puis dans les fèces [16-19].

### **1.2.3. Indications thérapeutiques**

Traitement symptomatique de l'angor stable chronique en monothérapie ou en association avec un traitement bêtabloquant.

Traitement de tous les niveaux d'hypertension artérielle.

#### **1.2.3.1. Posologie et mode d'administration**

##### **Voie orale.**

Pour des effets optimaux, la posologie doit être adaptée en fonction des besoins individuels. La dose initiale doit être augmentée progressivement selon les signes cliniques. La posologie recommandée chez l'adulte est la suivante :

- *Angor stable chronique (angor d'effort) :*

La posologie initiale recommandée est d'un comprimé de 30 mg une fois par jour. La dose peut être augmentée en fonction des besoins individuels jusqu'à un maximum de 90 mg une fois par jour.

- *Hypertension artérielle :*

La posologie initiale recommandée est d'un comprimé de 30 mg une fois par jour. Si nécessaire, la dose peut être augmentée en fonction des besoins individuels jusqu'à un maximum de 90 mg une fois par jour. Les comprimés doivent être avalés entiers sans être croqués, mâchés ou écrasés. Les comprimés sont de préférence administrés le matin avec un verre d'eau (pas de jus de pamplemousse ; voir également la rubrique 4.5). La durée du traitement est fixée par le médecin traitant.

### **1.2.3.2. Contre-indications**

- Hypersensibilité connue à la nifédipine ou à d'autres dihydropyridines, ou à l'un des excipients.
- Grossesse.
- Choc cardiogénique, sténose aortique cliniquement prouvée, angor instable ou en cas d'infarctus du myocarde datant de moins d'un mois.
- traitement concomitant par la rifampicine.

### **1.2.3.3. Mises en garde spéciales et précautions d'emploi**

Dans certains cas exceptionnels, l'utilisation de nifédipine peut entraîner de graves symptômes d'angine de poitrine, probablement en raison d'une résorption rapide et d'une chute trop soudaine de la pression artérielle. Dans ce cas, le médecin traitant doit en être immédiatement informé et le traitement par nifédipine doit être arrêté. La nifédipine doit être utilisée avec précaution chez les patients présentant une ischémie (menaçante) des doigts et/ou orteils, étant donné que ce phénomène peut s'aggraver en raison d'une diminution de la perfusion tissulaire due à une pression de perfusion diminuée. Chez les patients souffrant de diarrhée, le temps de séjour du comprimé dans le tractus gastro-intestinal, et de ce fait, la durée d'action, sont réduits. Des symptômes d'obstruction pouvant se manifester chez les patients présentant une sténose gastro-intestinale sévère préexistante, Nifedipine Pharmamatch retard ne doit pas être administré à ces patients. Des symptômes d'obstruction ont également été observés chez les patients ne présentant aucune sténose gastro-intestinale diagnostiquée. Nifedipine Pharmamatch retard ne doit pas non plus être prescrit aux patients présentant une poche de Kock (iléostomie suivant une proctocolectomie).

#### **1.2.3.4. Interaction avec d'autres médicaments et autres formes d'interaction**

La nifédipine est métabolisée par le système cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), qui est présent dans la muqueuse intestinale et le foie. Les médicaments connus pour inhiber ou induire cette enzyme peuvent ainsi altérer l'absorption (après une administration orale) ou l'élimination de la nifédipine.

- Substances induisant le CYP3A4

##### *\*Rifampicine :*

La rifampicine induit fortement le système CYP3A4. En cas de co-administration avec la rifampicine, la biodisponibilité de la nifédipine est considérablement réduite (baisse de 95 % de l'AUC) et de ce fait, son efficacité affaiblie. La co-administration de nifédipine avec la rifampicine est par conséquent contre-indiquée.

##### *\*Phénytoïne :*

La phénytoïne induit le système CYP3A4. En cas de co-administration avec la phénytoïne, la biodisponibilité de la nifédipine est réduite (baisse de 70 % de l'AUC) et de ce fait, son efficacité affaiblie. Lorsque les deux médicaments sont administrés simultanément, la réponse clinique à la nifédipine doit être surveillée et, si nécessaire, une augmentation de la dose de nifédipine envisagée. Si la dose de nifédipine est augmentée pendant la co-administration des deux médicaments, une réduction de la dose de nifédipine doit être envisagée lorsque le traitement par phénytoïne est interrompu.

- Substances inhibant le CYP3A4 :

##### *\*Jus de pamplemousse :*

Le jus de pamplemousse inhibe le système CYP3A4. La co-administration de jus de pamplemousse avec la nifédipine accroît les concentrations plasmatiques

de nifédipine, en raison d'une diminution du métabolisme de premier passage. Par conséquent, l'effet de la nifédipine sur la diminution de la pression artérielle peut augmenter. Après une prise régulière de jus de pamplemousse, cet effet peut durer au moins trois jours après la dernière ingestion de jus de pamplemousse. La prise de jus de pamplemousse pendant un traitement par nifédipine est déconseillée (voir également la rubrique 5.2).

#### **1.2.3.5. Grossesse et allaitement**

Aucune donnée pertinente n'existe quant à l'utilisation de la nifédipine chez les femmes enceintes. Les études sur les animaux ont démontré une toxicité de la reproduction, à savoir une embryotoxicité et des effets tératogènes à des doses toxiques pour la mère. La nifédipine est contre-indiquée pendant la grossesse.

#### **1.2.3.6. Effets indésirables**

Les réactions secondaires sont souvent liées à la dose et surviennent dans la majeure partie des cas au cours des deux premières semaines suivant le début du traitement.

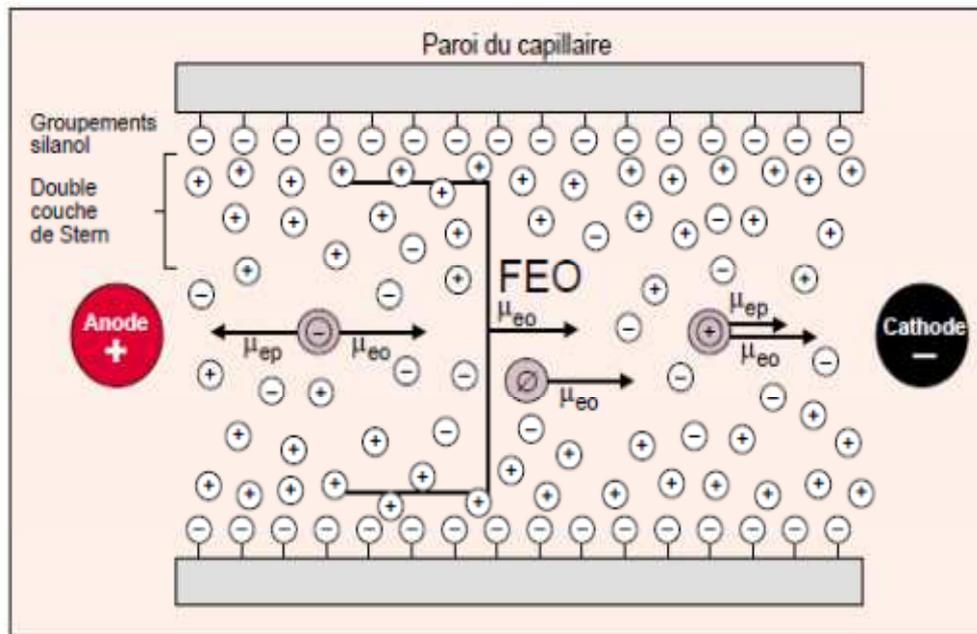
- Troubles cardiovasculaires : œdème périphérique, bouffée congestive (érythrose faciale).
- Troubles gastro-intestinaux : constipation, nausées, etc.
- Troubles des organes de reproduction et des seins : énurésie nocturne, détérioration aiguë réversible de la fonction rénale.
- Troubles généraux et accidents liés au site d'administration : céphalée, vertige, sensations ébrieuses, sensation de pression dans la tête.
- *Fréquents* : étourdissement, fatigue.

## 2. GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique analytique relativement récente qui permet la séparation des espèces chargées ou non à travers un capillaire, en se fondant sur les différences de migration de ces composés soumis à un champ électrique. Les premières applications ont été effectuées en électrophorèse capillaire de zone (ECZ), mode permettant de séparer les composés ionisés. Par la suite, d'autres modes d'EC se développèrent, dont par exemple, la chromatographie micellaire électrocinétique (MEKC) qui permet aussi la séparation de composés neutres. Bien que d'autres modes soient utilisés et aient chacun leur intérêt, seul le mode d'ECZ couplé à un détecteur UV-Vis est abordé au cours de ce travail. L'électrophorèse capillaire présente un grand intérêt de par sa grande efficacité qui se traduit par un nombre de plateaux théoriques très élevé ( $10^5$ - $10^6$ ), des manipulations et un appareillage simples et souvent automatisés, de faibles volumes d'échantillon (1-20 nl) [20] et une faible consommation de solvants organiques. De plus, du fait de son mécanisme de séparation différent, l'EC se révèle une méthode complémentaire (orthogonale) aux techniques chromatographiques (CPG, CLHP,...). Actuellement, l'EC trouve de nombreuses applications dans le domaine pharmaceutique [21].

## 2.1. Electrophorèse capillaire de zone

### 2.1.1. Principe

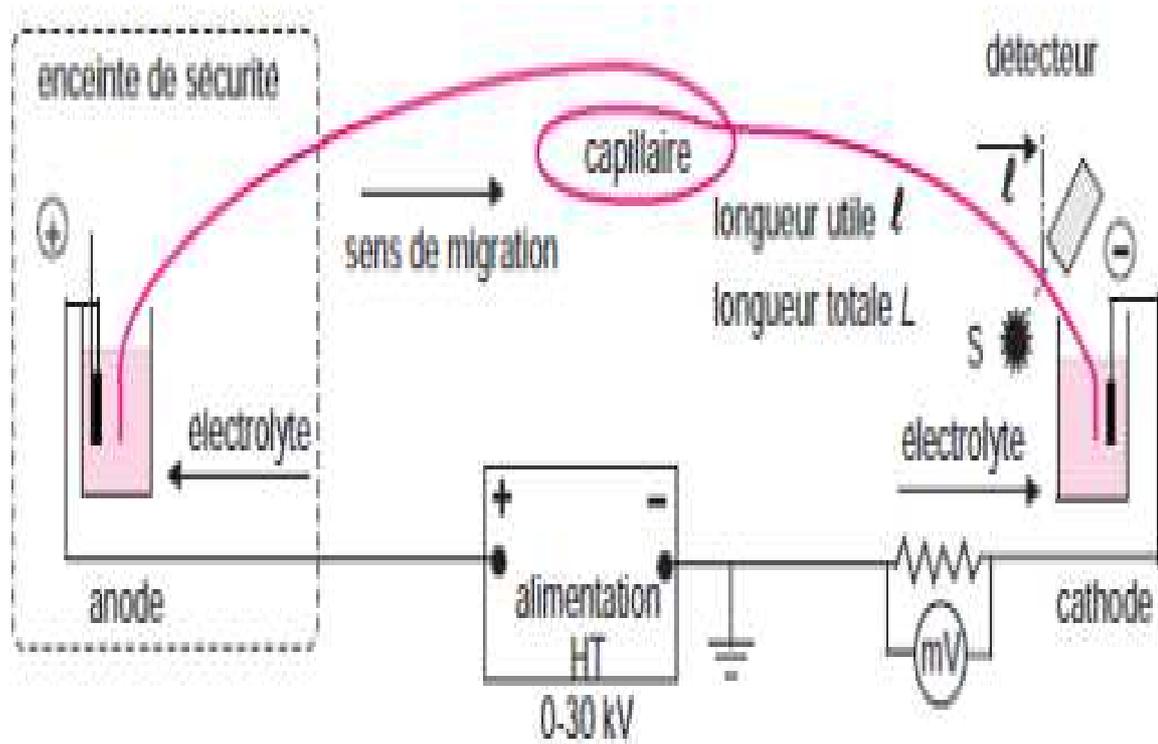


**Figure 2 : Principe de séparation des molécules en électrophorèse capillaire de zone libre (ECZ).**

Dans un capillaire de silice fondue non traité et en présence d'un tampon de  $\text{pH} > 3$  les groupements silanol de la paroi du capillaire ont une charge négative qui attire les cations du tampon créant une double couche électrique, dite double couche de Stern. Sous l'effet du champ électrique, les cations excédentaires de la double couche se mettent en mouvement en direction de la cathode et, en entraînant l'ensemble des molécules du solvant, donnent naissance à un flux électro-osmotique (FEO) caractérisé par une mobilité électrophorétique  $\mu_{eo}$ . D'autre part, les molécules chargées présentes dans l'échantillon ont une mobilité électrophorétique propre  $\mu_{ep}$  déterminée par leur rapport charge/taille. Une molécule chargée positivement aura une mobilité apparente égale à la somme de  $\mu_{ep}$  et  $\mu_{eo}$  et se déplacera plus vite que le FEO. Au contraire, pour une molécule chargée négativement  $\mu_{ep}$  tendra à s'opposer  $\mu_{eo}$ . La vitesse de déplacement de cette molécule sera donc

inférieure à celle du FEO. En ce qui concerne les molécules neutres, elles ont une valeur de  $\mu_{ep}$  nulle et se déplaceront toutes à la vitesse du FEO sans être séparées. [54]

### 2.1.2. Mode opératoire



**Figure 3 : Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire de zone libre (CZE).**

L'appareillage est constitué de deux récipients, remplis d'une solution d'électrolyte tamponnée, dans laquelle trempent les extrémités d'un tube capillaire (diamètre interne entre 25 et 75  $\mu\text{m}$ ) ainsi que deux électrodes de platine. Il compte aussi un générateur de tension capable de délivrer une différence de potentiel compris entre 10 et 30 kV, un système d'injection hydrodynamique en général (application d'une différence de pression entre les deux électrodes pendant un temps  $\Delta t$ ) et un détecteur UV.

### 2.1.2.1. Migration électrophorétique

Elle correspond au déplacement des ions sous l'influence d'un champ électrique (**E**). Comme en électrophorèse traditionnelle, tout ion ou particule chargée se déplace, avec une vitesse  $v_{ep}$ , qui dépend des conditions de l'expérience et de sa mobilité électrophorétique propre ( $\mu_{ep}$ ). Cette vitesse  $v_{ep}$  est donnée par l'équation de Huckel :

$$v_{ep} = \frac{qE}{6\pi\eta r} = \mu_{ep}E \quad (\mu_{ep} : \text{mobilité électrophorétique en } \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$$

$v_{ep}$  est fonction de la charge de l'ion  $q$ , de son rayon  $r$ , du champ électrique appliqué  $E$  et de la viscosité du milieu  $\eta$ . La vitesse de migration est directement proportionnelle au rapport charge /taille de l'ion.

$\mu_{ep} = v_{ep}/E = v_{ep}L/V$  où  $L$  désigne la longueur totale du capillaire et  $V$  la ddp appliquée à ses extrémités. On affecte à la mobilité électrophorétique un signe (+ ou -) selon la nature cationique ou anionique de l'espèce. Elle est nulle pour une espèce globalement neutre.

### 2.1.2.2. Flux electro-osmotique (feo)

Le second facteur qui contrôle la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte encore appelé flux électro-osmotique qui se caractérise par sa mobilité électro-osmotique. La vitesse de l'écoulement électro osmotique ( $v_{feo}$ ) ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) est reliée à la densité de charge portée par le capillaire  $\xi$  ( $\text{m}^3 \cdot \text{kg}^2 \cdot \text{C}^{-3} \cdot \text{S}^{-4}$ ), au champ électrique appliqué  $E$  ( $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ), à la viscosité de la solution tampon ( $\text{Pa} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et à la constante diélectrique du tampon  $\epsilon$  ( $\text{C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ):

$$v_{feo} = \frac{\epsilon \xi E}{4 \pi \eta} = \mu_{feo} E.$$

Ce flux résulte de la présence de charges négatives portées par la matrice. Ces charges négatives proviennent de l'ionisation des groupements silanol ( $\text{Si-OH}$ ) qui tapissent l'intérieur du capillaire en silanoates ( $\text{Si-O}^-$ ) à pH supérieur à 3. Ces sites anioniques fixes attirent des cations présents dans la solution et les ordonnent en double couche dont l'une est collée à la paroi et l'autre quelque peu mobile. Entre ces deux couches naît une différence de potentiel

(Le potentiel Zeta), dont la valeur dépend de la concentration de l'électrolyte et du pH, les cations migrent vers la cathode. Ces ions étant solvatés par des molécules d'eau, il apparaît un flux d'électrolyte qui se dirige dans le même sens [55].

L'écoulement électro-osmotique dépend de la force ionique et du pH de l'électrolyte qui conditionne le degré d'ionisation des groupements silanols et la densité de la double couche. L'ajout de certains tensioactifs comme le tétra-akylammonium dans l'électrolyte peut inverser la polarité de la paroi, le flux électro osmotique se dirige vers l'anode.

### 2.1.2.3. Mobilité apparente

Chaque ion est soumis à  $\mu_{ep}$  et  $\mu_{EOS}$ , il migre donc avec une mobilité apparente  $\mu_{app}$ .

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{EOS} = \frac{Ll}{tV}$$

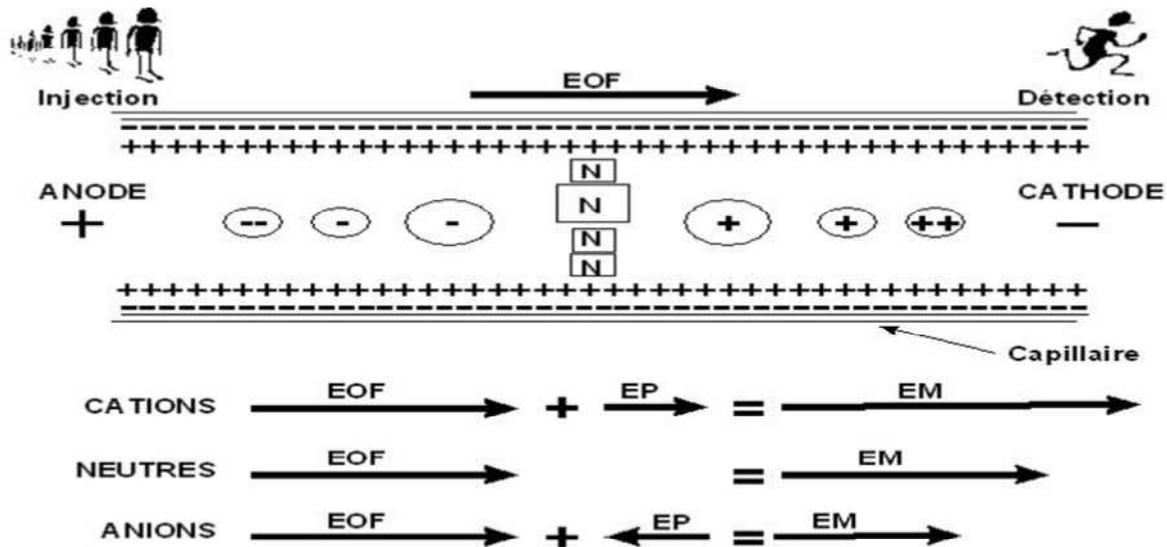
L : longueur totale du capillaire (cm)

l : longueur du capillaire jusqu'au détecteur (cm)

t : temps de migration (min)

V : tension appliquée (V)

L'injection d'un échantillon constitué d'espèces cationiques, anioniques et neutres, conduit à la migration successive vers la cathode des cations, des espèces neutres et des anions.



**Figure 4 : Ordre de migration des anions, des cations et des espèces neutres lors d'une analyse en électrophorèse capillaire.**

(EOF : flux électro osmotique ; EP: migration électrophorétique; N : espèce neutre ; EM : mobilité apparente.

### 2.1.3. Avantages et inconvénients

#### ➤ Avantages

- ✚ Faible coût d'utilisation : faible quantité de solvant organique par rapport aux autres méthodes.
- ✚ Faible volume injecté : 1- 10 microlitres voir même nanolitres et ne dépassant pas 1% du volume du capillaire.
- ✚ Durée de l'analyse : 5 – 20 minutes plus rapide que les séparations chromatographiques. [22]

#### ➤ Inconvénients

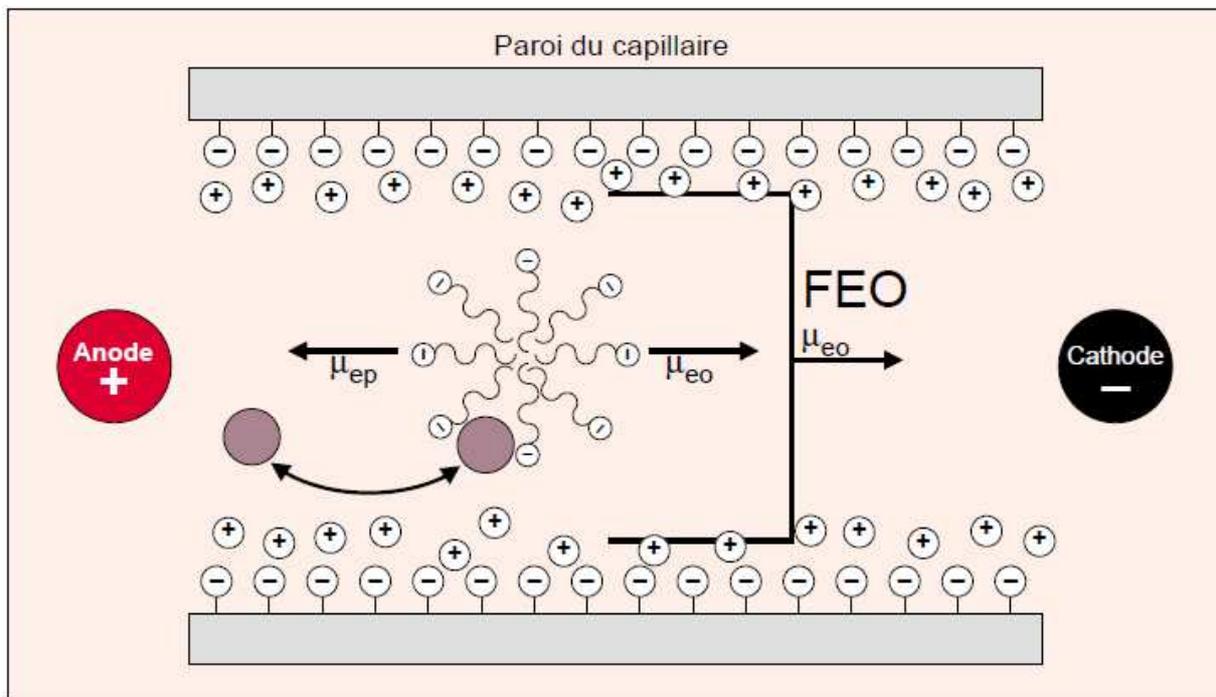
- ✚ La répétabilité des volumes à injecter pendant les analyses.
- ✚ Les variations du pH des solutions tampons.
- ✚ Limites de détection des détecteurs dans la gamme de  $10^{-16}$  à  $10^{-20}$  mol.
- ✚ Difficultés de séparer les espèces neutres en ECZ. [23]

### 2.1.4. Applications

- ✚ Analyses d'impuretés et de produits de dégradation dans les matières premières
- ✚ Dosage des composés actifs sur le plan pharmacologique.
- ✚ Identification de nombreuses protéines, lipoprotéines et acides nucléiques. [22]

## 2.2. Chromatographie micellaire électrocinétique capillaire : « MEKC »

### 2.2.1. Principe



**Figure 5 : Principe de séparation des molécules en chromatographie micellaire électrocinétique capillaire (MEKC).**

Cercles bistres : molécules à séparer et interagissant plus ou moins avec la micelle. Double flèche : mouvement des molécules à séparer entre la micelle et le solvant.

Un tensio-actif ionique est ajouté dans le tampon à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique. Il en résulte la formation de micelles possédant un cœur hydrophobe et une surface chargée. Dans le cas

d'un tensio-actif anionique tel que le sodium dodécyl sulfate, ces micelles possèdent une mobilité électrophorétique propre ( $\mu_{ep}$ ) de sens inverse au FEO et migrent vers la cathode plus lentement que le FEO. Selon leur degré d'hydrophobicité et donc leur coefficient de partage entre le tampon et les micelles, les molécules de l'échantillon sont transportées plus ou moins vite vers la cathode. Les molécules les plus hydrophiles restent essentiellement dans le tampon et migrent avec le FEO alors que les molécules les plus hydrophobes s'associent aux micelles et sont retenues plus longtemps dans le capillaire.

### **2.2.2. Mode opératoire**

Le sodium dodécyl sulfate (SDS), est un agent tensio-actif anionique couramment utilisé. Les micelles de SDS anioniques sont électrostatiquement attirées vers l'anode. Le FEO transporte la solution en vrac vers l'électrode négative en raison de la charge négative sur la surface interne des capillaires de silice. Mais le FEO est généralement plus fort que la migration électrophorétique des micelles et donc les micelles vont migrer également vers l'électrode négative avec une vitesse retardée. Quand un analyte neutre est injecté dans la solution micellaire, une fraction est incorporée dans la micelle, tandis que la fraction restante de l'analyte migre avec la vitesse électro-osmotique. Par conséquent, les micelles diminuent de manière sélective la migration des solutés neutres avec lesquelles ils interagissent (par un mécanisme de séparation), qui tant à migrer à la même vitesse que le FEO. La séparation dépend de l'équilibre de la répartition individuelle des différents analytes entre la phase micellaire et la phase aqueuse. Par conséquent, les analytes qui ont une plus grande affinité pour les micelles présentent des vitesses de migration plus lente par rapport aux analytes qui sont principalement distribués dans la solution en vrac.[25-27].

### 2.2.3. Avantages et inconvénients

#### ➤ Avantages:

- ✚ La MEKC permet la séparation de composés ioniques et neutres.
- ✚ La MEKC diffère de l'ECZ, car elle utilise une solution ionique micellaire au lieu de la solution de sel simple de tampon.
- ✚ La MEKC est la plus flexible de toutes les techniques de l'EC, offrant la plus grande sélectivité à la plus large gamme de composés et peut être considéré comme la méthode de séparation de choix lors de l'exécution d'analyse de l'EC pour les substances pharmaceutiques. [28,30]

#### ➤ Inconvénients :

- ✚ L'amélioration de la reproductibilité de l'analyse quantitative, y compris le temps de la migration et de la hauteur du pic. [30]

### 2.2.4. Applications

- ✚ La MEKC peut être particulièrement utile pour la détermination de la drogue dans les échantillons ayant une teneur élevée en protéines (échantillons cliniques, fluides biologiques).
- ✚ La MEKC peut être généralement appliqué à une séparation simultanée à partir de mélanges complexes de substances pharmaceutiques ayant des caractéristiques structurales et physico-chimiques très similaires.
- ✚ La MEKC peut être utilisé pour la séparation des impuretés liées à la structure principale du médicament actif.

## 2.3. Electrophorèse capillaire non aqueuse : « NACE »

### 2.3.1. Principe

L'électrophorèse en milieu non aqueux (NACE) est un mode spécifique de l'EC qui consiste à substituer l'eau du BGE par un solvant organique ou mélange de

solvants organiques. En effet les solvants présentant des constantes diélectriques très faibles, tels que le dioxane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane ou le chlorure de méthylène, qui ne sont pas favorables à la solubilisation d'électrolytes, ont été délaissés au profit de solvants dont la constante diélectrique est supérieure à 20. Un certain nombre de composés peu solubles dans l'eau, telles les substances hydrophobes, mérite d'être analysé en milieu organique. Généralement les solvants organiques absorbent plus dans le domaine UV que ne le fait l'eau, ce qui constitue un désavantage certain. C'est d'ailleurs une des raisons pour lesquelles le méthanol et l'acétonitrile sont les solvants les plus utilisés en milieu non aqueux.

### **2.3.2. Mode opératoire**

Le méthanol, l'acétonitrile et leurs mélanges sont les solvants organiques les plus fréquemment utilisés dans la NACE [31]. Les caractéristiques d'acétonitrile tels que la faible viscosité et modérément faible polarité la rendent particulièrement utile. L'acétonitrile a été utilisé dans la séparation des phénols, des alcools et des acides carboxyliques à travers la formation d'hétéro conjugués avec les analytes non dissociés et petits ions inorganiques [33]. Les solutions électrolytiques méthanoliques avec leur relativement faible tension de surface et une forte volatilité ont souvent été utilisés dans spectrométrie de masse à ionisation, et sont les solvants couramment utilisés dans la NACE [34], les solvants avec la fonction amide, les alcools (propanol et le butanol), et les carbonates de propylène ont également été utilisés [35-36]. Les solvants organiques sont aptes, à condition de présenter une constante diélectrique suffisamment élevée, à dissoudre un grand nombre de sels servant d'électrolyte et assurant un courant électrique stable [56].

### 2.3.3. Avantages et inconvénients

#### ➤ Avantages :

- ✚ la facilité qu'elle offre de faire varier la sélectivité en changeant soit la nature du solvant, soit la nature et la concentration de l'électrolyte.
- ✚ L'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux s'affirme comme une technique intéressante pour augmenter l'efficacité, réduire l'adsorption, résoudre des problèmes liés à la solubilité.
- ✚ L'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux se prête particulièrement bien à l'étude du devenir des médicaments et de leurs métabolites, comme l'attestent différents.

#### ➤ Inconvénients :

- ✚ l'injection doit être adaptée en fonction de la viscosité du solvant ou du mélange de solvants employés requiert la connaissance ou la détermination de cette dernière.
- ✚ De plus, certains solvants organiques, comme l'ACN, dissolvent la couche protectrice de polyimide du capillaire, ce qui a pour effet de réduire significativement le nombre d'analyses.
- ✚ les valeurs de cut-off UV élevées de la plupart des solvants organiques limitent le choix de la longueur d'onde optimale et donc diminuent la sensibilité de la méthode dans le cadre de détecteurs UV ou DAD [25-27].

### 2.3.4. Applications

- ✚ Elle permet en outre une meilleure solubilisation des composés peu polaires ou très peu solubles dans l'eau.
- ✚ Elle est une alternative pour l'analyse des composés sensibles à l'eau tels que des colorants cationiques [48].

- ✚ l'utilisation du déplacement des pKa qui permet par exemple de conférer une charge à des bases très faibles qui sont difficilement protonables en milieu aqueux.

## **2.4. Chromatographie électrocinétique en microémulsion (MEEKC)**

### **2.4.1. Principe**

La Chromatographie Electrocinétique en Microémulsion (MEEKC) est un mode spécial de l'électrophorèse capillaire en utilisant une microémulsion comme support électrolyte. Les Analytes peuvent se répartir entre la phase aqueuse de la microémulsion et de ses gouttelettes d'huile qui agissent comme une phase pseudo-stationnaire.[43]. Le mode de séparation est semblable à celui impliqué dans MEKC où les monomères tensio - actifs ioniques se regroupent pour former des micelles et des solutés interagissent avec les micelles pour réaliser la séparation [42].

### **2.4.2. Mode opératoire**

Le sodium dodécylsulfate (SDS) est couramment utilisé comme agent tensio-actif pour la stabilisation des gouttelettes de micro-émulsion . A l'interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse, la chaîne dodécyle est orientée vers l'intérieur de la goutte d'huile, alors que le groupe sulfate chargé négativement est orienté vers la phase aqueuse. Le Co-surfactant tel que le n-butanol permet également de fixer à la surface des gouttelettes d'huile avec le groupe butyle vers la phase huileuse et le groupe alcool vers la phase aqueuse. En présence de l'agent tensio-actif anionique, les gouttelettes d'huile vont acquérir un pôle négatif chargé et présenteront une mobilité électrophorétique dans le sens de l'anode. La phase aqueuse est généralement tamponnée à un pH alcalin. Dans des capillaires en silice fondue, des tampons alcalins génèrent un flux électro-osmotique (FEO) vers la cathode. Sous l'influence du pH suffisamment élevé, l'amplitude du FEO est supérieure à la mobilité électrophorétique des

gouttelettes d'huile (qui est dirigée contre le flux électro-osmotique). Par conséquent, le FEO va balayer les gouttelettes d'huile à la cathode. La mobilité apparente des gouttelettes d'huile est dirigée vers la cathode et a une amplitude qui est inférieure à celle du flux électro-osmotique [43].

### 2.4.3. Avantages et inconvénients

La MEEKC fournit une fenêtre de séparation plus importante entraîne une plus grande capacité de séparation des composés insolubles dans de l'eau.

La MEEKC offre la possibilité de résoudre des mélanges complexes de solutés ayant de très larges gammes de polarité et de solubilité [44].

### 2.4.4. Applications

✚ MEEKC permet la séparation des vitamines, des produits agrochimiques, des hydrocarbures polycycliques, des produits naturels dérivés des sucres, des acides aminés transformés en dérivés, les protéines, les acides gras, les nucléosides, et des composés chiraux .

MEEKC est aussi utilisée pour la séparation et la détermination composants majeurs de la nourriture tels que [45-46] les colorants, les conservateurs [47], et des filtres UV dans les lotions solaires [48-49] ainsi que les acides amers de houblon utilisés pour la fabrication de la bière [50].

✚ MEEKC a souvent été employé comme un simple outil pour l'évaluation de l'hydrophobie : (Exprimé en tant que coefficient de partage octanol-eau  $P_o / w$ ) [51-52].

MEEKC a été développé pour la détermination simultanée de la metformine, le gliclazide et le glibenclamide, trois antidiabétiques oraux fréquemment utilisés[53].

**DEUXIEME PARTIE :**  
**TRAVAIL EXPÉRIMENTAL**

## **1. OBJECTIFS**

### **1.1. Objectif général**

Il consiste à développer une méthode rapide d'analyse chimique de médicaments à base de nifédipine par électrophorèse capillaire.

### **1.2. Objectifs spécifiques**

Nous nous sommes fixés comme objectifs de :

- ❖ Déterminer le mode d'électrophorèse capillaire de zone adapté.
- ❖ Faire le bon choix du solvant et du tampon.
- ❖ S'assurer de la répétabilité des analyses.

## **2. CADRE DE L'ETUDE ET METHODOLOGIE**

### **2.1. Cadre et durée de l'étude**

Notre étude a été effectuée au laboratoire de Chimie Analytique et de Bromatologie (LCAB) de la faculté de Médecine, de pharmacie et d'odontologie de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal).

Elle s'est déroulée du 02 Mai au 30 Octobre 2016.

### **2.2. Méthodologie**

#### **2.2.1. Appareil d'électrophorèse capillaire**

L'appareil se présente comme suit :

- **CAROUSSEL MANUEL** : changement de flacons d'un simple geste.
- **DETECTEURS**: UV/VIS mono-longueur d'onde ajustable par pas de 1nm, fluorescence induite par LED, ou conductivité sans contact.
- **INTERFACE TACTILE**: Prise en main de l'appareil en 5 minutes.
- **TIROIR DE RANGEMENT**: permet de garder à portée de main tous les accessoires et les consommables.

- **SECURITE** : Opérations sécurisées grâce à une coupure automatique de la haute tension lors de l'ouverture de la porte.
- **HAUTE TENSION** : Le standard le plus élevé, haute tension réversible +/- 30 kV
- **REGULATION THERMIQUE** : température de la cassette du capillaire régulée par Peltier
- **LOGICIEL D'ACQUISITION CLARITY:**
  - Enregistre les signaux du détecteur et du courant
  - Multilingue (Anglais, Espagnol, Chinois, Russe, Français, Allemand)
  - Gestion Multiutilisateurs
  - Calcul automatique du bruit de fond
  - Intégration & étalonnage
  - Import (.AIA, .TXT, .EZ) et Export (.AIA, .TXT, .CHR, .XLS, .PDF)
  - Rapport prédéfini ou personnalisable

## Tableau I : Manuel de fonctionnement de l'appareil d'électrophorèse capillaire

Système manuel d'électrophorèse capillaire Wyn-CE	
<b><i>Injection</i></b>	Injection Hydrodynamique sous vide côté cathode. Ajustable de 0 à 400 mbar. Réglages d'usine à 50 mbar. Injection électrocinétique +/- 20 kV avec une rampe possible de 1kv/sec. Injection possible de 0 à 99 secondes.
<b><i>Pression pour conditionnement</i></b>	Pression de conditionnement sous vide côté cathode à 850 mbar. Conditionnement possible de 0 à 99 min.
<b><i>Tension / Courant</i></b>	+/- 30 kV avec inversion de polarité automatique / -256 µA à +256 µA.
<b><i>Carrousel manuel</i></b>	1 carrousel avec 16 positions, flacons 1,5 mL à l'anode/côté injection et 1 un flacon cathode fixe de 16 mL / côté detection.
<b><i>Volumes échantillons et tampons</i></b>	Minimum 10 µL (flacons avec insert) côté anode. 10 mL pour le flacon fixe côté cathode.
<b><i>Régulation de Température du capillaire</i></b>	Cassette du capillaire régulée par Peltier. 15°C à 50°C par pas de 1 °C. Stabilité de température 0,1 °C.
<b><i>Longueur de capillaire</i></b>	Longueur minimum totale 30 cm. Longueur efficace 22 cm.
<b><i>Détecteurs</i></b>	*UV/VIS mono-longueur d'onde ajustable par pas de 1 nm. Gamme de 190-800 nm avec une lampe Deutérium ou Tungstène. *Détecteur par fluorescence induite par LED (480 nm, 450 nm, 530 nm, 640 nm). *Détecteur par Conductimétrie sans Contact (C4D).
<b><i>Détecteur Externe</i></b>	Cassette spécifique pour détection externe (MS, ICP ...).
<b><i>Sécurité</i></b>	Coupure automatique de la Haute Tension lors de l'ouverture de la porte



**Figure 6 : Appareil d'électrophorèse capillaire**

### **2.2.2. Petit matériel**

- Pilon
- Mortier
- Papier aluminium
- Paire de ciseau
- Stylos feutre
- Filtre cartouche de  $0,45\mu\text{m}$
- Réfrigérateur

- Balance de précision Sartorius
- pH-mètre Metler
- Bains à ultrason
- Agitateur
- Lampe à rayons UV de 210, 235, et 352 nm.

### **2.2.3. Verrerie**

- Fioles jaugées de 10, 20, 25, 50, 100, 200 et 250ml
- Béchers
- Sabot de pesée
- Erlenmeyers
- Kit de pipette de 1 à 25ml
- Vial en verre de 1ml
- Pipettes Pasteur

### **2.2.4. Réactifs utilisés**

- Eau ultra-pure ;
- Acide borique  $H_3BO_4$  ;
- Hydroxyde de sodium NaOH ;
- Acide chlorhydrique 37% de qualité ;
- Méthanol (MeOH) de qualité CLHP ;
- butan-1-ol; Octane ;
- Sodium dodécylsulfate (SDS) ;
- Chlorure d'ammonium ( $NH_4Cl$ ) ;
- Acétate d'ammonium ( $CH_3COONH_4$ ) ;
- Acétone ;
- Matière première de Nifédipine
- Comprimés de 100 mg Nifédi-Denk

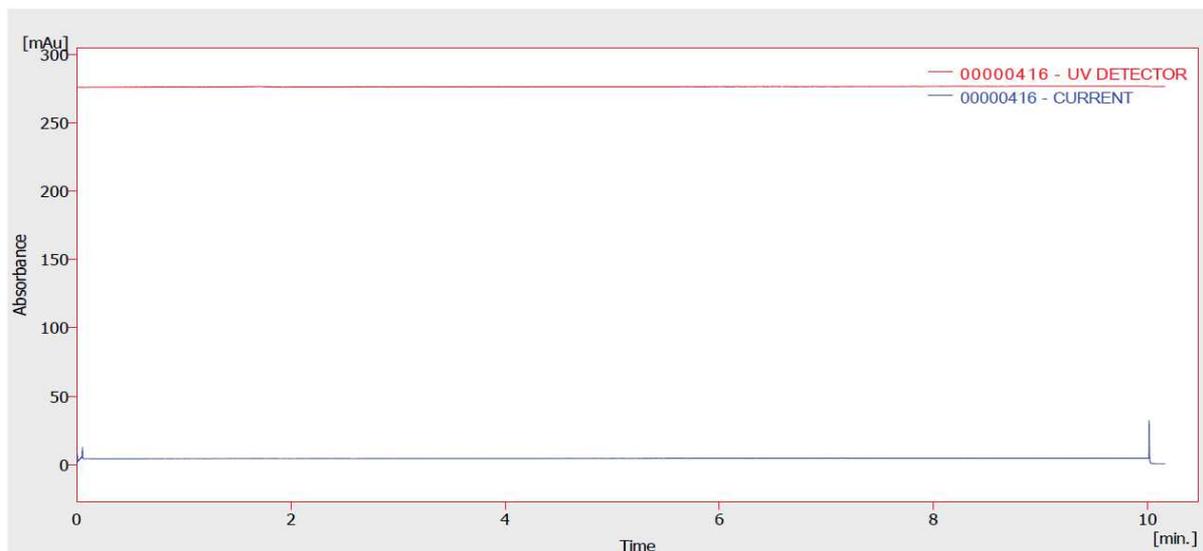
### 3. RESULTATS

La mise au point d'une méthode de développement n'a pas toujours été une chose facile à raison de nombreux paramètres qui peuvent survenir durant les analyses. Notre travail va consister à montrer tous les problèmes liés à cette mise en œuvre tout évoquant les paramètres clés tels que : Le choix du tampon à utiliser, le type de capillaire, Le voltage, le choix du solvant et propriétés physico-chimiques propres à la nifédipine. Nous allons adopter la démarche suivante.

#### 3.1. Electrophorèse capillaire de zone

##### Le tampon borate pH = 9,3

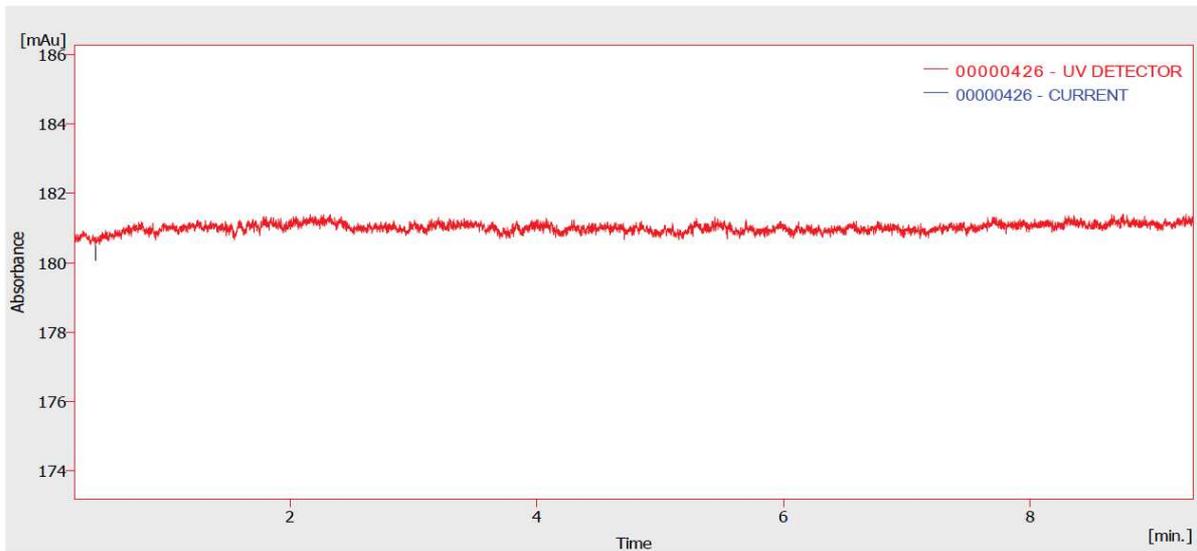
Nous avons fait une préparation (Acide borique + NaOH), de concentration 10 mM. L'injection du tampon seul ou blanc a donné une bonne ligne de base et un courant faible d'intensité variable  $I = 4-5 \mu\text{A}$ . Une deuxième injection a été répétée et a permis d'avoir le même résultat avec une bonne ligne de base et un courant aussi faible .



**Figure 7 : Tampon borate pH=9,3-10mM-injection 1**

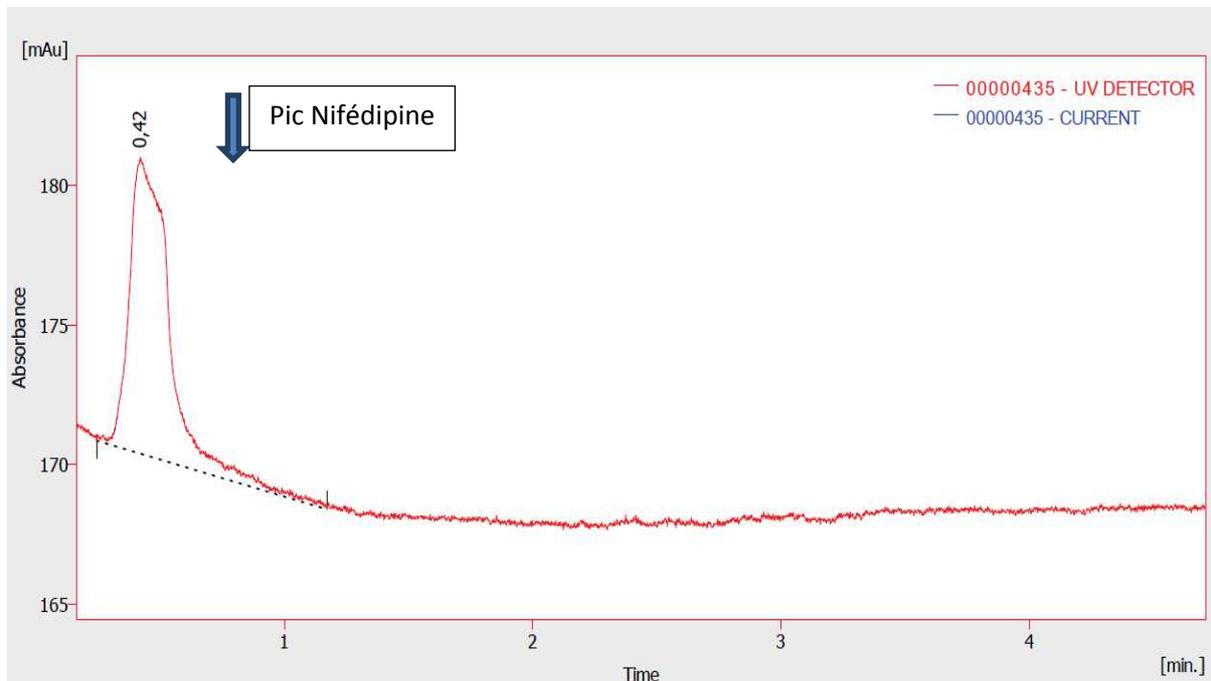
En augmentant la concentration du tampon borate de 10 mM à 50 mM , nous avons obtenu un courant de  $45 \mu\text{A}$  durant les analyses répétées du tampon

seul ou Blanc et aucun pic n'est sorti traduisant ainsi la bonne préparation du tampon Borate.



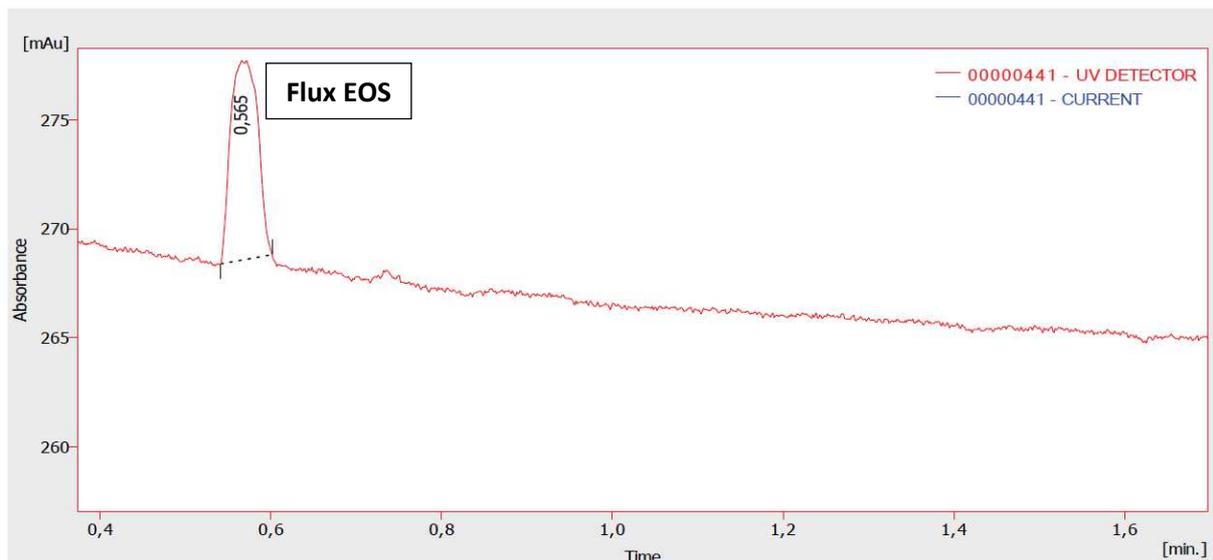
**Figure 8 : Tampon borate pH =9,3-50mM-injection 1.**

Ensuite nous avons préparé la nifédipine de concentration  $C = 20 \text{ mg/ml}$ . Et une fois injectée le pic sortait à 0,42 min en moyenne avec un courant faible aussi de 20– 35  $\mu\text{A}$ . Cependant nous avons fait de nouvelles injections répétées de Nifédipine de concentrations variables ( 50 – 100- 200 ppm ),



**Figure 9 : Nifedipine 2-100 ppm + tampon borate 10mM-100 ppm + Eau 800 ppm, injection 3 + 235 nm**

Nous avons obtenu des pics à chaque fois à des temps relativement courts (< 1 minute). Après avoir refait toutes ces analyses en utilisant 10% Acétone pour marquer le flux, tous ses pics précédemment obtenus se sont révélés être des Flux plutôt que la Nifédipine. Nos analyses ont permis de confirmer cela par plusieurs autres essais.



**Figure 10 : Acétone 10% + tampon borate 10 mM + nifedipine 100 ppm + eau 800 ppm + injection 3 + 235 nm**

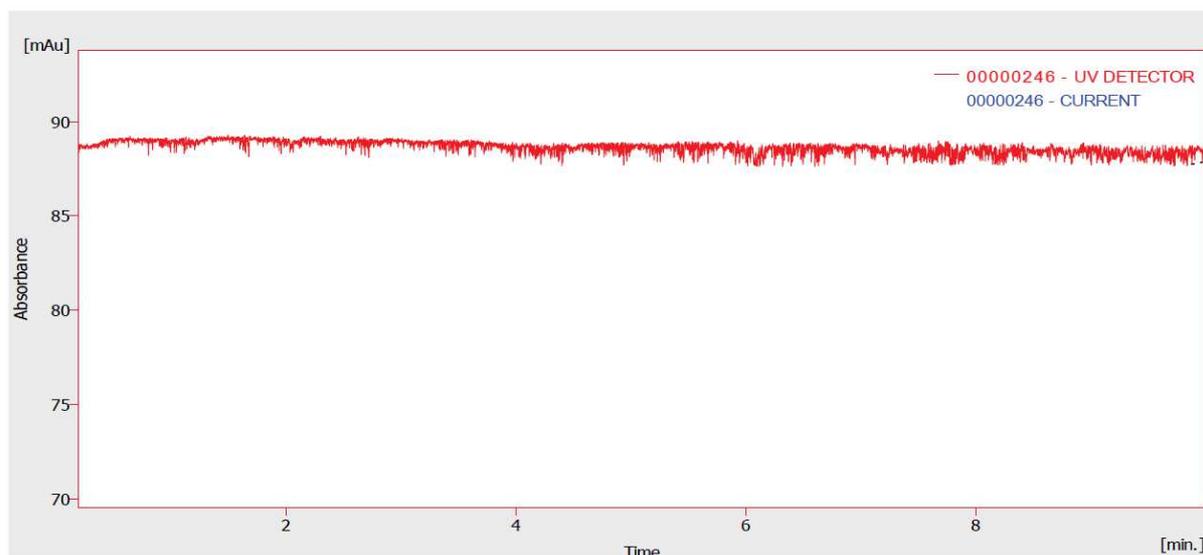
Pour conclure nous pouvons dire que le tampon borate pH = 9,3 à 50 mM présentait une bonne ligne de base et un courant stable  $I = 45 \mu\text{A}$ . Le marquage du flux par l'acétone a permis de montrer qu'en réalité le pic qui sortait ou apparaissait n'était que du flux et par conséquent la nifédipine ne peut être ioniser avec ce tampon borate.

### 3.2. Electrophorèse capillaire non aqueuse : « NACE »

#### ✚ Le tampon chlorure d'ammonium $\text{NH}_4\text{Cl}$ pH = 5,55

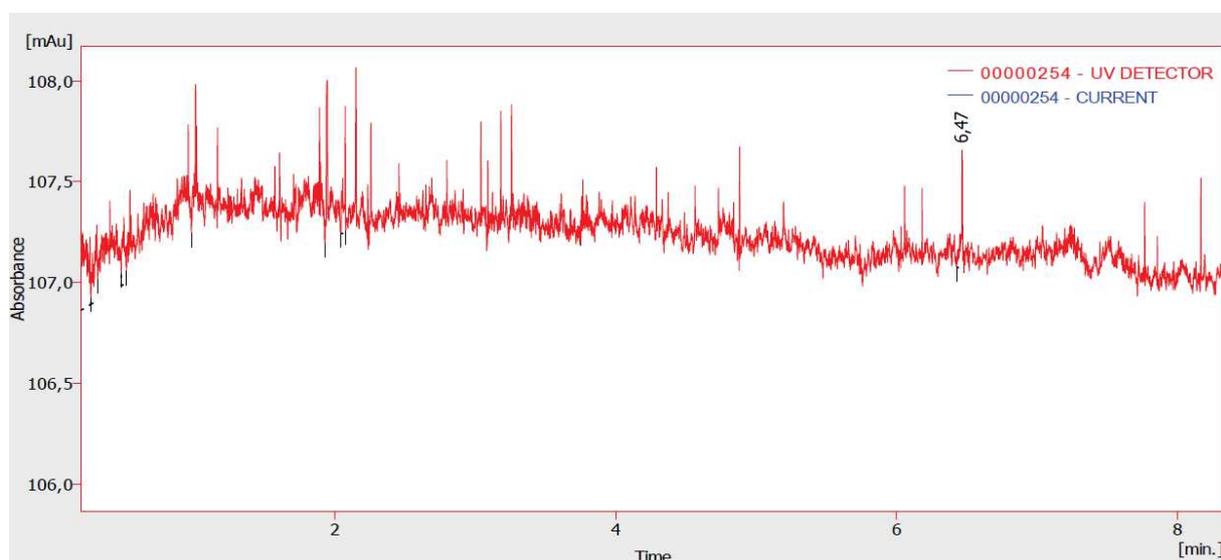
Le choix de ce tampon a été fait de par ces bons résultats dans la littérature au sujet de la « NACE ». En effet les sels d'ammonium sont utilisés dans ce cas pour favoriser la protonation de la nifédipine et son ionisation . En effet le chlorure d'ammonium de concentration 10 mM a été préparé , et injecté . Le

résultat a montré une bonne ligne de base avec un courant à 36  $\mu$ A. Après avoir refait toutes ses injections du tampon  $\text{NH}_4\text{Cl}$  le courant restait autour de 36 – 40  $\mu$ A , aucun pic ne fut détecté dans le tampon.



**Figure 11 : Tampon  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH=5,55 - 10mM-injection 1**

La Nifédipine préalablement dissout dans le méthanol fut ajouté au mélange mais nous n'avons eu aucun pic.



**Figure 12 : Tampon  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10mM – 500  $\mu$ L + 500  $\mu$ L Nifedipine+235 nm**

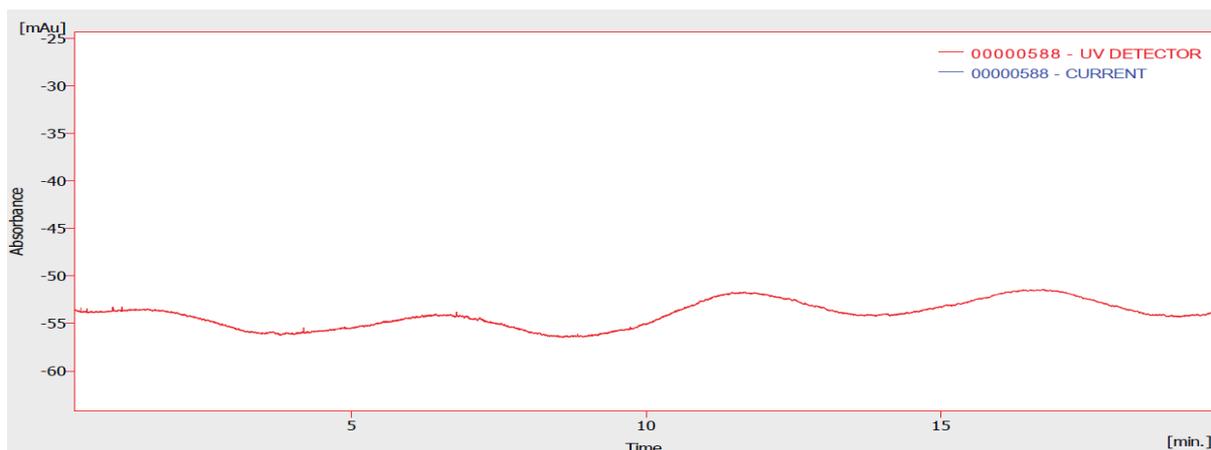
Nous avons fait varier les longueurs d'ondes de 210 nm - 235 nm – 354 nm, mais rien fut obtenu. En augmentant la concentration de 10 mM à 50 mM le courant passa de 36  $\mu$ A à 90 – 99  $\mu$ A. Nous avons aussi allongé le

temps des analyses mais pas de pic de nifédipine. Nous avons décidé de prendre le tampon acétate d'ammonium mais rien fut obtenu.

En guise de résumé pour ces analyses effectuées aussi bien avec la « NACE » et « ECZ », nous avons à chaque fois changé régulièrement les tampons dans les vials, afin de s'assurer que les difficultés rencontrées n'étaient pas dû à la machine. Par ailleurs vu la complexité de la molécule de nifédipine nous avons eu recours à d'autres modes d'électrophorèse capillaire à savoir **La Chromatographie électrocinétique en Microémulsion ( MEEKC ) et la Chromatographie micellaire électrocinétique capillaire : (MEKC) .**

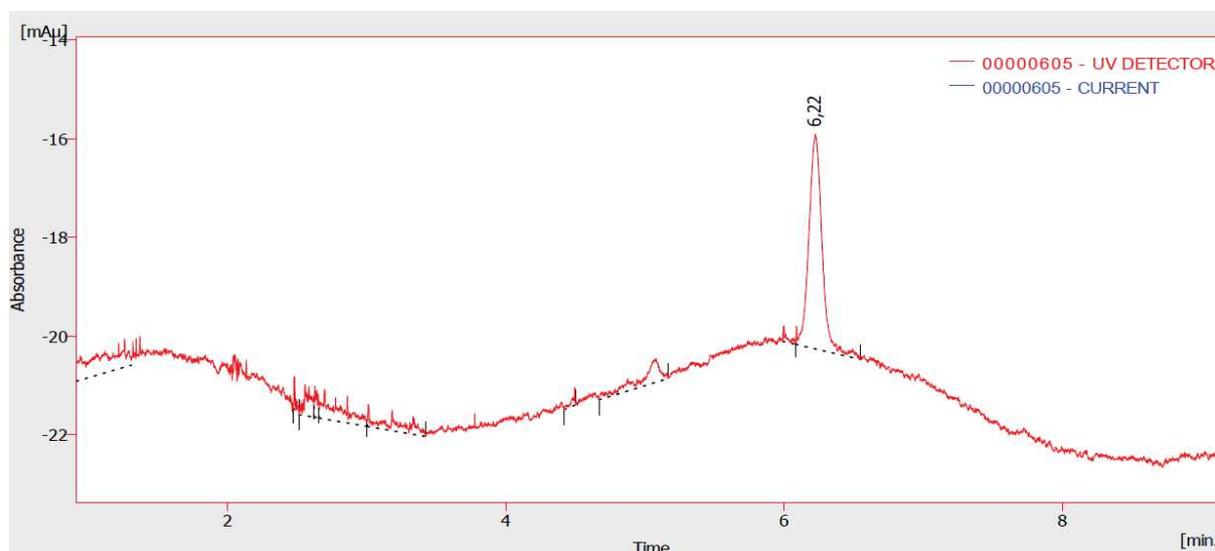
### **3.3. La chromatographie électrocinétique en Microémulsion : « MEEKC »**

Cette méthode est très adaptée pour la séparation des composés ou substances neutres et permet de régler les problèmes liés aux espèces difficilement ionisables. Pour ce faire nous avons eu recours au tampon borate 10 mM 89,51%, pH = 9,2; SDS = 2,33%, Butan-1-ol = 7,34%, Octane = 0,82%. Nous avons fait cette préparation pendant 30 minutes dans un bain ultra-son puis il faut laisser reposer le mélange pendant 30 minutes et filtrer ensuite. Le tampon a été injecté seul et on a eu aucun pic mais une bonne ligne de base avec un courant  $I = 35\mu\text{A}$ . Nous avons répété cela plusieurs fois et obtenus à chaque fois une bonne ligne de base.



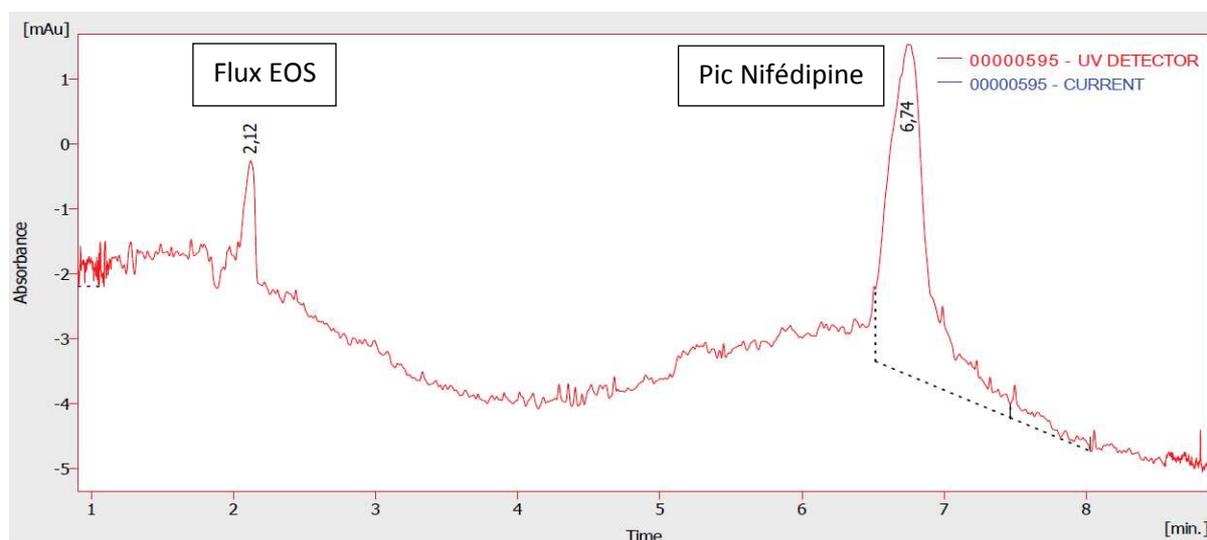
**Figure 13 : Micro-émulsion 3 - SDS +Acétate ammonium 10mM +Butan-1-ol + Octane + injection 3**

Après avoir fait tout cela nous avons préparé la Nifédipine de concentration  $C = 2 \text{ g/L}$  dans du méthanol. Aux cours des analyses nous avons obtenus un pic de Nifédipine à  $t = 6 \text{ min } 22 \text{ s}$ . En poursuivant la troisième analyse nous n'avons obtenu aucun pic, d'où le changement d'électrolyte et tampon dans les vials.



**Figure 14 : Micro-émulsion 4 - Nifédipine 50 uL + SDS +Acétate ammonium 10mM + Butan-1-ol + Octane + injection 5.**

Nous avons ensuite ajouté 10% acétone pour marquer le flux avec de la nifédipine. Nous avons obtenu un flux à  $t = 2 \text{ min } 12 \text{ s}$  et  $t = 6 \text{ min } 74 \text{ s}$ . La longueur d'onde utilisée était de 235 nm pour toutes ses analyses car elle présentait un bon profil par rapport à celles de 210 nm et 352 nm.



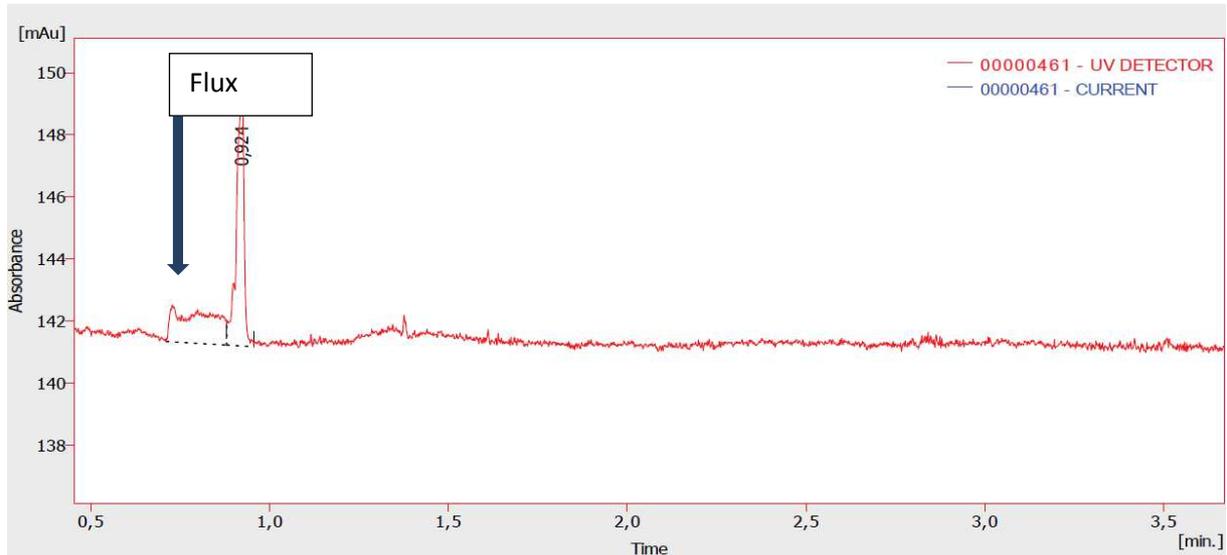
**Figure 15 : Micro-émulsion 3 - Acétone 50uL + Nifédipine 50uL + SDS + Acétate ammonium 10mM + Butan-1-ol + Octane + injection 1- 235 nm.**

Au regard de tout cela nous avons constaté que l'octane était volatile et cela avait eu un impact sur la répétabilité des injections.

### 3.4. Chromatographie micellaire électrocinétique capillaire : (MEKC)

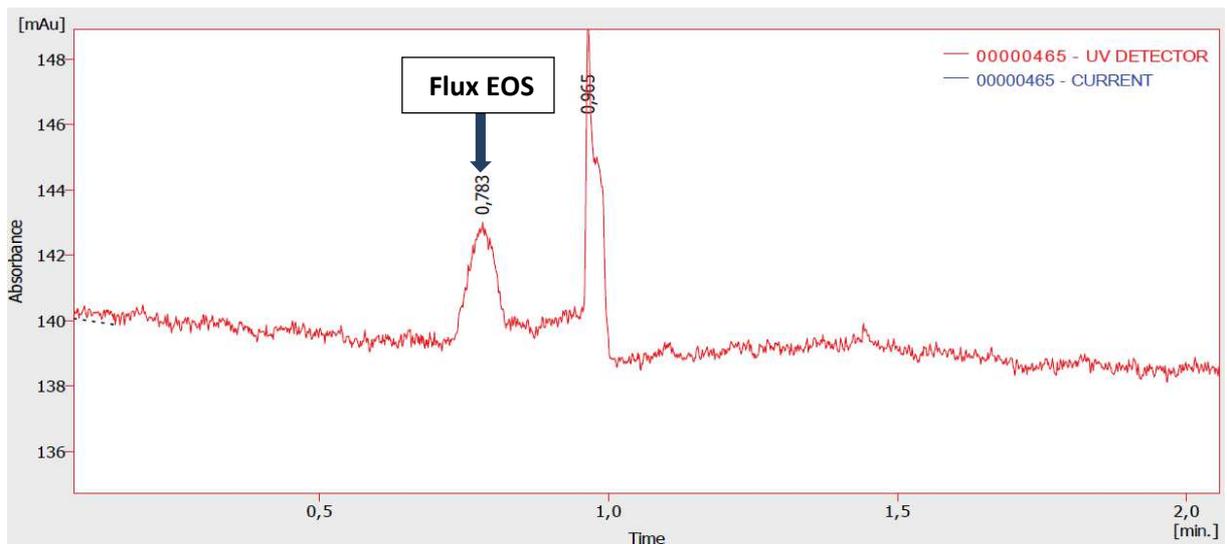
Cette méthode est aussi répandue dans le domaine de l'électrophorèse capillaire mais présente quelques particularités au niveau de sa mise en œuvre qui s'apparente pratiquement à celle de la MEECK. Le tensioactif utilisé ici est le SDS où l'électrolyte doit pénétrer à la surface de micelles. Par ailleurs il faut tenir compte de la concentration micellaire critique « CMC », pour pouvoir réaliser les micelles. Ainsi les solvants utilisés étaient le SDS (2,33 %), tampon borate 10 mM pH = 9,3 (89,51%) tout en respectant la « CMC » du SDS étant de 8 mM, nous avons travaillé avec  $C = 81,61 \text{ mM}$  et après avoir fait tout cela nous avons préparé tampon borate + SDS pendant 15 minutes puis ajouter le n-butanol et enfin le n-octane. L'ensemble était

sous ultra – son pendant 30 minutes puis nous avons laissé reposer 30 minutes et filtré ensuite le mélange obtenu. Le blanc seul a été injecté, et le courant était bon soit  $I = 60 \mu\text{A}$  , avec une bonne ligne de base mais le flux sortait avec le pic.



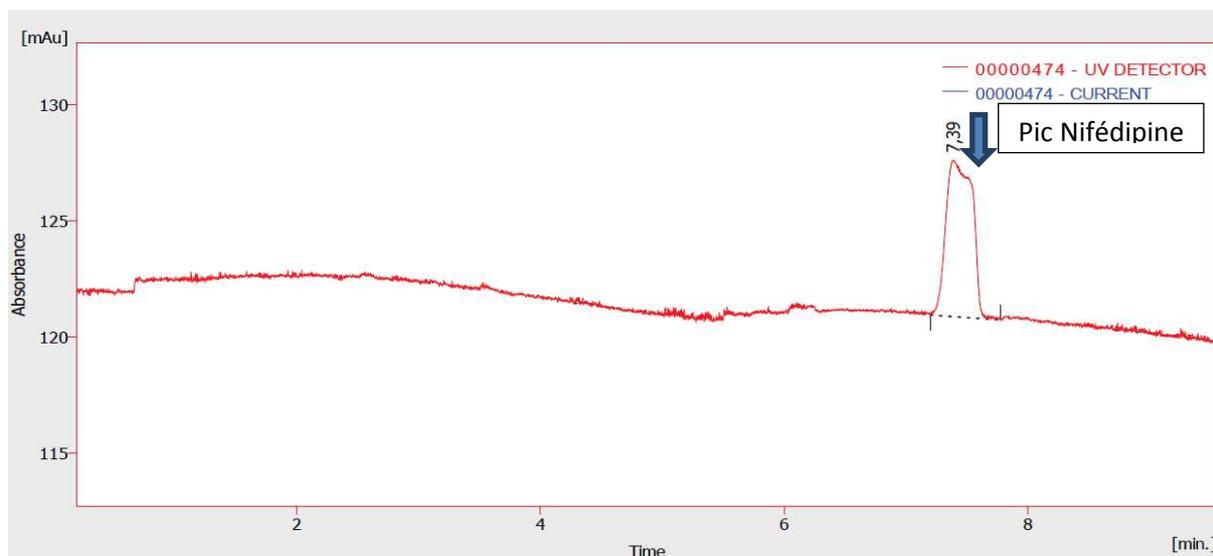
**Figure 16 : Micelle + SDS + tampon borate pH = 9,2+ 235 nm+ injection 3**

Nous avons répété cela et la ligne de base demeurait bien mais à chaque fois le flux sortait avec le pic . Nous avons marqué ce flux par l’ajout de 10% Acétone.



**Figure 17 : Micelle +Acétone + SDS + tampon borate pH = 9,2 + 235 nm+ injection 7**

Ces résultats nous ont montré qu'en réalité le flux était important avec l'ajout de l'acétone 10% et sortait en même tant à partir de 0,783 min et de manière significative. Nous avons décidé de faire de nouvelles analyses mais elles toutes donnaient à chaque fois le flux . Nous avons décidé de préparé la Nifédipine dans du méthanol C=2g/L avec ce tampon Borate + SDS. Les résultats étaient le suivant :



**Figure 18 : Micelle 2 +Nifedipine 100 uL+ SDS + tampon borate pH = 9,2+ 235 nm+ injection 1**

La figure ci-dessus montre un pic de la Nifédipine au bout de 7 min 39 s. Toutefois la répétition de ces analyses ne nous a pas permis d'obtenir des mêmes résultats et nous avons conclu que dans notre préparation l'Octane se volatilisait durant les analyses d'où le problème de répétabilité.

#### 4. COMMENTAIRES

La nature neutre de certains des antagonistes du calcium étudiés rend nécessaire le développement d'une méthode chromatographique électrocinétique micellaire pour leur séparation. La MEKC nécessite l'addition d'agents tensioactifs chargés, formant des micelles, à l'électrolyte de fond à un niveau supérieur à sa concentration micellaire critique. Les micelles formées ont leur propre mobilité électrophorétique qui est différente de la phase aqueuse environnante. Les analytes peuvent se partitionner de manière différentielle entre les phases micellaire et aqueuse en fonction de leur polarité, favorisant ainsi la sélectivité. Par conséquent, l'ordre de migration peut être un moyen de prédire la polarité des composés. Le noyau hydrophobe des micelles fournit des sites de solubilité de composés non polaires insolubles dans des milieux aqueux [55]. C'est le cas de la nifédipine, de la nimodipine, felodipine et lacidipine, qui sont insolubles dans les milieux aqueux en raison de leur nature neutre dans toute la gamme de pH. Toutefois, nous pouvons dire que dans nos travaux quatre paramètres clés ont joué sur la sortie du pic de Nifédipine au bout de 7 min 39 s à savoir : le tampon borate pH=9.3, le méthanol et le SDS 80 mM, le voltage 20 kV. En effet dans la littérature le pH du tampon borate était de 8.2 car celui-ci donnait une bonne allure du pic et quand ce pH était de 7.6, le pic était plus petit. Nous avons eu aussi à utiliser de l'acétonitrile (15%) comme surfactant, mais ce dernier avait tendance à détruire le capillaire de par son action sur ce revêtement et pourtant dans la même littérature il présentait de bons résultats. Et pour finir l'ajout du SDS 80 mM a permis de former des micelles, et plus sa concentration diminuait de l'ordre de 40 mM, 30 mM, et 20 mM, le temps de sorti de la molécule était 7 min 30 s. En définitive les conditions requises pour le contrôle qualité de la nifédipine par la MEKC sont les suivantes : un bon courant 25 kV, un tampon borate pH=8.2, un agent tensio-actif (SDS= 20 mM) dont la concentration est supérieure à sa CMC (SDS = 8mM), une longueur d'onde de

236nm et le temps d'injection de 4 s. Par ailleurs d'autres facteurs externes tels que la température, et les chutes de courant sont à relever.

# CONCLUSION

L'électrophorèse capillaire de Zone est maintenant une technique analytique en pleine expansion. De nouveaux perfectionnements et de nouvelles applications sont régulièrement publiés à la fois en analyse qualitative et quantitative. L'électrophorèse capillaire (EC) a confirmé son appartenance à la famille des techniques séparatives hautement résolutive. Elle regroupe de nombreux avantages, notamment en termes de simplicité, d'efficacité et de coût d'analyse. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à quatre modes d'électrophorèse capillaire à savoir ECZ, NACE, MEEKC, et MEKC pour faire la mise au point d'une méthode de développement et d'analyse de la nifédipine. Notre première approche fut l'utilisation de l'électrophorèse capillaire de zone qui a recours à l'eau comme solvant de référence pour solubiliser la nifédipine et le tampon borate pH=9,3 pour favoriser l'ionisation de la nifédipine de par ses propriétés physico-chimiques. Les résultats obtenus avec ce mode étaient mauvais car nous n'avons pas eu de pic de nifédipine parce que cette dernière ne s'ionisait pas en milieu basique malgré ses deux valeurs de pKa : 3,93 et 5,33. Nous avons alors décidé de travailler en milieu acide avec les tampons phosphates et acétate pH = 6,8 mais le pic ne sortait pas malgré ce changement. Toutefois les injections de ces tampons seuls présentaient un bon courant, et de bonnes lignes de base au niveau des tracés électrophorétiques. Ce mode d'ECZ n'ayant pas abouti à un résultat, nous sommes passés à la NACE.

La NACE a pour particularité de ne pas utiliser de l'eau comme solvant mais plutôt des solvants organiques. La nifédipine étant soluble dans du méthanol de par ses propriétés physico-chimiques (26 g/l), le tampon utilisé était le chlorure d'ammonium à pH = 5,55. En effet cette dernière a aussi donné de mauvais résultats de par l'absence de pic de nifédipine mais avec au passage une meilleure ligne de base du tampon NH<sub>4</sub>Cl et un bon courant d'analyse de 90 µA. Une fois de plus la nifédipine ne s'ionisait pas. Au regard de ces multiples tentatives nous avons eu recours à une troisième approche avec la MEEKC.

Ce mode d'électrophorèse a pour particularité de s'adapter aux molécules neutres et difficilement ionisables. La nifédipine a été solubilisée dans du méthanol et le tampon utilisé était constitué de la manière suivante : tampon borate 10 mM (89,51%) à pH=9,2, SDS (2,33%), du butan-1-ol (7,34%) et de l'octane (0,82%). Cette préparation a permis d'ioniser la nifédipine et d'obtenir un pic de cette dernière au bout de 6 min 22s comme le montre la figure 14. Cela a été confirmé en utilisant de l'acétone comme marqueur de flux qui sortait au bout de 2 min 12 s. Cependant la répétabilité de ces analyses au bout de deux injections et le problème de stabilité de ces micro-émulsions ne nous ont pas permis de poursuivre avec ce mode d'électrophorèse. De plus nous avons constaté que l'octane avait tendance à se volatiliser durant les analyses d'où l'absence de pic au bout de d'autres analyses. Tout cela nous a conduit à une quatrième et dernière approche à savoir la MEKC.

La particularité de la MEKC par rapport aux autres modes est d'abord l'absence de co-surfactant comme le butan-1-ol, et l'octane qui sont présents dans la MEEKC. De plus ici le tampon utilisé pour l'ionisation de la nifédipine est constitué du SDS + tampon borate 10 mM, et la nifédipine est solubilisée dans du méthanol. De plus 5-15 % d'acétonitrile est nécessaire pour jouer le rôle de co-surfactant. Le pic de nifédipine obtenu était répétable et sortait au bout de 7 min 39 s. La difficulté principale ici était l'action de l'acétonitrile sur le capillaire car cette dernière s'attaquait et détruisait le capillaire. Au regard de toutes ces analyses nous pouvons dire que la nifédipine est une molécule particulière de par sa structure et nécessite davantage de recherches en vue d'une meilleure méthode de développement et de contrôle qualité.

Par ailleurs toutes les difficultés relevés au travers de ces quatre modes d'EC à savoir le choix du solvant, du tampon approprié, la volatilité de l'octane, les variations de la pression au cours des injections et les fluctuations du courant constituent un frein pour la mise au point de développement et de contrôle

qualité des molécules neutres comme la nifédipine par la méthode d'électrophorèse capillaire .De plus de nombreux pays en voie de développement ont recours aux appareils d'ECB pour assurer le contrôle des faux médicaments qui constitue un frein économique pour l'état et surtout la santé des populations. En définitive, nous pouvons dire que tous ces modes utilisés présentent aussi bien des avantages et des inconvénients.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

**[1] BONVIN G.**

Aspects fondamentaux du couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse.

Thèse de doctorat. Université Genève. 2014.

**[2] EDQM.**

Pharmacopée européenne. Propriétés physico chimiques de la nifédipine. 1825 ; 2(8) : 125-156.

**[3] OMS.**

Pharmacopée internationale. Propriétés physico chimiques de la nifédipine. 1996 ; 5(3) : 119.

**[4] Yingqing R, Yan Il, Gang Y, Johnson LH, Yalkowsky H.**

Estimation of aqueous solubility of organic compounds by using the general solubility equation. Chemosphere. 2002; 48: 487-509.

**[5] Oneil MJ.**

An Encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals.

A comprehensive reference work on organic chemistry provides information on thousands of substances and structural formulas. 2001;1129.

**[6] Weber M, Howard CD.**

Effets de la nicardipine à libération prolongée sur la régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche dans l'hypertension systémique.

J american of Cardiology. 1992; 69(19) : 1559-1564.

- [7] **Kates F.**  
Calcium Antagonists. Pharmacokinetic properties.  
Pubmed journals drugs. 1983;25 (2): 113-124.
- [8] **Raemsch G, Sommer A.**  
Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine.  
Hypertension. 1983; 5(2-4): 18-24.
- [9] **Chung M, Reitberg DP, Gaffney M.**  
Pharmacocinétique clinique du système thérapeutique gastro - intestinal  
nifédipine. J american medical. 1987 ;
- [10] **Eranko PO, Palva ES, Konno K.**  
Regulatory control of synonym drug bioavailability: bioinequivalency of  
nifedipine preparations. Pharm med. 1990; 4: 197-205.
- [11] **Kozjek F.**  
Analysis of nifedipine and its pyridine metabolite dehydronifedipine in  
blood and plasma. Review and improved high-performance liquid  
chromatographic. J pharmaceutical and biomedical analysis. 1991; 9 (6):  
475-484.
- [12] **Ahmad M, Ahmad T, Sultan RA, Murtaza G.**  
Pharmacokinetic study of nifedipine in healthy adult male human  
volunteers. J pharmaceutical research. 2009; 18 (5): 18-56.

- [13] **Safak C, Simsek R.**  
Fused 1,4-dihydropyridines comme calcium potentiel Composés modulateurs.  
Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2006; 6 (7): 747-755.
- [14] **Renwick AG, Robertson DR, Macklin B.**  
The pharmacokinetics of oral nifedipine-a population study.  
J British of clinical Pharmacology. 1988; 25 (6): 701-708.
- [15] **Gajendran J, Krämer J.**  
Biowaiver monographs for immediate. Release Solid oral dosage forms nifedipine. J pharmaceutical sciences. 2015; 104 (10): 2890-3298.
- [16] **Cristobal GR, Gonzalez JA.**  
Method development and validation study for quantitative determination of nifedipine and related substances by ultra-high-performance liquid chromatography. Biomedical chromatography. 2015; 29 (2): 233-239.
- [17] **Kleinbloesem CH, Brummelen P, Breimer DD.**  
Nifedipine relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clinik Pharmacokinet. 1987;
- [18] **Gruchy B, George CF.**  
Factors affecting the pharmacokinetics of nifedipine.  
J european clinical pharmacology. 1987; 32 (4) 351–355.

**[19] Foster TS, Hamann SR, Richards VR, Bryant PJ, Graves DA, McAllister RG.**

Nifedipine kinetics and bioavailability after a single oral dose in normal subjects. *J Clinical pharmacology*.2003; 161–170.

**[20] Heiger D.**

An introduction: High performance capillary electrophoresis.

Agilent Technologies Allemagne. 2000 ;

**[21] Rouessac A.**

Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes.

2000 ; 5. 117-129.

**[23] Mendham J.**

Analyse chimique quantitative de Vogel 6.17- 6.16. Applications. 2006 ; 270.

**[24] Juillet Y.** *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Le médicament : Optimisation du bon usage du médicament. 2005 ; 63(2) :119-124.

**[25] James P, Landers.**

Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques. 2007 ; 18(3):739.

**[26] Altria KD, McLean R.**

Développement et optimisation d'une méthode de chromatographie capillaire électrocinétique micellaire générique pour appuyer l'analyse d'une large gamme de produits pharmaceutiques et excipients.

*J pharmaceutical biomed analytical*. 1998; 18 (4-5): 807-1315.

- [27] **Rizvi SA, Do DP, Saleh AM.**  
Fondements de chromatographie électrocinétique micellaire.  
J european chemistry. 2011; 2 (2): 276-281.
- [28] **Kopplin PS.**  
Electrophorèse capillaire - Méthodes et protocoles.  
Totowa. J Humana Press. 2008.
- [29] **Wienen F, Holzgrabe U.**  
A new micellar electrokinetic capillary chromatography method for  
separation of the components of the aminoglycoside antibiotics.  
Electrophoresis. 2003; 24(17): 2948–57.
- [30] **Altria KD.**  
L'analyse des produits pharmaceutiques par capillaire electrophoresis.  
Chromatographia série CE, Friedr.Braunschweig / Wiesbaden: Vieweg &  
Sohn Verlagsgesellschaft mbH. 1998 ; 2(5) : 148-146.
- [31] **Jussila M, Porras SP.**  
Non-aqueous capillary electrophoresis. J Chromatography A. 2000; 892:  
155–170.
- [32] **Chanckvetadze B, Blaschke G.**  
Enantioseparations using capillary electromigration techniques in  
nonaqueous buffers. Electrophoresis. 2000; 21:4159 - 4178.

- [33] **Okada T.**  
Non-aqueous capillary electrophoretic separation of Brønsted acids as heteroconjugated anions.  
J. Chromatography A. 1997; 771:275–284.
- [34] **Riekkola ML.**  
Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis.  
Electrophoresis. 2002, 23: 3865–3883.
- [35] **Palonen S, Jussila M, Porras SP.**  
Nonaqueous capillary electrophoresis with alcoholic background electrolytes. Separation efficiency under high electrical field strengths.  
Electrophoresis. 2002; 23: 393–399.
- [36] **Jordan JM, Moeses RL, Watts RJ.**  
Determination of inorganic sulfate in detergent products by capillary electrophoresis.  
J. Chromatography. A. 1994; 671: 445–451.
- [37] **Qing Y, Kenneth LJ, Naylor S.**  
Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs. on-line-nonaqueous capillary electrophoresis–mass spectrometry.  
J. Biochemical and Biophysical Methods. 1999; 38 (2): 103–121.
- [38] **Wenzhe L, Poon GK, Carmichael PL.**  
Analysis of tamoxifen and its metabolites by on-line capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry employing non aqueous media containing Surfactants.  
Analytical chemistry. 1996; 68 (4): 668–674.

- [39] **Naylor S.**  
Study of in Vivo pyrazoloacridine metabolism by capillary electrophoresis using isotachopheresis preconcentration in non-aqueous separation buffer.  
J separation Science.1993 May; 16(5): 324–326.
- [40] **Tomlinson AJ, Benson LM.**  
Nonaqueous solvents in the on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry analysis of drug metabolites.  
J high resolution chromatography. 1994; 175–177.
- [41] **Wolfgang B.**  
Microemulsion electrokinetic Chromatography. Électrophorèse capillaire.  
Methods in Molecular Biology. 1483; 91-109.
- [42] **Terabe F, Matsubara N, Ishihama Y, Okada Y.**  
Microemulsion electrokinetic chromatography: comparison with micellar electrokinetic chromatography.  
J chromatography A. 1992; 608(1-2): 23-29.
- [43] **Wolfgang W.**  
Microémulsion Electrokinetic Chromatographie.Methods in Molecular Biology. 1996; 384: 717-733.
- [44] **IOANA A, MARINELA F.**  
Microemulsion-based strategy for the capillary electrophoretic analysis of some antidiabetic drugs.  
J romanian biophysical. 2015; 25(3): 173–184.

- [45] **Maria Castro-Puyana, Virginia García-Canas.**  
Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. 2012; 33(1): 147- 167.
- [46] **Eloisa L, Gottardo R, Seri C.**  
Rapid analysis of caffeine in “smart drugs” and “energy drinks” by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC), Forensic Science International. 2012 Juillet 10; 220 (1-3): 279-283.
- [47] **Huang HY, Chuang CL, Chiu.**  
Determination of food colorants by microemulsion electrokinetic chromatography. Electrophoresis. 2005; 26: 867-877.
- [48] **Klampfl CW, Leitner T, Hilder T.**  
Development and optimization of an analytical method for the determination of UV filters in suntan lotions based on microemulsion electrokinetic chromatography Electrophoresis. 2002; 23: 2424–2429.
- [49] **Szucs R, Vindevogel J, Everaert E, De Cooman L, Sandra.**  
Separation and quantification of all main hop acids in different hop cultivars by microemulsion electrokinetic chromatography.  
J. Institute of Brewing. 1994; 100: 293–296.
- [50] **Vanhoenacker G, Rong H, Keukeleire D, Baeyens W, Van Der Weken G, Sandra P.**  
Simultaneous analysis of hop acids and prenylated flavanones by microemulsion electrokinetic chromatography with diode array detection.  
J chromatography A. 2000; 14: 34–36.

**[51] Poole SK, Durham D.**

Rapid method for estimating the octanol-water partition coefficient by microemulsion electrokinetic chromatography.

J Chromatography B.1996; 745: 117–126.

**[52] Jiang X, Xia Z, Deng L, Wei W, Chen J, Xu J, Li H.**

Evaluation of accuracy for the measurement of octanol–water partition coefficient by MEEKC. Chromatographia. 2012; 75: 347–352.

**[53] MARINELA F.**

Metformin, Gliclazide and Glibenclamide Assay by microemulsion electrokinetic chromatography. J.romanian biophysical. 2016; 26 (2): 100–120.

**[54] Martynez V, Lopez JA, Alonso RM, Jimenez RM.**

Micellar electrokinetic chromatography as a fast screening method for the determination of 1, 4-dihydropyridine calcium antagonists.

J chromatography A. 1999; 836 (1999): 189–199.

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art, et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leurs enseignements ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.*

# PERMIS D'IMPRIMER

---

Vu :  
Le Président de Jury

Vu :  
Pour Le Doyen

*Vu et Permis d'imprimer*  
Pour le Recteur, Président de l'Assemblée de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar  
et par délégation

Le Doyen