

La Micro Extraction en Phase Solide (SPME)



Principe de la Méthode SPME

La SPME est une miniaturisation du procédé d'extraction sur phase solide (SPE)

Principe de la Méthode SPME

La SPME est une technique de concentration ne nécessitant pas de solvant et où la préparation de l'échantillon est très souvent limitée à son prélèvement.

Principe de la Méthode SPME

.Elle repose sur la partition des composés d'intérêts entre la matrice de l'échantillon et une phase polymérique spécifique supportée par une fibre en silice.

Principe de la Méthode SPME

.Il s'établit un équilibre thermodynamique entre la quantité d'analytes adsorbée sur la fibre et la quantité présente dans l'échantillon

Sur quoi est basée la Méthode SPME?

Cette méthode de préparation de l'échantillon est basée sur la capacité d'adsorption d'une fibre polymère pour extraire des analytes directement dans la matrice naturelle

Les étapes de la SPME

1^{ère} étape

- Les solutés se concentrent(solubilisent) dans la phase polymérique

Les étapes de la SPME

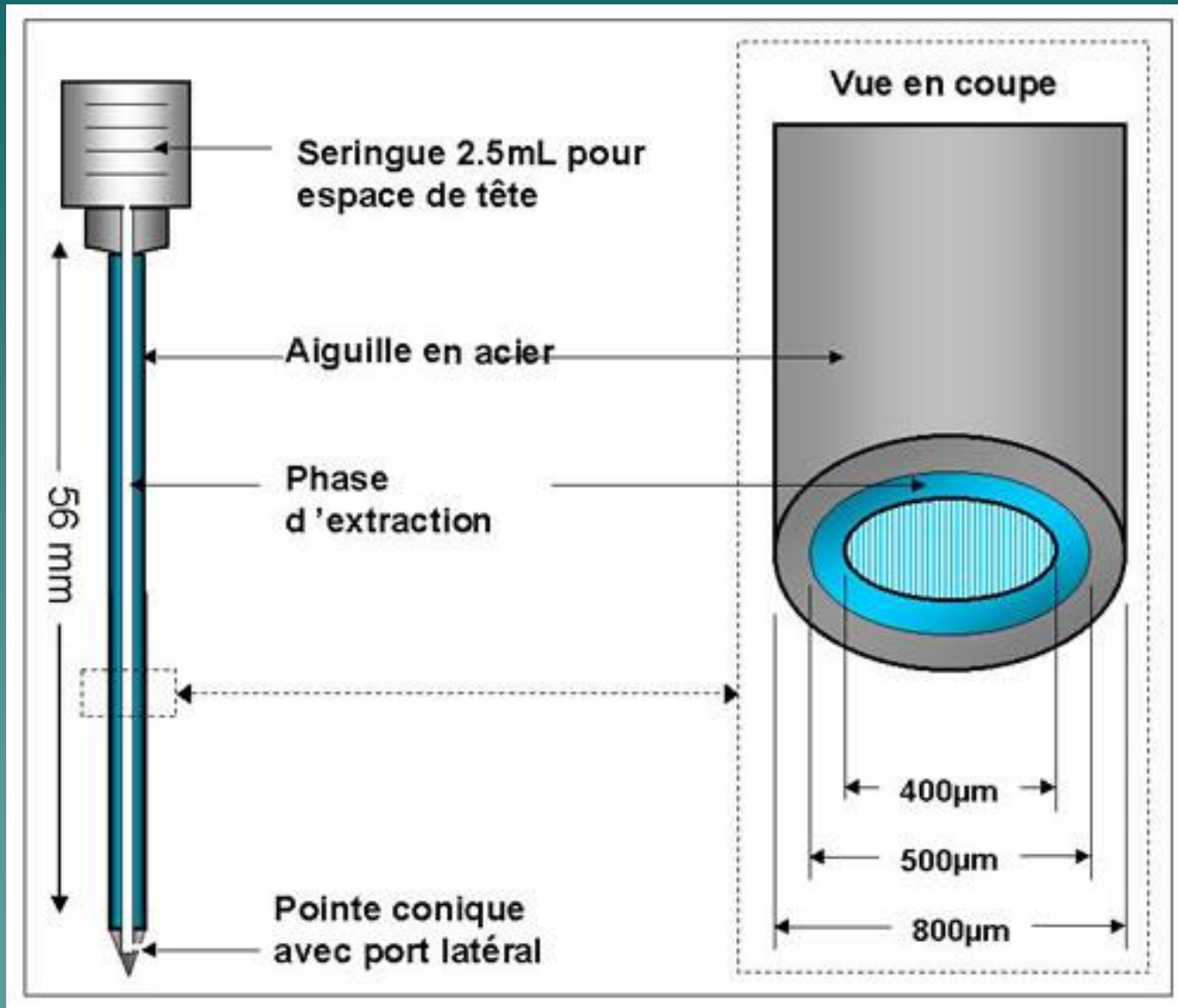
Comment?

La phase solide polymérique enrobant la fibre en verre de silice est protégée dans une aiguille creuse amovible

La fibre est déployée hors de l'aiguille dans le flacon étanche contenant l'échantillon



Les étapes de la SPME



Les étapes de la SPME

Pour les phases polymériques utilisées en extraction SPME, **la quantité d'analyte adsorbé**, après un certain temps d'équilibre, est **directement reliée à la concentration de cet analyte dans l'échantillon par la relation:**

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_S}{K_{fs} V_f + V_S}$$

n = masse d'analyte adsorbé par la fibre

C₀ = concentration de l'analyse dans l'échantillon

K_{fs} = coefficient de partage (ou de répartition) de l'analyte entre la fibre et l'échantillon.

V_f = Volume de la phase (imprégnation de la fibre)

V_S = Volume de l'échantillon

Les étapes de la SPME

Cette équation montre que la relation qui existe entre la concentration initiale de l'analyte dans l'échantillon et celle retenue par le remplissage de la fibre est **linéaire**

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_S}{K_{fs} V_f + V_S}$$

n = masse d'analyte adsorbé par la fibre

C_0 = concentration de l'analyse dans l'échantillon

K_{fs} = coefficient de partage (ou de répartition) de l'analyte entre la fibre et l'échantillon.

V_f = Volume de la phase (imprégnation de la fibre)

V_S = Volume de l'échantillon

Les étapes de la SPME

Les phases matériaux utilisés en extraction SPME sont choisis de sorte à avoir une très grande affinité pour les composés organiques.

La constante K_{fs} des composés à extraire est par conséquent grande et l'analyte à extraire est concentré dans la fibre. D'où un effet de concentration assez grand dans la fibre.

Les valeurs de K_{fs} des composés à extraire ne sont généralement pas assez grands pour les extraire quantitativement.

Cependant, à travers une courbe d'étalonnage, la méthode SPME peut être utilisée pour déterminer quantitativement et correctement les composés d'intérêts dans une matrice.

Les étapes de la SPME

2^{ème} étape

- Consiste en une vaporisation des solutés dissous dans la phase stationnaire à travers l'injecteur CPG
- ou par rinçage par un solvant spécifique dans le cas d'un couplage avec un chromatographe en phase liquide

Les étapes de la SPME

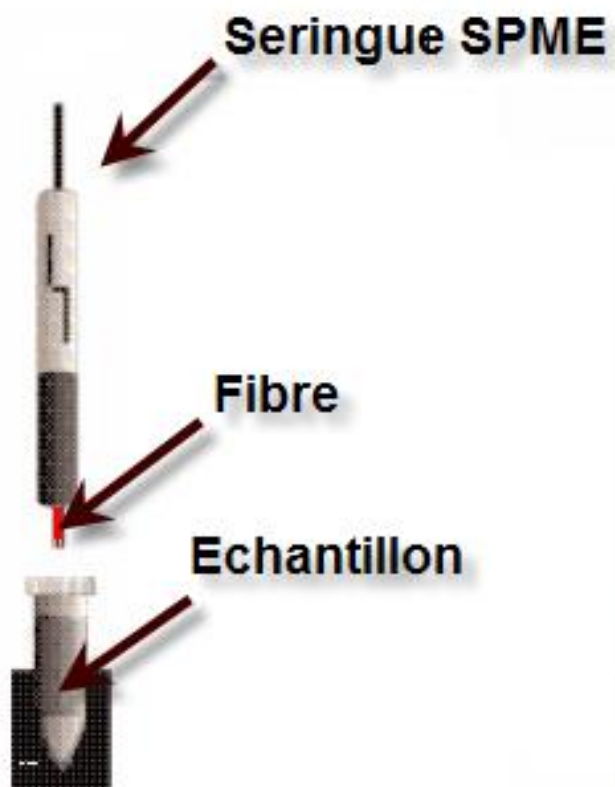
Comment se fait la vaporisation des analytes cibles, dans le cas d'un couplage SPME/ CPG?

La fibre en silice recouverte du film polymère et protégée dans l'aiguille est plongée dans un injecteur CPG chauffé.

Une fois dans l'injecteur, la fibre est déployée hors de l'aiguille amovible protectrice.

Les solutés dissous sont alors rapidement vaporisés et transférés vers la colonne CPG

PROCEDURE D'EXTRACTION PAR SPME



Echantillon et seringue
SPME aiguille de la
seringue relevée



Introduction de l'aiguille
dans l'échantillon pendant
un temps déterminé



Aiguille de la seringue
relevée Injection des
solutés en
chromatographie

Les modes de dissolution sur la fibre SPME

En fonction de la tension de vapeur des composés cibles, la dissolution sur la fibre SPME peut être conduite soit en:

Mode espace de tête (Head Space)

Mode d'immersion (extraction directe)

Les modes d'adsorption sur la fibre SPME

Mode espace de tête (Head Space)

La fibre dissous les analytes d'intérêts dans la phase gazeuse située au dessus de la matrice

L'échantillon, contenu dans un flacon fermé, doit être chauffé au préalable.

Ce mode d'adsorption est privilégié pour les **composés volatils ou semi volatils**

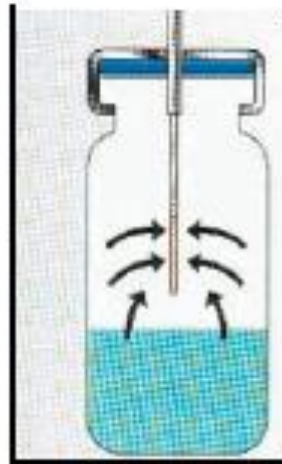


Figure n°1 : Modes de mise en oeuvre de la SPME Espace de tête

Les modes d'adsorption sur la fibre SPME

Mode d'immersion

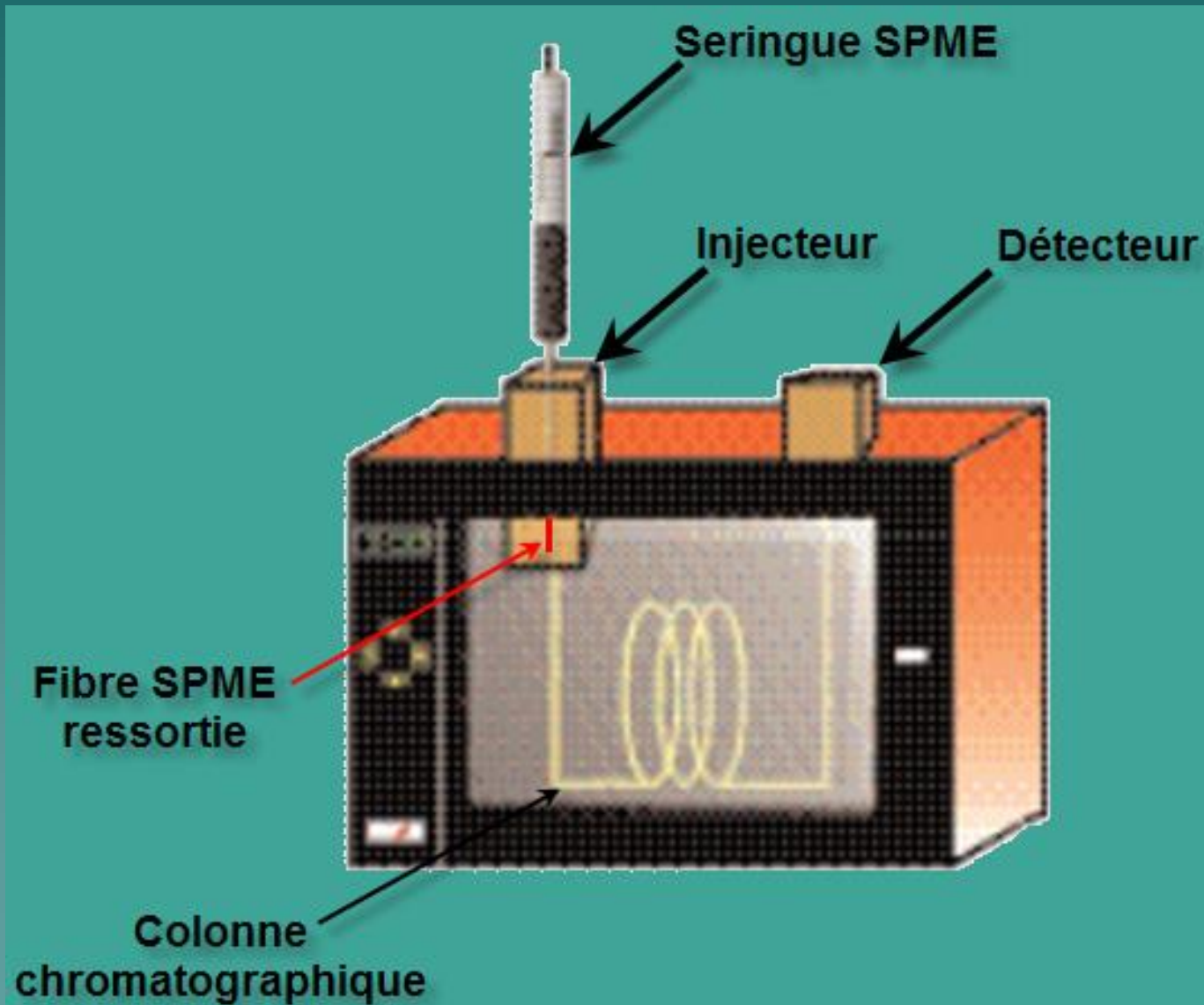
La fibre est plongée dans la matrice à analyser

Dans ce mode de dissolution, une agitation par ultra son pour atteindre l'équilibre est recommandée avant l'extraction directe



Figure n°1 : Modes de mise en oeuvre de la SPME Immersion directe

INTRODUCTION DE LA FIBRE DANS LE CHROMATOGRAPHE



La Fibre SPME

Elle est enduite d'un liquide (polymère), d'un solide (sorbant), ou d'une combinaison de tous les deux.

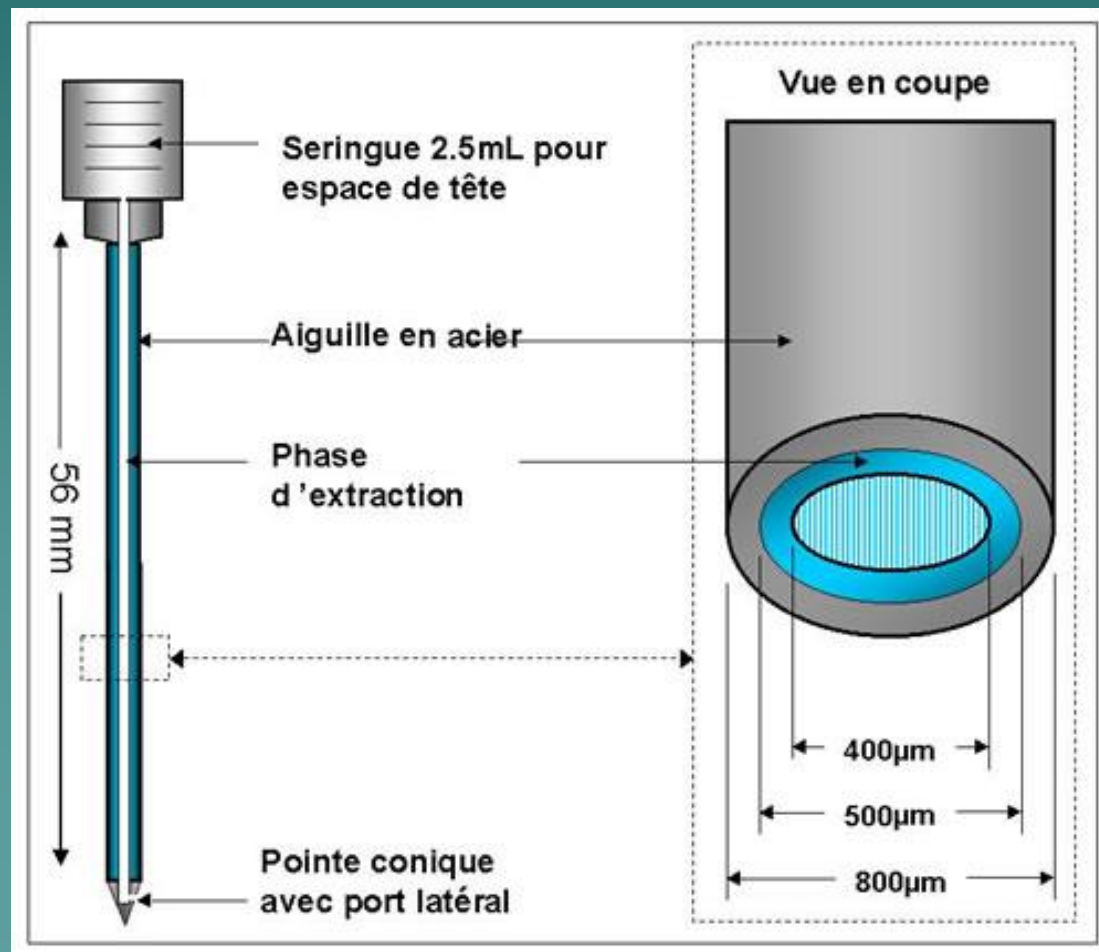


Illustration de l'extraction et de la désorption par SPME

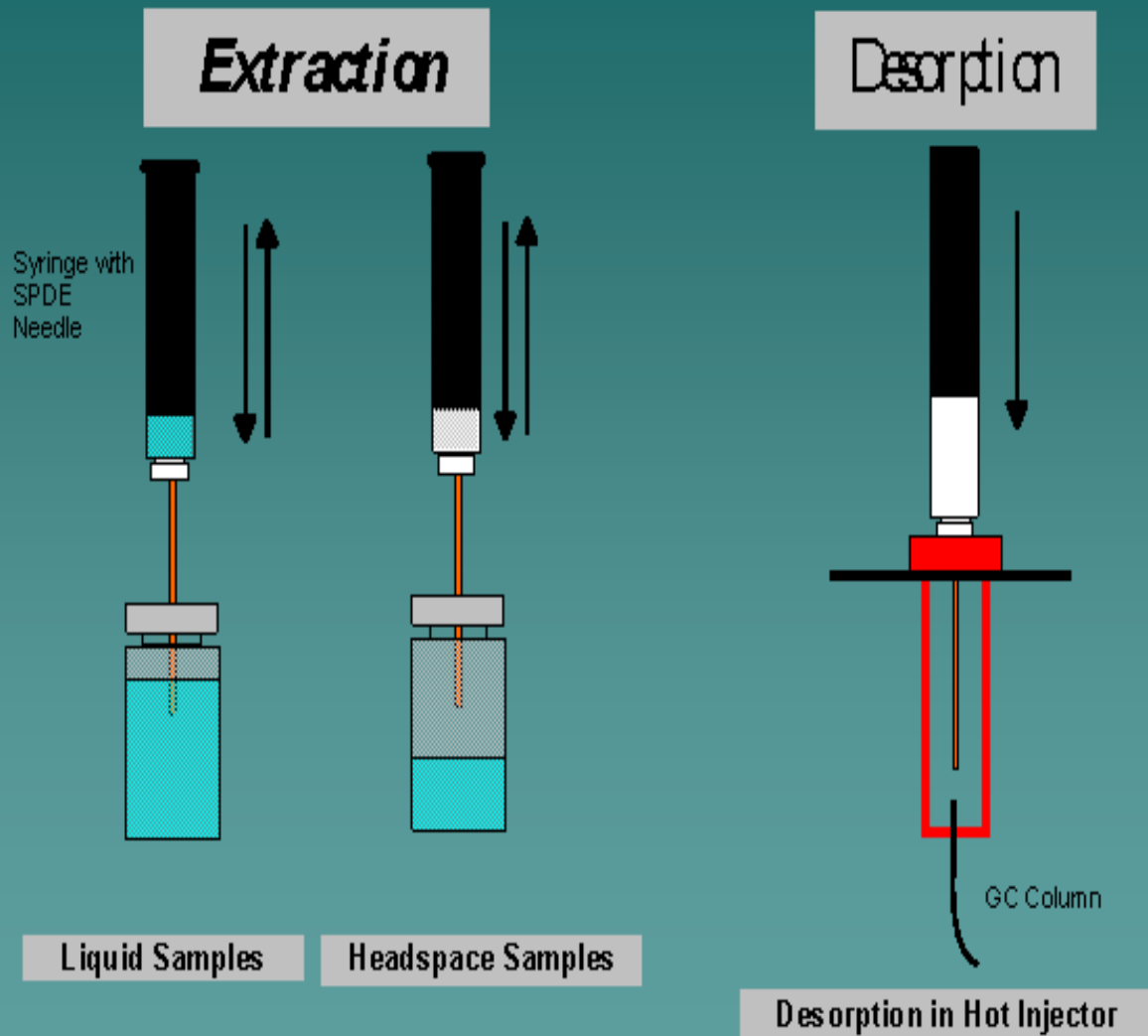
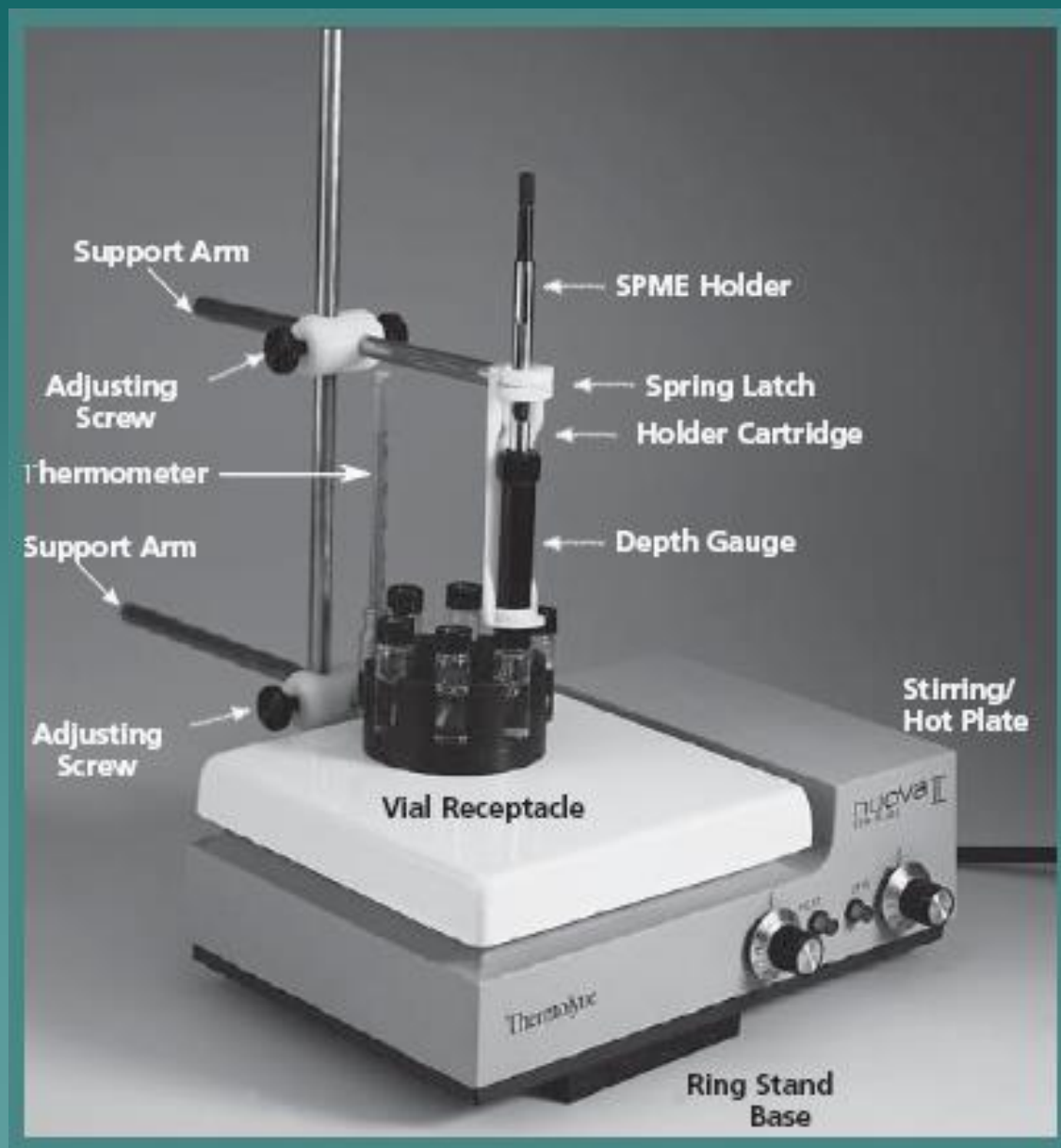


Illustration de l'extraction par SPME



Les étapes de la SPME

Comment se fait la dissolution des analytes cibles, dans le cas d'un SPME/ HPLC?

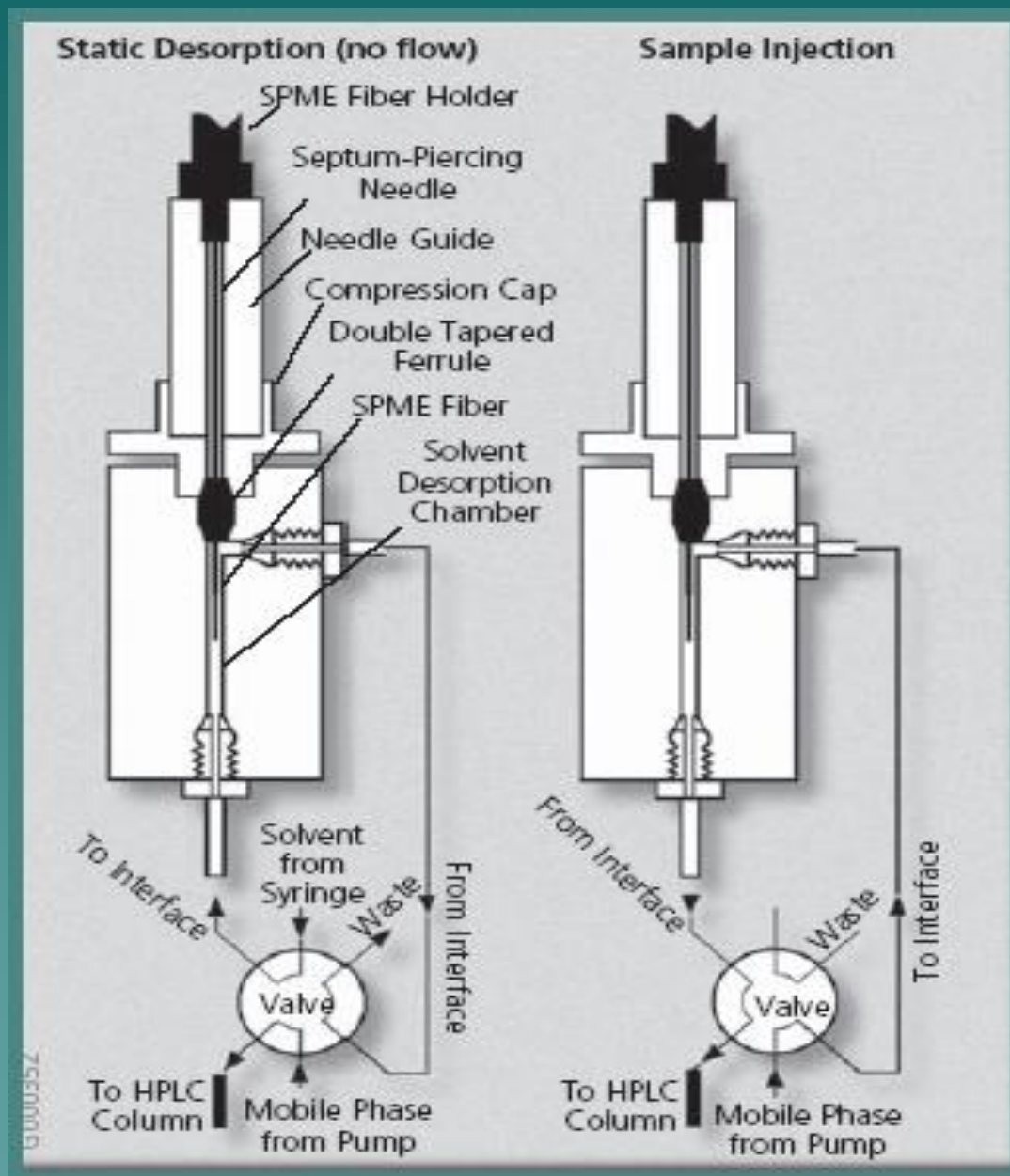
Un adaptateur est nécessaire pour extraire de la fibre les composés d'intérêts

Une interface constituée d'une vanne d'injection à 6 voies et d'une chambre de dissolution, permet à la phase mobile d'être en contact avec la fibre SPME, d'en extraire les analytes dissous, puis de les transférer dans la colonne pour y être séparés

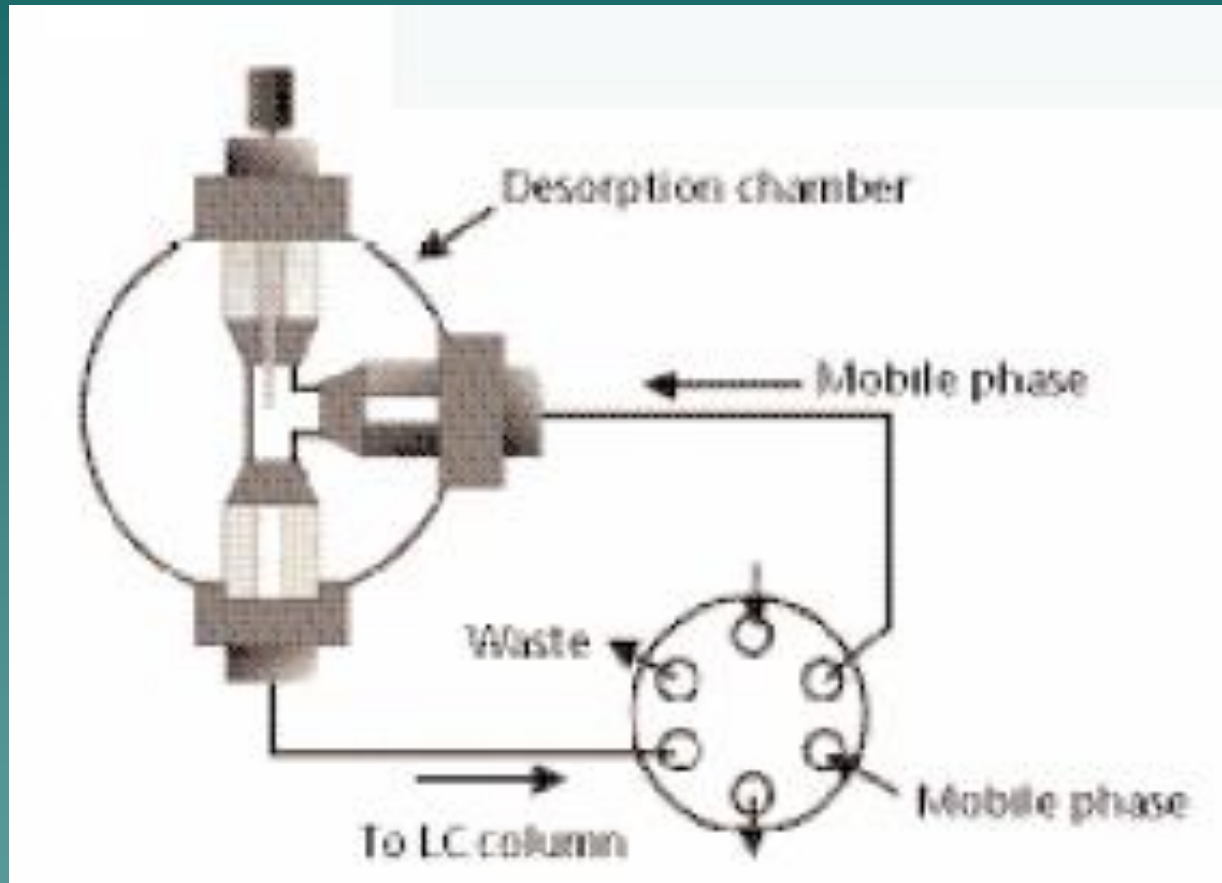
INTERFACE DE DESORPTION (HPLC)



INTERFACE DE DESORPTION (HPLC)



INTERFACE DE DESORPTION (HPLC)



La Fibre SPME

Son Rôle?

L'enduit de fibre enlève les composés de votre échantillon par dissolution dans le cas des enduits liquides ou, adsorption dans le cas des enduits pleins (solide). Polymères poreux type Porapack

La fibre de SPME est alors insérée directement dans le chromatographe en phase gazeuse pour la vaporisation ou la désorption et l'analyse

Nature des échantillons traités

- Solide
- Liquide
- Gazeux

Exemples de Fibres SPME

- **Polydiméthylsiloxane (PDMS) : Apolaire**
- **Polydiméthylsiloxane/divinylbenzène (PDMS/DVB)**
(Moyemment polaire)
- **Polyacrylate (PA): polaire**
- **Carbowax/divinylbenzène (CW/DVB): Moy/polaire**
- **Polydiméthylsiloxane/carboxen (PDMS/CAR)**
(Moyennement polaire)
- **Polydiméthylsiloxane/divinylbenzène/carboxen**
(PDMS/DVB/CAR)
- **Carbowax/Templated resin (CW/TPR): Polaire**

SPME

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

L'efficacité de la technique SPME dépend principalement de la quantité d'analytes qu'il est possible de concentrer sur la fibre.

Chaque phase présente une spécificité pour une classe de composés donnés.

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

- **La température**

Le chauffage modéré de l'échantillon pendant l'extraction permet d'atteindre l'équilibre rapidement

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

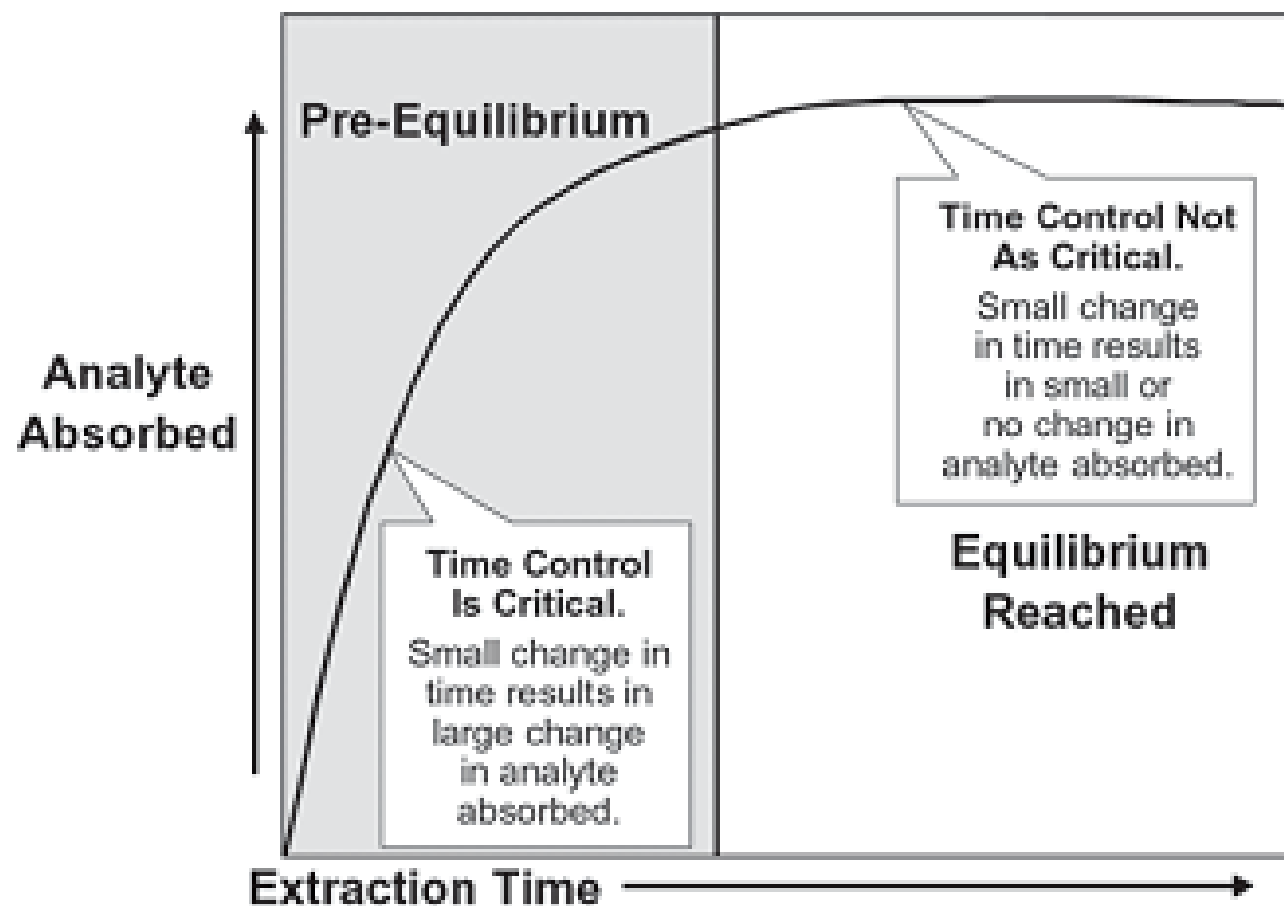
- **Le temps de contact entre la fibre et l'échantillon**

Il traduit le temps au bout duquel l'équilibre entre la quantité de composés dissous et la quantité de composés présents dans l'échantillon est atteint.

Il dépend de la nature des analytes et de la sensibilité souhaitée

Il peut varier entre une minute et quatre heures

Figure D. Effect of Time on Amount of Analyte Absorbed



Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

- **Le pH**

**Parfois il faut modifier le pH de l'échantillon pour obtenir une forme indissociée (acide ou basique)
Pour les fibres PDMS, qui sont sensibles au pH, il faut avoir un pH compris entre 4 et 10**

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

- **La force ionique**

La présence de sels dans l'échantillon augmente la force ionique et donc diminue la solubilité
Plus une solution est saline, moins elle dissout les produits

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

- **L'agitation**

Dans le cas d'une dissolution en immersion, l'agitation par micro onde permet d'atteindre l'équilibre thermodynamique rapidement

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

- **La nature de la phase polymérique appliquée sur la fibre.**

Elle permet de sélectionner la nature de l'analyte

Les Principaux paramètres à optimiser pour toute analyse SPME

La répartition des composés à analyser entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont

- **Le temps de vaporisation des analytes cibles**

En CPG, la vaporisation se fait thermiquement et en quelques minutes

En HPLC, pour les analytes fortement absorbés, il faut mettre la fibre en contact avec la phase mobile pendant un temps donné (plusieurs lavages)

Les Avantages

- Rapidité**
- Quantité d'échantillon minimale**
- Pas de solvant**
- Simplicité de mise en œuvre**
- Sélective en fonction de la nature de la fibre_(analyte) et de son diamètre_(masse molaire)**
- Réutilisation de la fibre plusieurs fois**
- Analyse qualitative et quantitative**

Les Applications en SPME

Table I: Application of SPME in plasma samples

Analyte	Extraction Mode Fiber Coating (thickness, mm)	Analytical System (LOQ or LOD)	Remarks	References
Valproic acid	Direct immersion PDMS (100)	GC-FID (LOD: 1 mg/mL)	Equilibrium dialysis followed SPME	Krogh et al., 1995 (7)
Aniline, phenols, nitrobenzenes	Direct immersion PA (85)	GC-MS	Protein binding study, determination of free concentrations	Vaes et al., 1996 (8)
Antidepressants	Direct immersion PDMS (100)	GC-NPD, GC-MS (LOQ: 90–200 ng/mL)	Theoretical model for influence of proteins	Ulrich and Martens, 1997 (9)
Diazepam	Direct immersion PA (85) PDMS (7, 100)	GC-FID (LOQ: 0.25 nmol/mL)	1-Octanol-modified PA fiber, pretreated plasma (TCA)	Krogh et al., 1997 (10)
Benzodiazepines	Direct immersion PA (85)	GC-FID (LOQ: 0.01–0.48 mmol/mL)	1-Octanol-modified PA fiber, pretreated plasma (TCA)	Reubsaet al., 1998 (11)
Clozapine	Direct immersion PDMS (100)	GC-NPD (LOD: 30 ng/mL)	Influence of proteins and triglycerides	Ulrich et al., 1999 (12)
Lidocaine and three of its metabolites	Direct immersion CW-DVB (65) PA (85) PDMS (100)	GC-NPD (LOQ: 8–21 ng/mL)	Effect of different fiber coating	Abdel-Rehim et al., 2000 (13)
Lidocaine	Direct immersion PDMS (100)	GC-FID (LOD: 5 ng/mL)	Analysis of free, protein-bound, and total amount of lidocaine in human plasma	Koster et al., 2000 (14)
Anesthetics	Direct immersion CW-DVB (65) PA (85) PDMS (100)	GC-NPD (LOQ: 0.5 mmol/mL)	Study of protein-binding ultra filtrate plasma	Abdel-Rehim et al., 2000 (15)
Gamma-hydroxybutyric acid	Derivatization headspace	GC-PICI-MS (LOQ: 1 mg/mL)	Conversion of gamma-hydroxybutyric to gamma-butyrolactone	Frison et al., 2000 (16)
Methadone and its main metabolite	Direct immersion PDMS (100)	GC-MS (LOD: 40 ng/mL)	Application to methadone-treated patients	Bermejo et al., 2000 (17)
Levomepromazine	Direct immersion PDMS (100)	GC-NPD (LOQ: 5 ng/mL)	Application to therapeutic drug monitoring	Kruggel and Ulrich, 2000 (18)
Midazolam	PA (85)	GC-MS (SIM) (LOD: 1.0 ng/mL)	Application to therapeutic drug monitoring	Frison et al., 2001 (19)
Anticonvulsants	Direct immersion CW-TPR (50)	LC-UV (LOQ: 0.05–1.0 mg/mL)	Off-line desorption	Queiroz et al., 2002 (20)
Anticonvulsants	Direct immersion CW-DVB (65)	GC-TSD (LOQ: 0.05–0.2 mg/mL)	Application to therapeutic monitoring	Queiroz et al., 2002 (21)
Thymol	Headspace PDMS-DVB (65)	GC-FDI (LOQ: 8.1 ng/mL)	Enzymatic cleavage of thymol sulfate	Kohlert et al., 2002 (22)
Sulfentanil	Direct immersion PDMS-DVB (65)	GC-MS (LOQ: 6.0 ng/mL)	Influence of pH and ionic strength	Paradis et al., 2002 (23)
Amitraz	Direct immersion PDMS (100)	GC-TSD (LOQ: 20 ng/mL)	Application to toxicity studies in dogs	Queiroz et al., 2003 (24)
Busulphan	Direct immersion CW-DVB (65)	GC-MS (LOQ: 20 ng/mL)	In-vial derivatization	Abdel-Rehim et al., 2003 (25)

PDMS = polydimethylsiloxane, PA = polyacrylate, CW = Carbowax, DVB = divinylbenzene, FID = flame ionization detection, NPD = nitrogen-phosphorus detection, TSD = thermionic specific detection, LOQ = limit of quantitation, LOD = limit of detection, TCA = trichloroacetic acid, PICI-MS = positive ion chemical MS, SIM = selected ion monitoring

Les Applications en SPME

Les saveurs, Arômes volatils
Les parfums,
Les médecines légales,
La toxicologie,
Les matrices environnementales,
Les matrices biologiques,
Les sciences forensiques,
Les drogues,
Les explosifs,
Les pesticides,
Les hydrocarbures.....

Analyse des Pesticides POP's dans le Thé

- Ajouter 15 ml d'eau pure à 0,5g de thé
- Placé le récipient fermé pd 10 mn au micro onde à 80% de sa puissance
- Revenir à Tambiante
- Transférer dans un vial
- Extraction SPME
 - HS/SPME: 40mn à 90°C en présence de NaCl
 - Immersion/SPME: 40mn à 60°C

**3 fibres testées: PPMS 70 micromètres
PMS 75 micromètres
PDMS 100 micromètres**

Les Applications en SPME

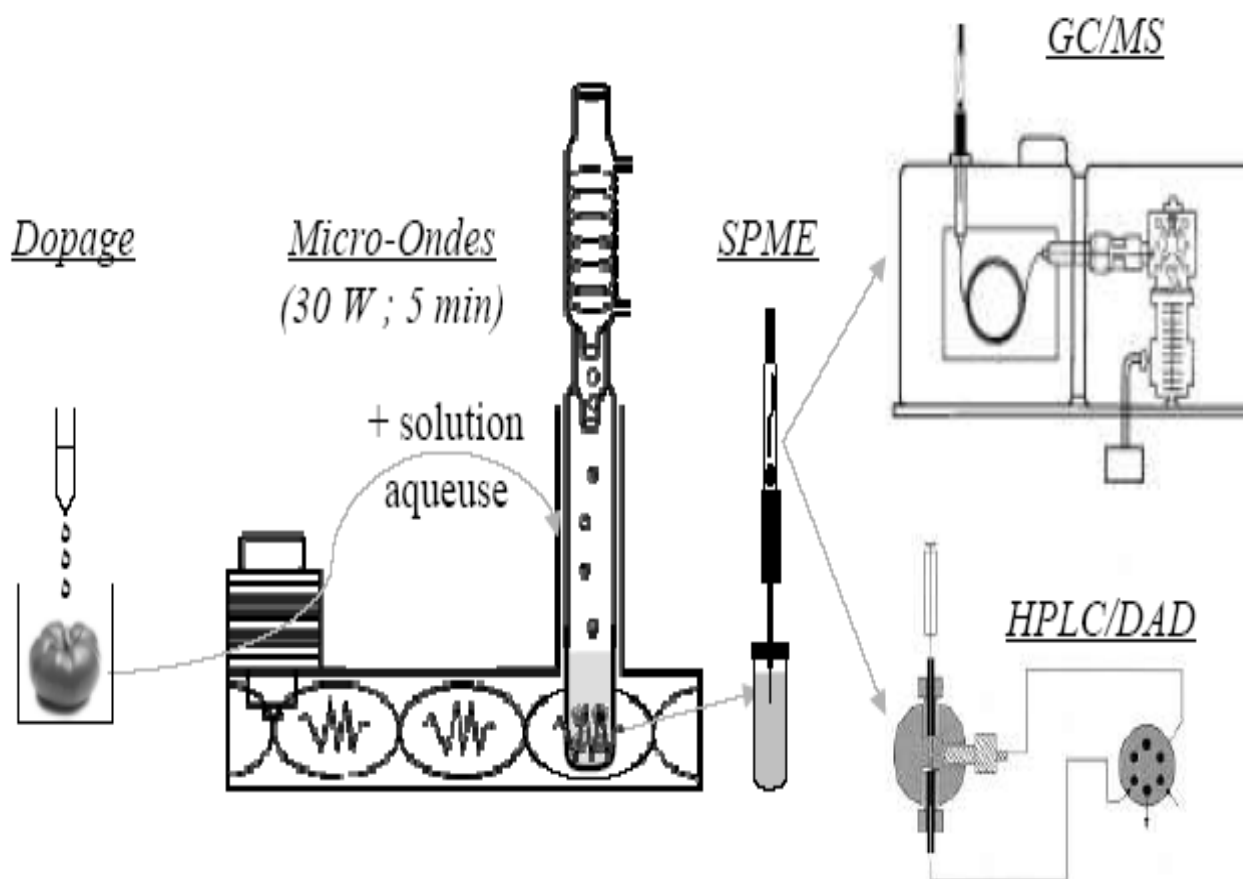
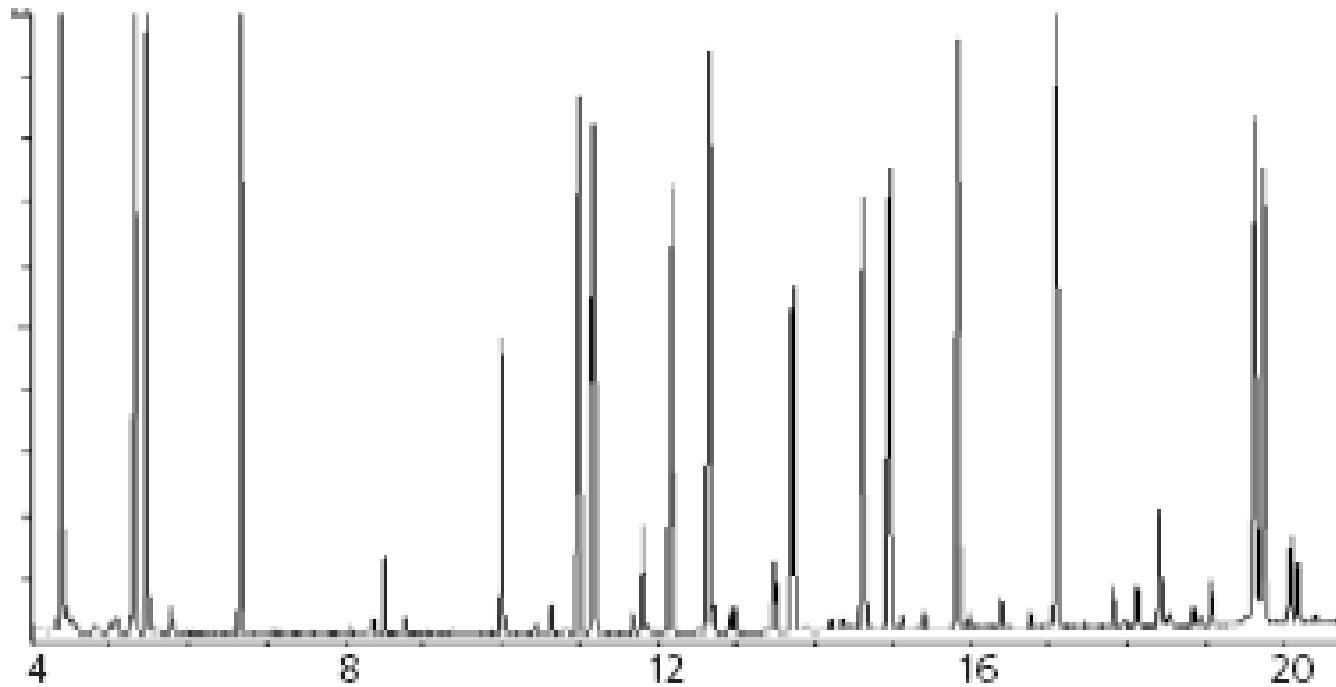


Figure 1 : Protocole d'analyse des résidus de pesticides dans les tomates.

SPME-Applications: Pesticides Organochlorés



Conditions

Sample: 200ppt each analyte in 2mL water

SPME Fiber: polydimethylsiloxane, 100µm film

Extraction: immersion, 15 min (rapid stirring)

Column: SPB-5, 15m x 0.20mm ID, 0.20µm film

Oven: 120°C (1 min) to 180°C at 30°C/min, then to 290°C at 10°C/min

Carrier: helium, 37cm/sec (set at 120°C)

Det.: ECD, 300°C

Inj.: splitless (splitter closed 3 min), 260°C

Sample: 1mL urine (100µg each analyte, 5µg d5-methamphetamine, 0.7g K₂CO₃) in 12mL vial

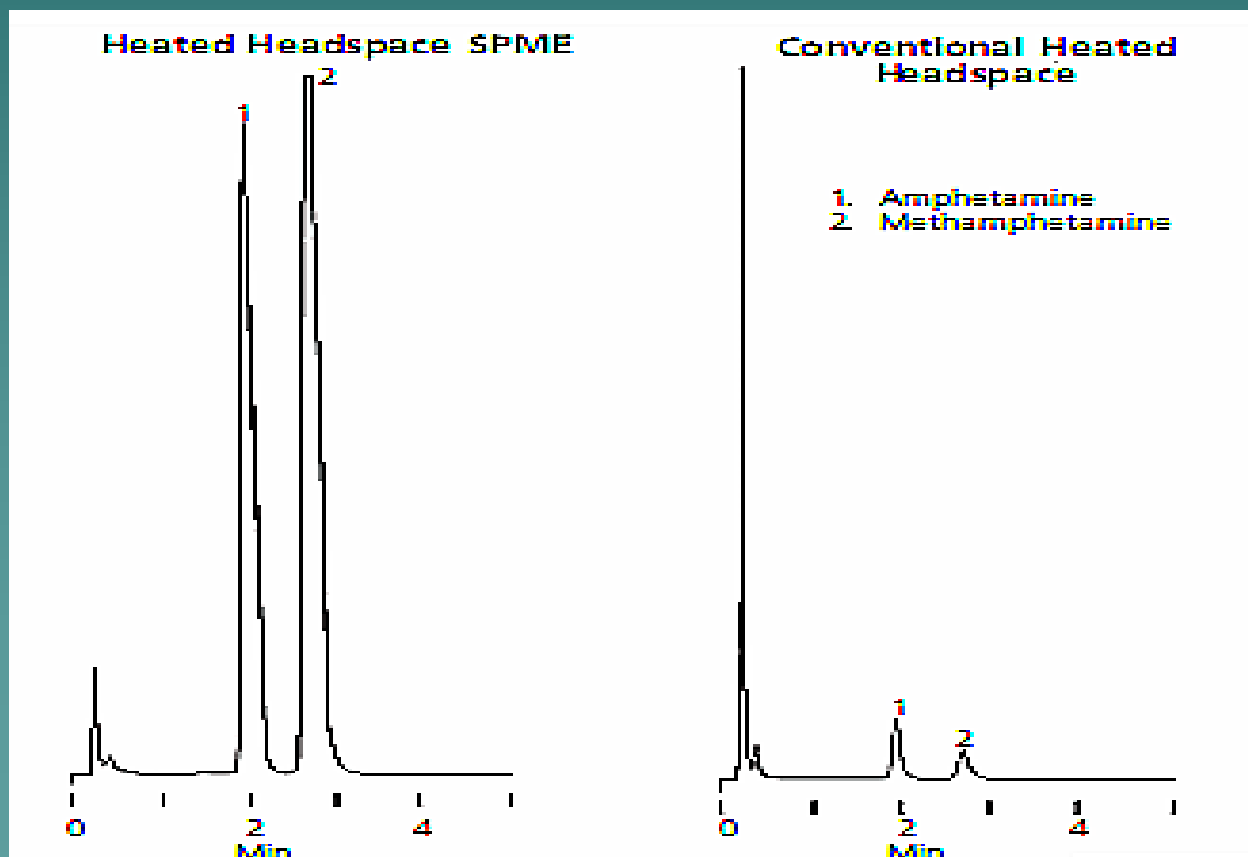
SPME Fiber: **100µm polydimethylsiloxane**

Extraction: headspace, 80°C, 5 min (sample incubated 20 min)

Desorption: 3 min, 250°C

Column: polydimethylsiloxane, 15m x 0.53mm ID, 2.0µm film ; Oven: 110°C

Carrier: nitrogen, 25mL/min ; Det.: FID, 250°C ; Inj.: splitless, 250°C



Monitor Organic Volatile Impurities (OVIs) in Pharmaceutical Products, Using Solid Phase Microextraction/Capillary GC

Figure A. Residual Organic Solvents in a Pharmaceutical Preparation

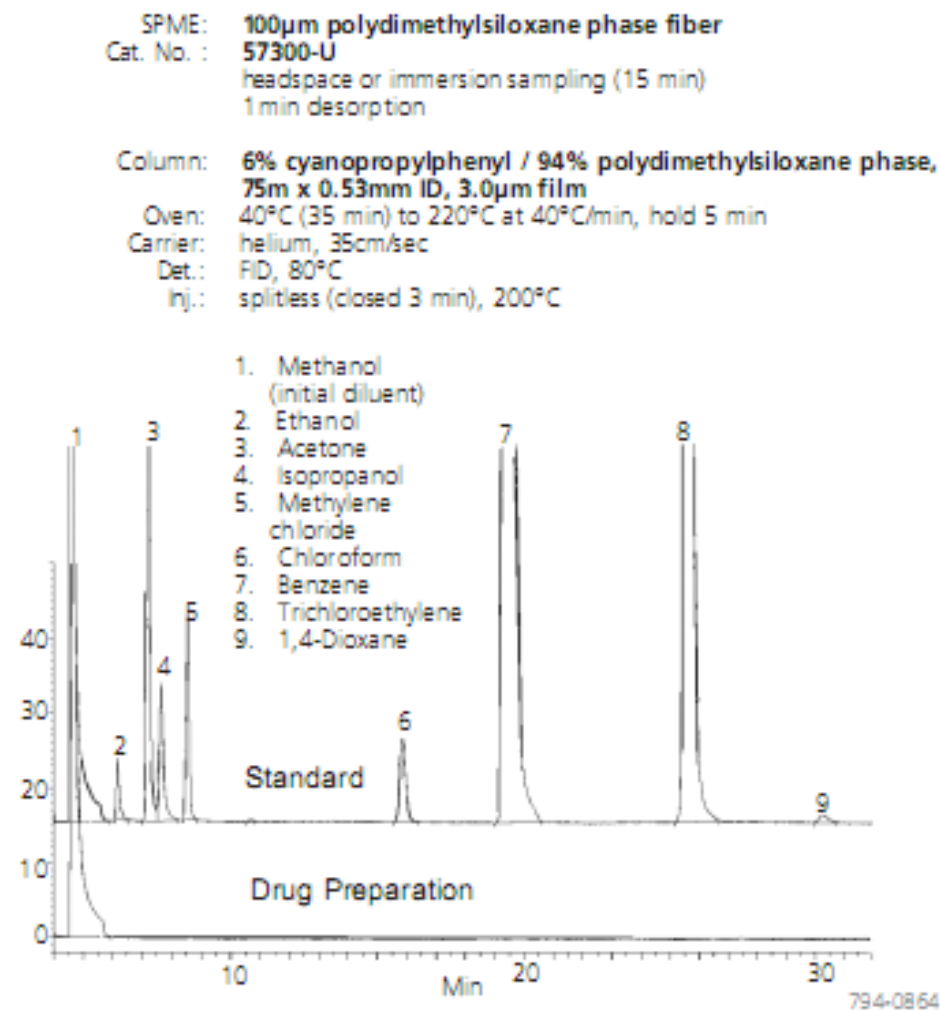
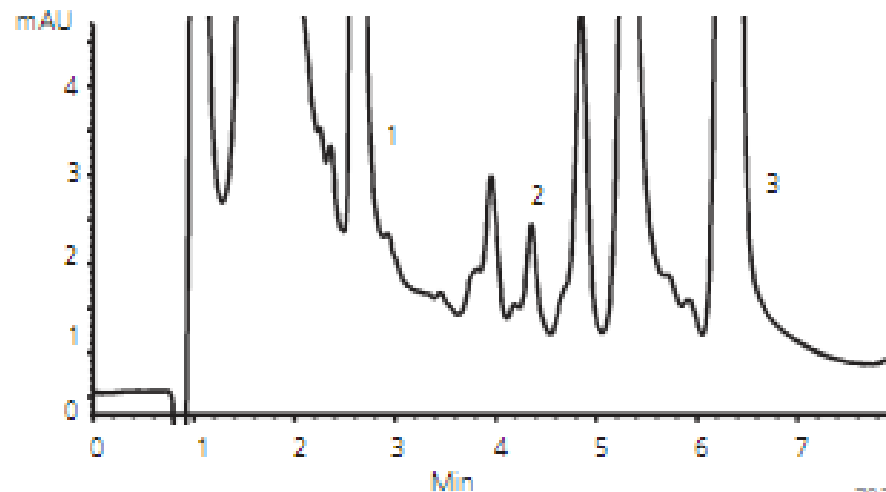


Figure A. Fat Soluble Vitamins by SPME/HPLC

Sample: 2.5mL supernatant obtained from dissolving vitamin tablet in 1% acetic acid/ 33% isopropanol
SPME Fiber: PDMS/DVB, 65µm
Cat. No.: 57311
Extraction: immersion (40 min), with stirring
Desorption: static, 2 min in mobile phase; dynamic, valve open during run
Column: SUPELCOSM LC-8, 25cm x 4.6mm ID, 5µm particles
Cat. No.: 5-8297
Mobile Phase: acetonitrile:methanol:water (63:33:4)
Flow Rate: 2mL/min
Temp.: 35°C

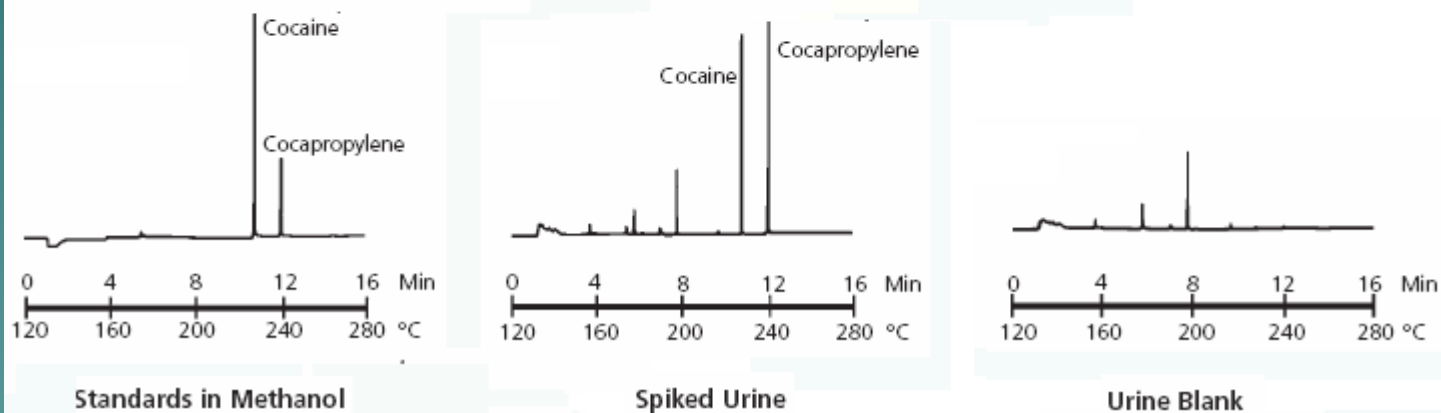
1. Vitamin A
2. Vitamin D₃
3. Vitamin E



797-0231

Figure D. Cocaine in Urine

Sample: 0.5mL urine (250ng each analyte, 20 μ L 2.5% NaF) in 1mL vial
SPME Fiber: **100 μ m polydimethylsiloxane**
Cat. No.: **57300-U** (manual sampling)
Extraction: immersion, 30 min
Desorption: 3 min, 240°C
Column: polydimethylsiloxane, 30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film
Oven: 120°C to 280°C at 10°C/min
Carrier: helium, 3mL/min
Det.: NPD, 280°C
Inj.: splitless (splitter opened after 1 min), 240°C



SPME-Applications: Drogue

Conditions

Sample: 0.5mL urine (250ng each analyte, 20 μ L 2.5% NaF) in 1mL vial

SPME Fiber:

polydimethylsiloxane, 100 μ m film

Extraction: immersion, 30 min

Desorption: 3 min, 240 $^{\circ}$ C

Column:

poly(dimethylsiloxane), 30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film (equivalent to SPB-1 phase, Oven: 120 $^{\circ}$ C to 280 $^{\circ}$ C at 10 $^{\circ}$ C/min

Carrier: helium, 3mL/min

Det.: NPD, 280 $^{\circ}$ C

Inj.: splitless (splitter closed 1 min), 240 $^{\circ}$ C

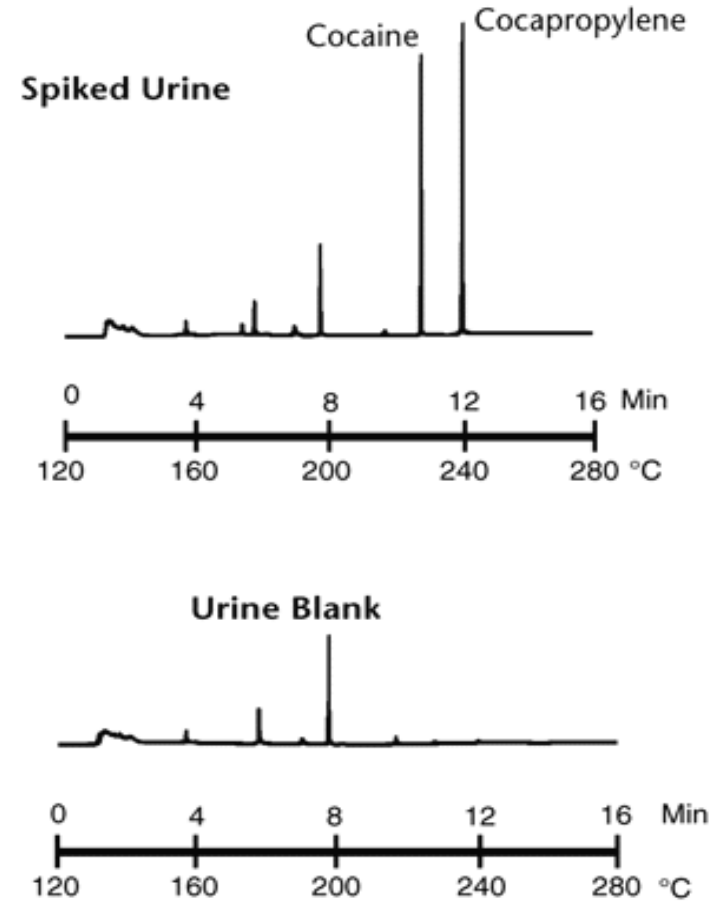


Figure provided by T. Kumazawa and K. Sato, Dept. Legal Medicine, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan and K. Watanabe, H. Seno, A. Ishii, and O. Suzuki, Dept. Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

Used with permission of Japanese Journal of Forensic Toxicology.

Conditions

Sample: 1mL urine + 0.7g K₂CO₃ in 20mL headspace vial, **equilibrated** at 80°C, 30 min

SPME Fiber: polydimethylsiloxane, 100µm film

Extraction: headspace, 3-5 min, 80°C

Derivatization: methyl bis-trifluoroacetamide (headspace, 0.5 min, ambient)

Desorption: 1 min, 270°C

Column: methylsiloxane, 12.5m x 0.2mm ID, .033µm film

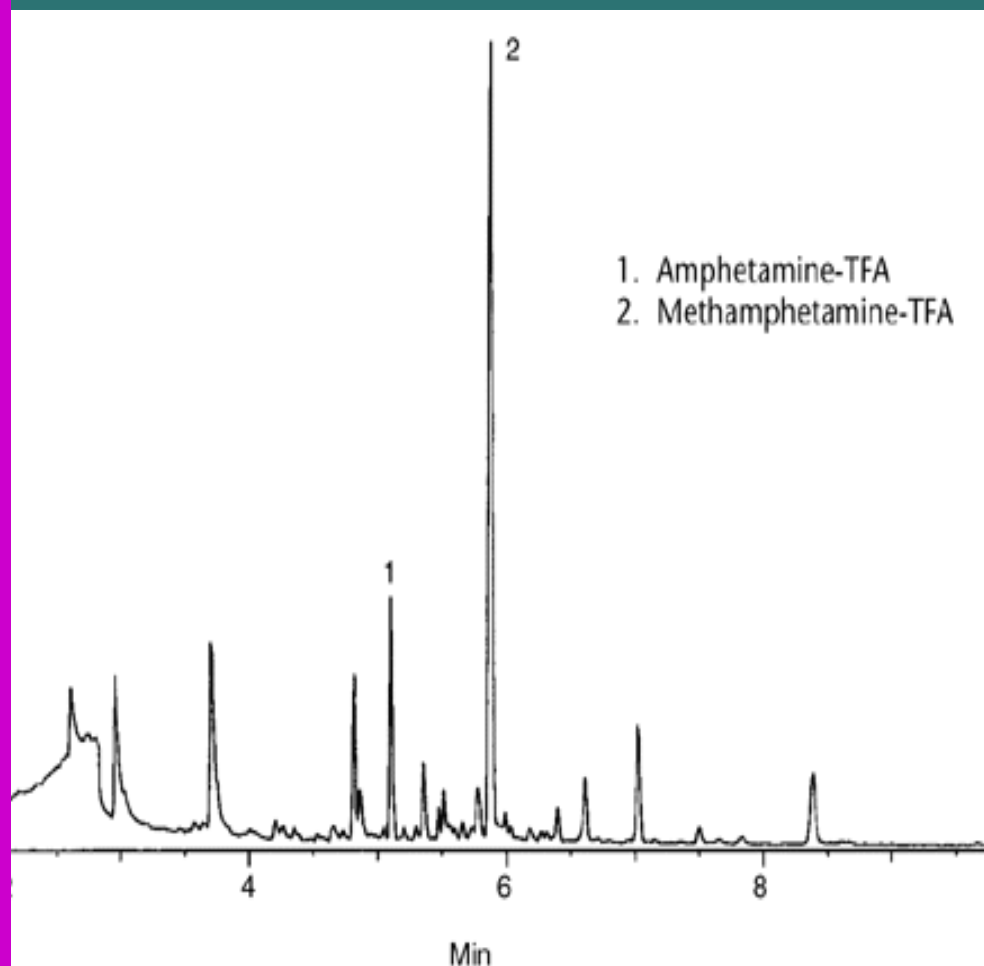
Oven: 60°C (1 min) to 140°C (4 min) at 30°C/min,

then to 276°C at 20°C/min, 4 min

Det.: MS, full scan

Inj.: splitless (closed 1 min), 270°C

Amphetamines in Urine



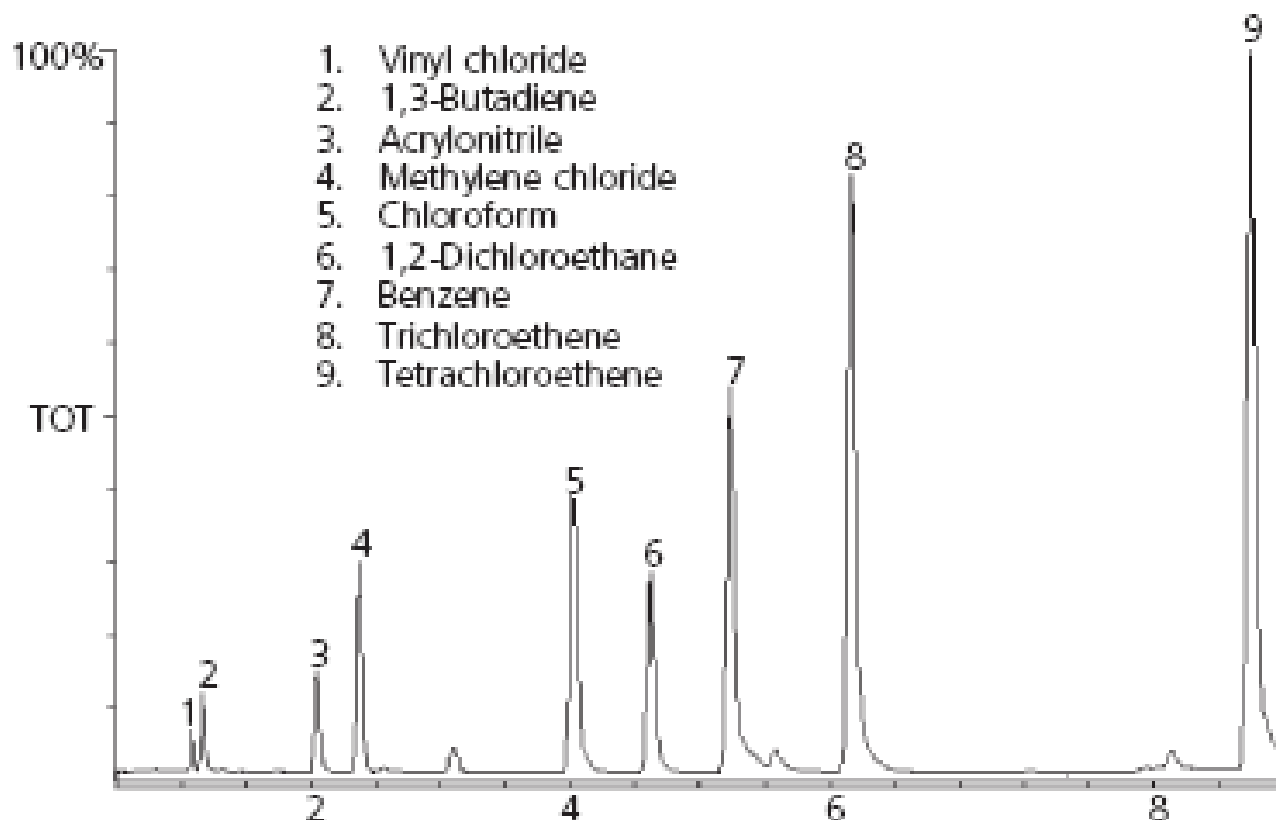
VOCs in Air at 10ppb

SPME Fiber: **Carboxen/PDMS, 75 μ m film** ; Extraction: headspace, 10 min
Desorption: 5 min, 300°C ; Column: **SPB™-1 SULFUR, 30m x 0.32mm ID, 4.0 μ m film**

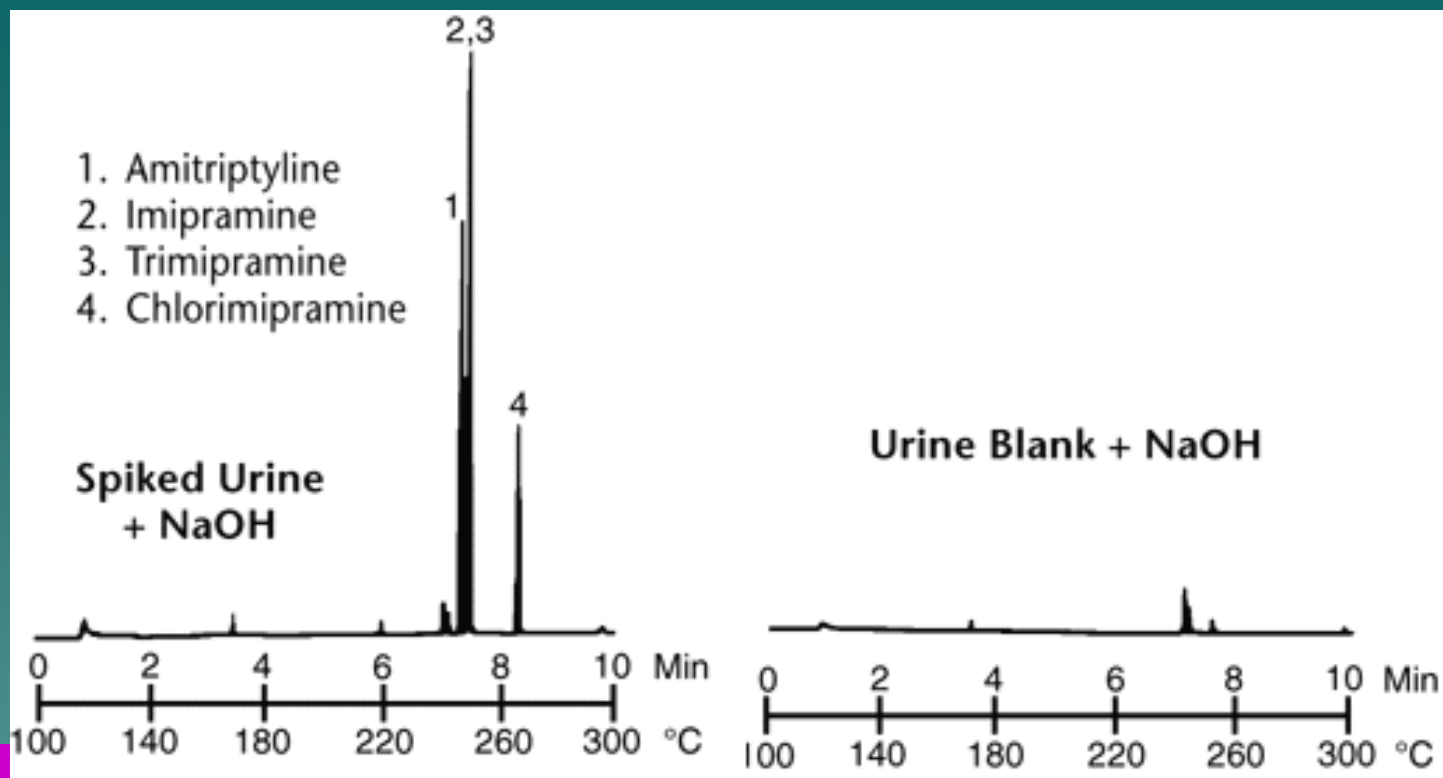
Oven: 40°C (2 min) to 150°C at 8°C/min

Carrier: helium, 35cm/sec ; Inj.: splitless (closed 2 min), 0.75mm ID liner

Det.: GC/MS ion trap, m/z = 45 - 260



SPME-Applications : Tricyclic Antidepressants



Conditions

Sample: 1mL urine (1µg each analyte ± 50µL 5M NaOH) in 7.5mL vial

SPME Fiber: polydimethylsiloxane, 100µm film

Extraction: headspace, 15 min, 100°C (sample incubated 30 min)

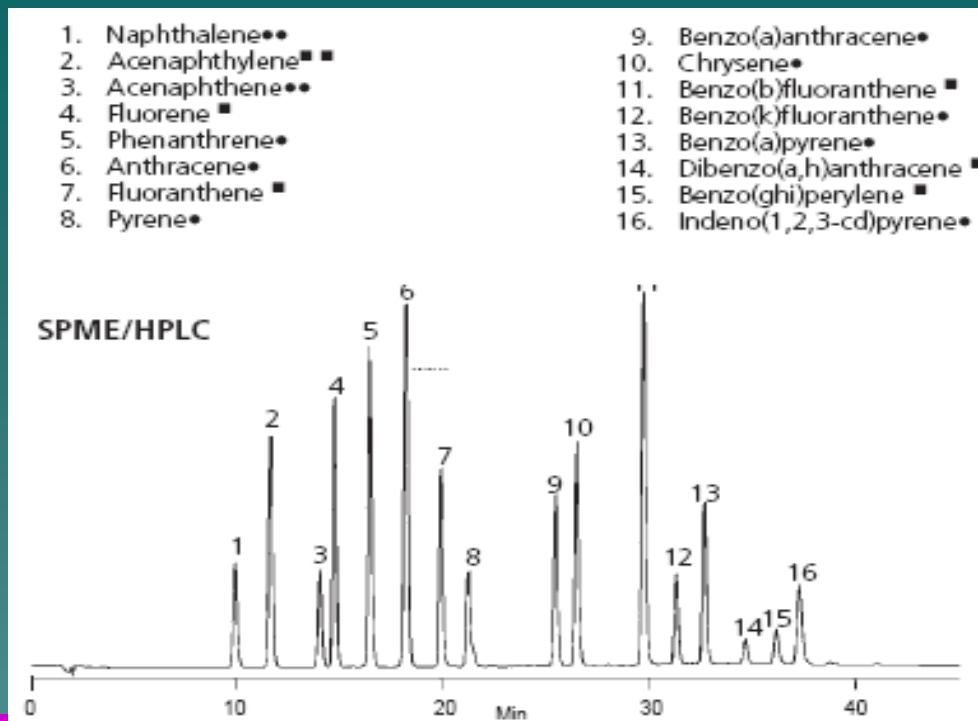
Desorption: 3 min, 280°C

Column: poly(dimethylsiloxane), 30m x 0.32mm ID, 0.25µm film (equivalent to SPB-1 column),

Oven: 100°C to 300°C at 20°C/min ; **Carrier:** helium, 3cm/sec

Det.: FID, 280°C ; **Inj.:** splitless (splitter closed 1 min), 280°C

SPME-Applications: PAH_s (HPLC)



Conditions

Sample: 5μL PAH mix in 5mL water, 100-2000ng/mL each analyte

SPME Fiber: polydimethylsiloxane, 100μm film ; SPME/HPLC interface)

Extraction: immersion, 30 min (rapid stirring)

Desorption: Requires SPME/HPLC interface: static, 200μL acetonitrile:water, 40:60, 2 min

Column: SUPELCOSIL LC-PAH, 15cm x 4.6mm ID, 5μm particles

Mobile Phase: acetonitrile:water gradient

Gradient Program

Time (min)	%ACN
0	50
5	50
30	100
45	100

flow rate increased at 2 min ; Flow Rate: 0.2mL/min (0-2 min), 1.0mL/min (2-45 min)

Det.: UV, 254nm

Conditions

Sample: 50ppb phenols
in 1.8mL saturated salt
water, pH 2

SPME Fiber:

polyacrylate, 85 μ m film

Extraction: immersion,
20 min (rapid stirring)

Desorption: splitless
(splitter closed 3 min),
280°C

Column: PTE-5, 30m x
0.25mm ID, 0.25 μ m film

Oven: 40°C (4 min) to
260°C at 12°C/min

Carrier: helium,
40cm/sec (set at 40°C)

Det.: MS (scan range
m/z = 45-465, 0.6
sec/scan)

SPME-Applications: Phenols



SPME-Applications: HA

Conditions

Sample: 0.7mL water spiked with 2-600µg/liter each analyte,
0.25g NaCl added

SPME Fiber: 30µm polydimethylsiloxane

Extraction: headspace, 12 sec, ambient temp. (no stirring)

Desorption: 2-3 min, 250°C (0.75-1.0mm ID injector liner)

GC Column: SPB-1, 10m x 0.20mm ID, 1.2µm film (prepared on request)

Oven: 70°C (0.2 min) to 180°C at 50°C/min

Carrier: hydrogen, 12psi (+ 30mL/min nitrogen make-up gas)

Det.: FID, 250°C

1. Methanol, 2. Acetone, 3. Methylene chloride, 4. MTBE (Methyl *tert*-butyl ether), 5. *cis*-1,2-Dichloroethylene, 6. 1,1,1-Trichloroethane, 7. Benzene, 8. Trichloroethane, 9. Toluene, 10. Tetrachloroethylene, 11. Chlorobenzene, 12. Ethylbenzene, 13. *m*-Xylene, 14. *o*-Xylene, 15. Cumene (Isopropylbenzene), 16. 1,4-Dichlorobenzene, 17. Naphthalene