

## C- L'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPE)

L'extraction en phase solide (SPE) est une technique de préparation de l'échantillon, plus récente que la LLE, mais très populaire et de première importance pour isoler, enrichir ou éliminer un composé présent dans une matrice complexe.

Comme dans le cas de la LLE, la SPE consiste en un transfert plus ou moins sélectif d'un soluté, depuis une phase liquide ou gazeuse (**Extraction liquide/solide ou extraction gaz/solide**) vers une phase solide. Le transfert est une opération de distribution/partition du soluté entre deux phases non miscibles (une fluide et une solide) en fonction de l'affinité relative du soluté pour chacune des deux phases ; Cette distribution est gouvernée, comme pour la LLE, par une constante ou **coefficient de partage  $K_d$**

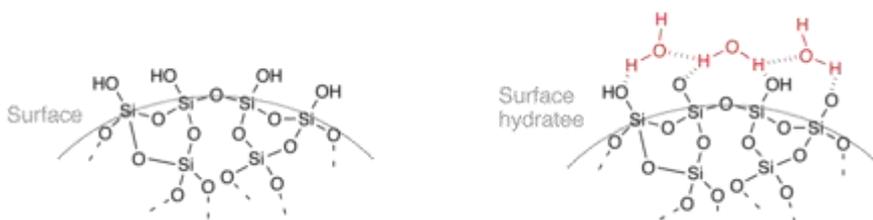
**$K_d = [S]_s / [S]_f$**  ou  $[S]$  est la concentration de soluté à la surface de la phase solide (s) ou dans la phase fluide (f, liquide ou gaz).

L'affinité relative du soluté vis-à-vis des deux phases est déterminée par sa polarité relative, et par la nature et les capacités absorbantes de la phase solide ; Le soluté interagit avec la surface de la phase solide par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, interactions dipolaires, forces de London ou interactions ioniques.

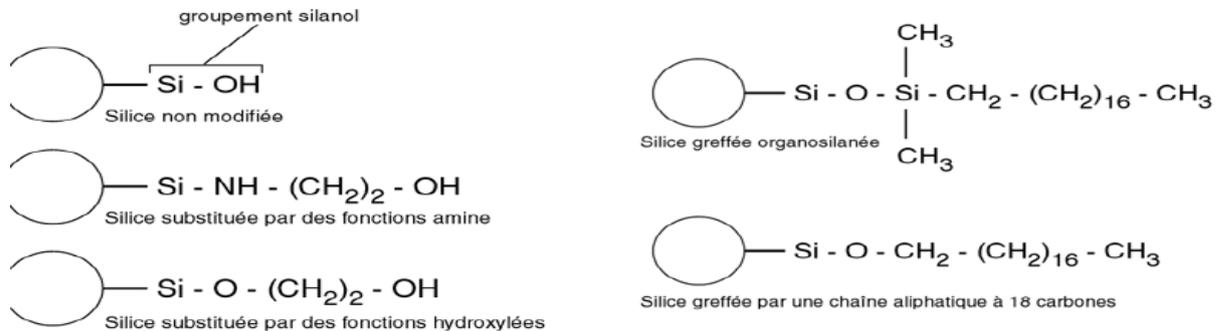
En général les phases solides (ou adsorbants) utilisés en SPE peuvent être groupés en trois classes :

- Les phases **normales**
- Les phases **inverses**
- Les phases **échangeuses d'ions**

La majorité des phases solides sont basées sur des particules de silice (particules de formes irrégulières et de diamètre allant de 30 à 60 micron) porteuses de groupements silanol ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ) à leur surface.



Ces groupements silanol peuvent être substitués (liés à, greffés par) d'autres groupements fonctionnels modifiant ainsi leurs propriétés absorbantes (de rétention) :



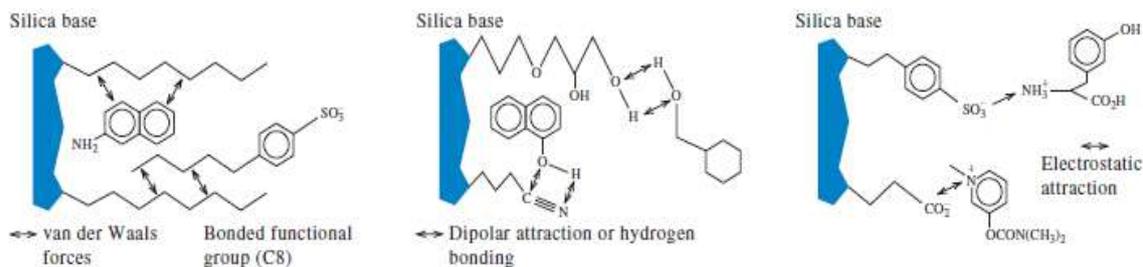
*Remarque : en plus des adsorbants basés sur la silice , certains sont à base d'alumine (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) , florisil (oxyde de magnésium et silicium) ou autres polymères macro réticulés*

La nature des groupements fonctionnels définissent la classification de la phase solide (voir quelques exemples dans le tableau ci-après) :

-Les adsorbants en **phase normale** : ont des groupes fonctionnels polaires de type cyano,amino, alcool (ou diol) ; Ces groupes retiendrons/adsorberons les molécules polaires .

-Les adsorbants en **phase inverse** : ont des groupes fonctionnels apolaire de type octadecyl (C<sub>18</sub>), octyl (C<sub>8</sub>) et méthyl (CH<sub>3</sub>) ; Ces groupes sont apolaires et retiendrons les molécules apolaires.

-Les adsorbants **échangeurs d'ions** : ont des groupes fonctionnels porteurs d'une charge électrique nette (entière) positive ou négative de type acide sulfonique (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou ammonium (N<sup>+</sup>) ; Ces groupement retiendrons les molécules ions de signe opposé.



**Fig. 18.4.** Solid-phase extractants utilizing nonpolar, polar, and electrostatic interactions. (Adapted from N. Simpson, *Am. Lab.*, August, 1992, p. 37. Reproduced by permission of American Laboratory, Inc.)

**Table 2.** Typical SPE sorbents and interaction mechanisms

Sorbent	Polarity	Interaction mechanisms
Silica $\text{SiO}_2$	Polar	Adsorption; H-bonding
Florisil, $\text{MgSiO}_3$	Polar	H-bonding
alumina $\text{Al}_2\text{O}_3$	Polar	H-bonding
<b>Bonded phases (modified silica)</b>		
$-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (C18 or ODS)	Nonpolar	Van der Waals interactions
$-\text{C}_8\text{H}_{17}$ (C8 or octyl)	Nonpolar	Van der Waals interactions
$-\text{C}_6\text{H}_5$ (phenyl)	Nonpolar	Van der Waals interactions and $\pi$ - $\pi$ interactions
$-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ (cyanopropyl)	Polar	Polar interactions; H-bonding
$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (aminopropyl)	Polar	H-bonding
$-(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$	Ionic	Cation exchange
$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$	Ionic	Anion exchange

## PRATIQUE DE LA SPE :

Un dispositif de SPE peut avoir différents formats, chacun avec ses avantages et avec ses limitations, en fonction du nombre d'échantillons à traiter, de la nature de l'échantillon et de son volume.

Le dispositif le plus courant est un **conteneur** (un barillet) en plastique (polypropylène) de type **seringue** (voir schéma ci-dessous) dans lequel le matériel adsorbant (la phase solide, 50mg à 10g) est tassé (empaqueté) sous forme d'une **cartouche** de quelques centimètres de hauteur, la taille de la seringue est choisie de façon à ce que un espace vide suffisant est laissé au-dessus du lit d'adsorbant, espace qui va recevoir l'échantillon liquide contenant le soluté ainsi que les différents solvants utilisés dans la suite des opérations.

D'autres dispositifs sont disponibles pour accommoder des échantillons de volumes variables, voir des micro volumes ou des échantillons gazeux (voir ci-après)

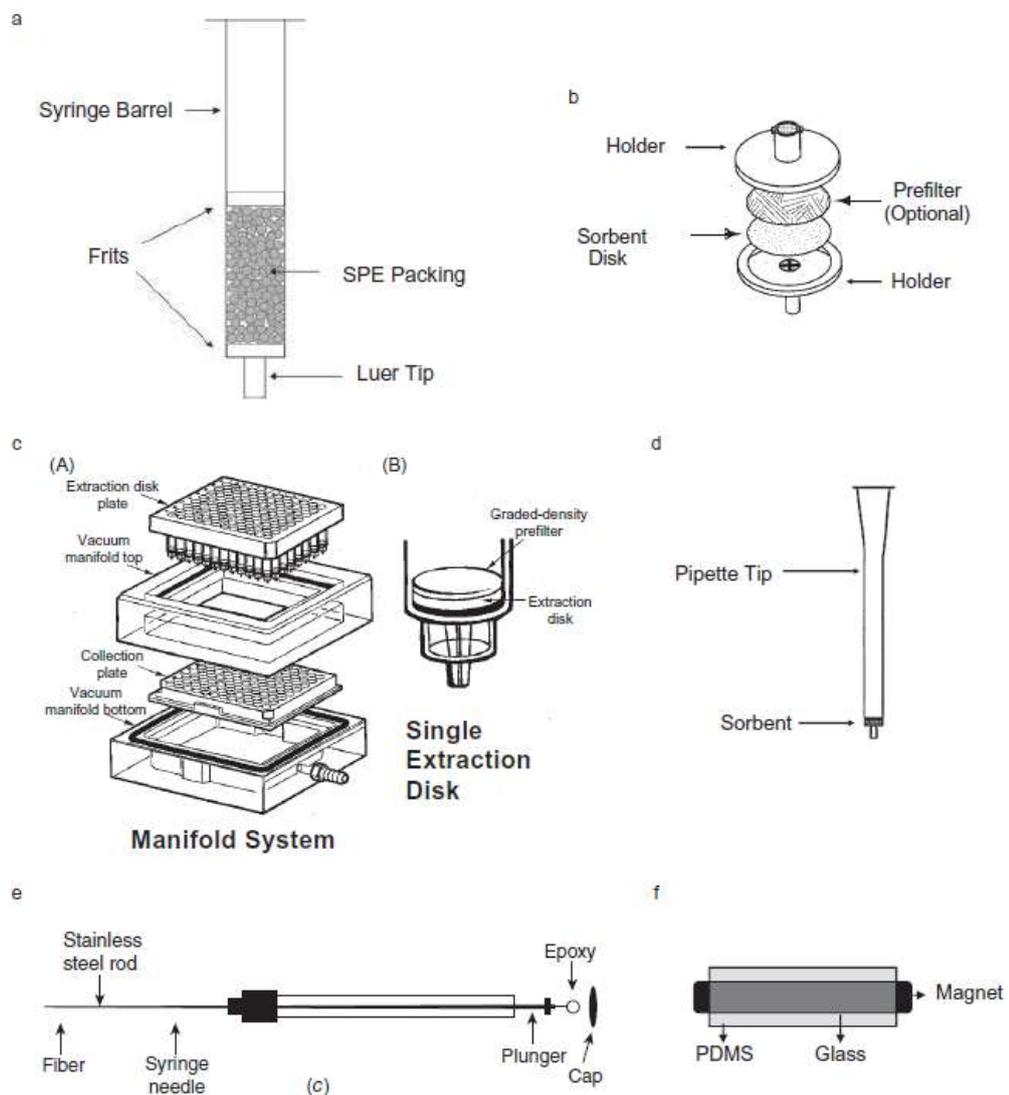


Figure 4.1. SPE devices. (a) Typical syringe barrel cartridge design. (b) Typical SPE disk configuration. (c) Schematic diagram of a 96-well SPE extraction plate system (3M Corp.). (d) SPE pipette tip. (e) SPME syringe assembly. (f) Coated stir bar.

Quel que soit le dispositif utilisé, l'échantillon liquide (et les différents solvants utilisés dans le protocole opératoire, *voir plus loin*) est forcé à percoler à travers le lit de phase solide par pression positive à l'aide d'un

piston ou alors par pression négative/succion grâce à une pompe à vide , les solutés, dont celui d'intérêt sont alors retenus par la phase solide , d'où ils pourront être détachés plus ou moins sélectivement (voir plus loin).

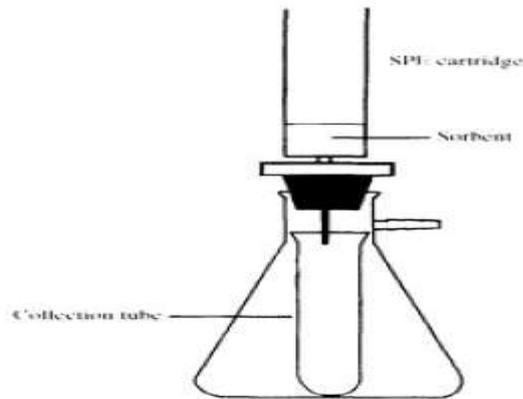


Figure 4.1  
Solid phase extraction using a cartridge and a single side-arm flask apparatus

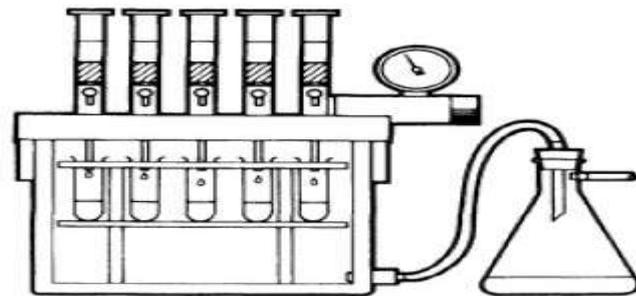


Figure 4.2  
Vacuum manifold for solid phase extraction of multiple cartridges. Reproduced by permission of International Sorbent Technology Ltd

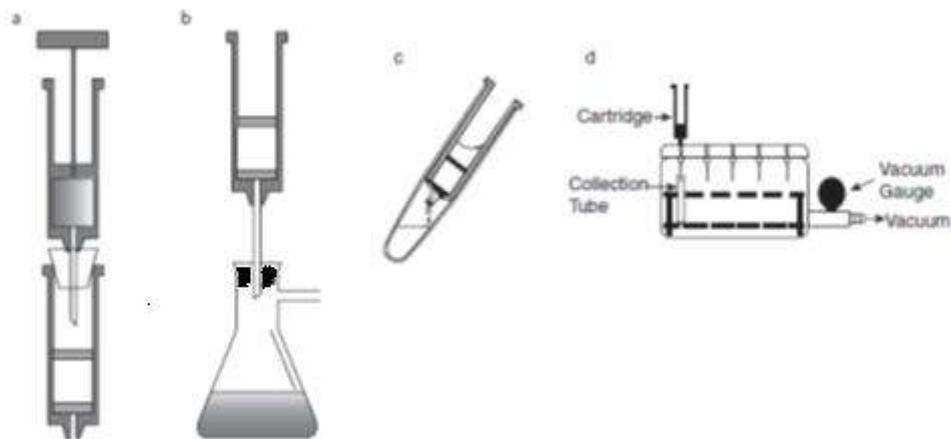


Figure 4.2. SPE apparatus: (a) pressurization, (b) vacuum, (c) centrifugation, and (d) vacuum manifold.

## ETAPES D'UNE SPE

Indépendamment du format (cartouche, filtre, pipette..) et du type (phase normale, inverse ou échange d'ions) de SPE, il existe deux types de stratégies générales pour enrichir un échantillon en un composé d'intérêt :

-adsorber /retenir sur la phase solide les composés interférents alors que le soluté d'intérêt est non retenu et passe librement à travers le dispositif.

-adsorber/retenir le soluté d'intérêt sur la phase solide alors que les composés interférents ne sont pas retenus et passent librement à travers la phase solide.

La première stratégie est choisie lorsque le soluté d'intérêt est présent à forte concentration dans l'échantillon. Lorsque le soluté d'intérêt est présent à faible concentration, ou alors lorsque plusieurs solutés de polarités différentes sont à isoler c'est la seconde stratégie qui est privilégiée

Une fois la stratégie choisie, le mode opératoire comporte cinq étapes, que nous allons décrire pour la deuxième stratégie ; Chaque étape est caractérisée par la nature et le type de solvant utilisé qui, en retour, dépend des caractéristiques de la phase solide et celles de l'échantillon.

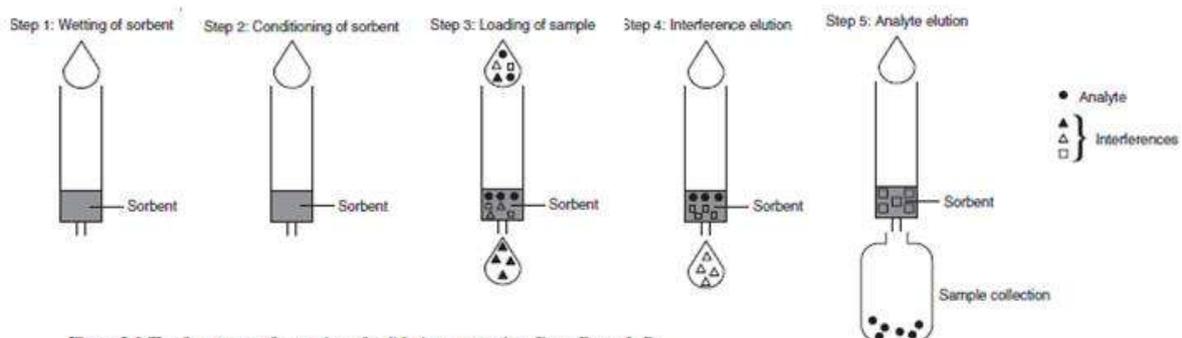


Figure 3.4 The five stages of operation of solid phase extraction. From Dean, J. R., *Extraction Methods for Environmental Analysis*, Copyright 1998. © John Wiley & Sons, Limited. Reproduced with permission.

Etape 1 : **Imbibition/solvatation** (*wetting*) de l'adsorbant, étape qui permet d'exposer les groupes fonctionnels à la surface de l'adsorbant et assurer un contact optimum avec l'échantillon, ainsi que l'élimination d'éventuelles bulles d'air qui pourraient être emprisonnées par la phase solide.

Etape 2 : **Conditionnement/équilibre** (*conditioning*) de l'adsorbant, étape durant laquelle un solvant ou un tampon (volume généralement 5 à 10 le volume de l'adsorbant), de composition similaire à la phase liquide à extraire, est percolé à travers l'adsorbant ; Cela permet de saturer la phase solide en

molécules de solvant et accélérer l'atteinte de l'équilibre de distribution des solutés entre les deux phases

Etape 3 : **Chargement /adsorption** (*loading*) de l'échantillon, étape au cours de laquelle l'échantillon (liquide) est forcé à percoler à travers la phase solide grâce à une pression positive par un piston ou alors par pression négative par succion à l'aide d'une pompe.

**Remarque :** Au cours de cette étape, et comme nous avons choisi d'illustrer la deuxième stratégie (voir plus haut), le soluté devrait être **sélectivement** retenu par l'adsorbant, **préférentiellement** à d'autres composant de la matrice ; cependant cette situation idéale est rarement réalisée car des molécules (interférents) de propriétés similaires à celles du soluté d'intérêt sont souvent présentes et peuvent aussi être retenues.

Etape 4 : **Lavage** (*washing*) des interférents en percolant à travers la phase solide, plusieurs volume d'un solvant /tampon (force supérieure à celle du solvant d'équilibration) capable de détacher/désorbéir et entraîner les interfèrent adsorbés à la phase solide mais sans affecter l'adsorption du soluté d'intérêt. Cette étape est fondamentale et sa réussite dépend de l'affinité relative (différentielle) du soluté d'intérêt et des molécules interférentes pour la phase solide et du choix du solvant/tampon de lavage.

Etape 5 : **Elution/désorption** du soluté d'intérêt, étape au cours de laquelle le soluté d'intérêt toujours adsorbé à la phase solide, est désorbé/détaché de la surface de celle-ci par un solvant/tampon adéquat, notamment de force supérieure à celle du solvant utilisé lors de l'étape de lavage ; Le volume de solvant utilisé pour l'élution doit être minimisé afin d'achever une meilleure concentration du soluté d'intérêt.

### **Choix du solvant**

Le choix du solvant influence directement la rétention / adsorption du soluté par la phase solide et son élution subséquente, et c'est la polarité du solvant qui détermine sa force (c'est-à-dire sa capacité à éluer/désorber /détacher un soluté à partir de la phase solide dans un volume minimal). La force relative de certains solvants utilisés en SPE en phase normale ou phase inverse est donnée dans le tableau suivant :

**Table 3.2** Solvent strengths for normal and reversed phase sorbents. From Dean, J. R., *Extraction Methods for Environmental Analysis*, Copyright 1998. © John Wiley & Sons, Limited. Reproduced with permission

Solvent strength for normal phase sorbents		Solvent strength for reversed phase sorbents
<b>Weakest</b>	Hexane	<b>Strongest</b>
	Iso-octane	
	Toluene	
	Chloroform	
	Dichloromethane	
	Tetrahydrofuran	
	Ethyl ether	
	Ethyl acetate	
	Acetone	
	Acetonitrile	
	Isopropyl alcohol	
<b>Strongest</b>	Methanol	
	Water	<b>Weakest</b>

Bien évidemment, cette classification correspond à une situation idéale car, en pratique, on a souvent recours à un mélange de solvant pour achever un enrichissement adéquat de l'échantillon en soluté d'intérêt.

En ce qui concerne la SPE par échange d'ions, la « force » du solvant, qui dans ce cas est un tampon aqueux, est en fait déterminée par son pH et/ou sa force ionique (concentration en ions) par rapport au pK du soluté d'intérêt (son état d'ionisation) est sa densité de charge (sa capacité à concurrencer avec les contre-ions du tampon vis-à-vis des groupes fonctionnels de la phase solide). Nous reviendrons sur cet aspect lors du cours sur la **chromatographie**.

### **Autres facteurs affectant la SPE**

Le choix de l'adsorbant pour SPE dépend en premier lieu des caractéristiques du soluté d'intérêt, mais d'autres facteurs peuvent affecter les résultats de l'opération :

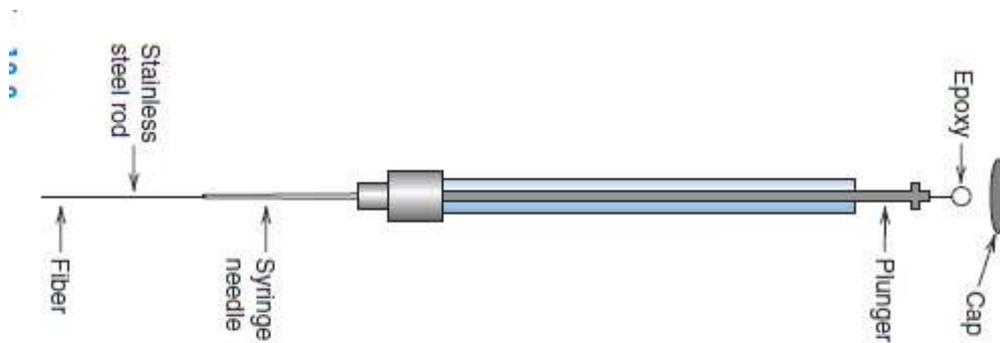
- Le nombre de sites actifs (groupes fonctionnels) doit être en excès, suffisant pour accepter toutes les molécules de soluté, sinon la phase solide est saturée. Il faut donc tester la capacité de l'adsorbant avant son utilisation.
- Le flux de l'échantillon liquide à travers la phase solide doit être ajusté afin d'optimiser le temps d'interaction entre les solutés et l'adsorbant. Des

flux de 3 à 10ml par minutes sont souvent utilisés avec des dispositifs en cartouche

- Le solvant d'élution (comme pour le solvant d'extraction en LLE) doit être compatible avec les techniques d'analyse ultérieure de l'échantillon.

## La MICROEXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPME)

SPME est une technique de SPE qui n'utilise pas de solvant ; Elle typiquement utilisée pour collecter directement des soluté/analyte à partir d'une phase fluide( liquide ou gaz) pour être analysé instrumentalement par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou chromatographie liquide de haute performance (HPLC). La figure suivante illustre un dispositif pour SPME



Le composant principal de ce dispositif est une fibre d'extraction, protégée à l'intérieur d'une aiguille en acier inox attachée à une seringue. La fibre à SPME est constituée par une fibre de silice enveloppée/recouverte par une fine couche (7 à 100 micron d'épaisseur) d'un matériel adsorbant (phase solide). Dans un échantillon liquide ou dans « l'espace de tête » (head space, atmosphere entourant un échantillon liquide ou un organisme) les analytes sont exposés à la fibre adsorbante (pendant un temps suffisant) et se distribuent entre la matrice de l'échantillon et la fibre.

Après (équilibre) extraction la fibre est retranchée/retournée dans l'aiguille de la seringue puis :

-directement transférée pour injection dans un appareil de GC au niveau duquel l'analyte est désorbé par augmentation de température avant de continuer son chemin à travers le dispositif d'analyse ou alors

-La fibre est introduite dans un solvant adéquat qui permet de désorber l'analyte avant de le récupérer pour analyse HPLC ; Certains appareils pour HPLC sont

pourvu d'un compartiment special, integré à l'appareil, pour la desorption et l'injection automatique de l'échantillon liquide dans la suite du dispositif d'analyse.

La SPME est particulierement pratique pour l'échantillonnage ciblé, in vivo ou in situ pour le travail sur le terrain.

La SPME sera illustrée par des videos.

# Bon courage



## LIENS UTILES 🙌

### Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

