



HAL
open science

Développement de méthodes associant des étapes de traitement de l'échantillon, de chromatographie en couplage avec la spectrométrie de masse pour l'analyse des agents chimiques toxiques

Khirreddine Bouchouareb

► To cite this version:

Khirreddine Bouchouareb. Développement de méthodes associant des étapes de traitement de l'échantillon, de chromatographie en couplage avec la spectrométrie de masse pour l'analyse des agents chimiques toxiques. Chimie analytique. Sorbonne Université, 2022. Français. ⟨NNT : 2022SORUS214⟩. ⟨tel-03813705⟩

HAL Id: tel-03813705

<https://theses.hal.science/tel-03813705v1>

Submitted on 13 Oct 2022

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

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



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

ED 388

Spécialité Chimie Analytique

Présentée par

Khirredine BOUCHOUAREB

Pour obtenir le grade de

Docteur de Sorbonne université

**Développement de méthodes associant des étapes de traitement de
l'échantillon, de chromatographie en couplage avec la spectrométrie de
masse pour l'analyse des agents chimiques toxiques**

Thèse dirigée par **Mme Valérie PICHON (Pr)**

Soutenance prévue le 08 Septembre 2022, devant le jury composé de :

M. Didier THIEBAUT, Directeur de Recherches, CNRS, CBI, ESPCI

M^{me} Hélène BUDZINSKI, Directeur de Recherches, CNRS, Université de Bordeaux

M. Francois LESTREMAU, HDR, École Nationale Supérieure des Mines d'Alès

M^{me} Anne BOSSEE, Docteur, DGA Maitrise NRBC

M^{me} Valérie PICHON, Professeur, Sorbonne université, Paris

M^{me} Audrey COMBES, Maître de conférences, ESPCI, Paris

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Membre invitée

UMR Chimie, Biologie et Innovation 8231 CNRS-
ESPCI Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et
Miniaturisation

Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris
(ESPCI Paris) 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05

Remerciements

Le travail que je présente dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire des Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM) de l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI) avec le financement de l'Etat Algérien.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude à madame Hélène BUDZINSKI, directrice de recherche au CNRS ainsi qu'au docteur François LESTREMAU de l'École Nationale Supérieure des Mines d'Alès, d'avoir accepté de juger la qualité de mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. J'adresse également mes remerciements à monsieur Didier THIEBAUT, directeur de recherche au CNRS et au docteur Anne BOSSEE de la DGA Maitrise NRBC pour leur implication et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit.

Mes remerciements vont bien évidemment à ma directrice de thèse, le Professeur Valérie Pichon ainsi qu'à mon encadrante, le docteur Audrey Combes pour leur soutien sans faille et leur disponibilité. Je les remercie toutes les deux de cette merveilleuse entente au cours de ces quatre années de thèse. Leurs conseils, toujours complémentaires, ne m'ont jamais fait défaut.

Un grand merci à Jérôme VIAL pour son expertise en chimométrie et son aide précieuse et surtout de m'avoir invité de suivre son cours.

A tous les membres du laboratoire LSABM anciens et nouveaux venus, votre rencontre a été pour moi un véritable enrichissement et une opportunité d'échanges et d'apprentissage, Merci à tous ! Mention spéciale pour Cécile, Anastasia, Pauline, Amira, Pengchao, Helena et Fanny avec qui j'ai partagé le bureau !

Un remerciement spécial à l'ex Directeur Général de l'INCC/GN : M. Sid Ahmed Berroumana et à mes collègues Haroun, Benlaribi et Khiari pour leur mobilisation qui a permis la concrétisation de ce projet.

Je voudrai aussi remercier mes parents, mes frères et sœurs ainsi que tous mes amis en France qui ont toujours répondu présents aux moments où j'avais besoin de leur aide ou de leur soutien. Particulièrement: Houcine, Rahim, Yacine, Zakaria et Youcef.

Finalement, je dédie ce manuscrit à ma femme. Un immense merci à elle pour m'avoir toujours soutenu et accompagné. Et surtout, je la félicite pour son endurance et sa patience face à mon irritabilité sur les derniers mois ! Ce manuscrit, c'est aussi le sien ! Et celui de mes deux adorables enfants Amine et Nelya.

AVERTISSEMENT AU LECTEUR

Cette thèse est rédigée comme une succession de chapitres, dont certains sont construits sur la structure d'articles (publiés ou soumis) pouvant se lire indépendamment. Ceci engendre des changements entre la langue française et anglaise ainsi que quelques redondances.

TABLES DES MATIERES

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| TABLES DES MATIERES | 3 |
| LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS | 5 |
| PUBLICATIONS..... | 5 |
| COMMUNICATIONS ORALES | 5 |
| COMMUNICATIONS PAR AFFICHE..... | 6 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 8 |
| INTRODUCTION GENERALE | 10 |
| PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 12 |
| CHAPITRE I: LA CHIMIE DES AGENTS TOXIQUES DE GUERRE ET LEURS PRODUITS DE DEGRADATION | 17 |
| I.1. LES AGENTS CHIMIQUES TOXIQUES DE GUERRE | 18 |
| I.2. LES AGENTS NEUROTOXIQUES DE GUERRE ET LEURS PRODUITS DE DEGRADATION..... | 19 |
| I.2.1. <i>Les agents neurotoxiques de guerre et leurs simulants</i> | 19 |
| I.2.2. <i>Les produits de dégradations des agents neurotoxiques de guerre</i> | 21 |
| I.2.3. <i>Structures et propriétés des acides alkyl méthylphosphoniques</i> | 23 |
| CHAPITRE II: LES TECHNIQUES D'ANALYSES ET LES METHODES DE TRAITEMENT DE L'ECHANTILLONS APPLICABLES AUX AMPA | 25 |
| II.1. LES TECHNIQUES D'ANALYSE DES ACIDES ALKYL METHYLPHOSPHONIQUES | 26 |
| II.1.1. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (GC) ET DERIVATION | 26 |
| II.1.2. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE (LC)..... | 28 |
| II.2. TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON ET LEURS APPLICATIONS DANS LE DOMAINE D'ANALYSE DES ACIDES ALKYL METHYLPHOSPHONIQUES | 33 |
| II.2.1. L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE (ELL)..... | 34 |
| II.2.2. L'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPE)..... | 36 |
| II.2.3. LES METHODES MINIATURISEES | 44 |
| II.2.3.1. <i>La microextraction en phase solide (SPME)</i> | 44 |
| II.2.3.2. <i>La microextraction sur barreau aimanté (SBSE)</i> | 47 |
| II.2.3.3. <i>La microextraction en phase solide dispersive (DSPE)</i> | 48 |
| II.2.3.4. <i>La microextraction sur simple goutte (SDME)</i> | 50 |
| II.2.3.5. <i>La microextraction liquide-liquide dispersive (DLLME)</i> | 52 |
| II.2.3.6. <i>La microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME)</i> | 53 |
| II.2.3.7. <i>La microextraction liquide assistée par électromigration</i> | 62 |
| II.2.3.8. <i>L'extraction liquide assistée par membrane parallèle artificielle (PALME)</i> | 68 |
| II.2.3.9. <i>La microextraction liquide par électromigration assistée par membrane parallèle artificielle</i> | 79 |
| PARTIE EXPERIMENTALE | 81 |
| CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MICROEXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ASSISTEE PAR MEMBRANE ET PARALLELISEE DE PRODUITS DE DEGRADATION D'ARMES CHIMIQUES DANS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES..... | 82 |
| III.1. ESSAIS PRELIMINAIRES DE MISE AU POINT D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DES COMPOSES CIBLES PAR LC-MS/MS | 84 |
| III.2. REFLEXION SUR LES PARAMETRES CLES A ETUDIER LORS DU DEVELOPPEMENT DE LA METHODE PALME..... | 85 |
| III.3. PARALLEL ARTIFICIAL LIQUID MEMBRANE EXTRACTION OF ORGANOPHOSPHORUS NERVE AGENT DEGRADATION PRODUCTS FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES | 87 |
| III.3.1. INTRODUCTION..... | 88 |
| III.3.3. EXPERIMENTAL..... | 90 |
| III.3.2.1. <i>Chemicals</i> | 90 |
| III.3.2.2. <i>Standard solutions and samples</i> | 91 |

| | | |
|--|--|------------|
| III.3.2.3. | <i>LC-MS/MS analysis</i> | 92 |
| III.3.2.4. | <i>Equipment and extraction set-up</i> | 92 |
| III.3.3. | RESULTS AND DISCUSSION..... | 93 |
| III.3.3.1. | <i>Optimization of PALME parameters</i> | 93 |
| III.3.3.2. | <i>Figures of merit of the PALME-LC-MS/MS method</i> | 103 |
| III.3.3.3. | <i>Application to environmental samples</i> | 104 |
| III.3.4. | CONCLUSION | 112 |
| CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE MICROEXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ASSISTEE PAR MEMBRANE ET PARALLELISEE BASEE SUR UNE NOUVELLE CLASSE DE SOLVANTS EMERGENTS VERTS DES PRODUITS DE DEGRADATION D'ARMES CHIMIQUES DANS LES URINES..... | | 113 |
| IV.1. DETERMINATION OF NERVE AGENT BIOMARKERS IN HUMAN URINE BY A NATURAL HYDROPHOBIC DEEP EUTECTIC SOLVENT-PARALLEL ARTIFICIAL LIQUID MEMBRANE EXTRACTION TECHNIQUE..... | | 117 |
| IV.1.1. | INTRODUCTION..... | 118 |
| IV.1.2. | EXPERIMENTAL..... | 122 |
| IV.1.2.1. | <i>Chemicals and reagents</i> | 122 |
| IV.1.2.2. | <i>Preparation of natural hydrophobic deep eutectic solvents</i> | 122 |
| IV.1.2.3. | <i>PALME procedure</i> | 123 |
| IV.1.2.4. | <i>LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions</i> | 124 |
| IV.1.3. | RESULTS AND DISCUSSION..... | 124 |
| IV.1.3.1. | <i>Preliminary evaluation of PALME on urine samples</i> | 124 |
| IV.1.3.2. | <i>Selection of the green solvent for the supported liquid membrane</i> | 126 |
| IV.1.3.3. | <i>Analytical figures of merit of the PALME-LC-MS/MS method</i> | 129 |
| IV.1.3.4. | <i>Evaluation of the sample method greenness according to the 10 principles of Green Sample Preparation</i> 131 | |
| IV.1.3.5. | <i>Comparison of the developed method with previous extraction methods</i> | 132 |
| IV.1.4. | CONCLUSION | 136 |
| IV.2. EVALUATION DES PRETRAITEMENTS DES ECHANTILLONS D'URINE AVANT L'APPLICATION DE LA METHODE PALME : | | 137 |
| CONCLUSION GENERALE ET PRESPECTIVES..... | | 140 |
| ANNEXES | | 143 |
| ANNEXE 1 : | TABLEAUX DES PRODUITS CHIMIQUES DE LA CONVENTION | 144 |
| ANNEXE 2 : | PROCEDURE PALME | 149 |
| ANNEXE 3 : | SUPPLEMENTARY MATERIAL – ARTICLE 1 | 151 |
| ANNEXE 4 : | SUPPLEMENTARY MATERIAL – ARTICLE 2 | 155 |
| LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES..... | | 159 |
| LISTE DES FIGURES | | 159 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | | 161 |
| REFERENCES | | 163 |
| RESUME..... | | 182 |
| ABSTRACT..... | | 183 |

LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Parallel artificial liquid membrane extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental samples”, *Analytica Chimica Acta*, 1190 (2022) 339261.

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Determination of nerve agent biomarkers in human urine by a natural hydrophobic deep eutectic solvent-parallel artificial liquid membrane extraction technique”, *Talanta*, 249 (2022) 123704.

COMMUNICATIONS ORALES

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental samples”, XXIII International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech), virtuellement à Alicante, Espagne, 30 Juin au 2 Juillet 2021.

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Développement d’une méthode de microextraction liquide-liquide assistée par membrane et parallélisée (PALME) de produits de dégradation d’armes chimiques dans des matrices complexes”, Journée de l’AFSEP, Paris, France, 09 Décembre 2021.

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Parallel artificial liquid membrane extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental and biological samples”, CBI Seminar, Paris, France, 30 Mars 2022.

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Développement d'une méthode de microextraction liquide-liquide assistée par membrane et parallélisée (PALME) de produits de dégradation d'agents neurotoxiques de guerre dans des matrices environnementales et biologiques”, Journée des doctorants de l’Ecole Doctorale 388, Paris, France, 17 Juin 2022.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Développement d’une méthode de microextraction liquide-liquide assistée par membrane en format 96-puits pour le suivi de produits de dégradation d’armes chimiques”, 14^{ème} Congrès Francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l’AFSEP, Paris, France, 5-7 Octobre 2021.

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental and biological samples”, 17th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology (HTC-17), Gand, Belgique, 18-20 Mai 2022. (**Prix de meilleur poster** dans la catégorie du Traitement de l’Echantillon).

K. BOUCHOUAREB, A. Combès, V. Pichon “Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction using Deep Eutectic Solvents of organophosphorus nerve agent degradation products from urine samples”, 50th International Symposium and Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2022), San Diego, Californie, USA, 18-23 juin 2022.

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|----------------|---|
| AED : | Détection par émission atomique |
| AMPA : | Acides alkyl méthylphosphoniques |
| BSTFA : | N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide |
| C18 : | Chaîne de carbone octadécyl |
| CE : | Électrophorèse capillaire (Capillary electrophoresis) |
| CIAC : | Convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques et sur leur destruction |
| CMPA : | Acide cyclohexyl méthylphosphonique |
| DAS : | Dilution puis injection (Dilute and shoot) |
| DES : | Liquides eutectiques profonds (Deep eutectic solvents) |
| DLLME : | Micro extraction liquide-liquide dispersive |
| DSPE : | Microextraction en phase solide dispersive |
| EF ou EF : | Facteur d'enrichissement (Enrichment factor) |
| EME : | Microextraction liquide assistée par électromigration |
| EMPA : | Acide éthyl méthylphosphonique |
| GA : | Tabun |
| GB : | Sarin |
| GC : | Chromatographie en phase gazeuse |
| GD : | Soman |
| GF : | Cyclosarin |
| HBA : | Accepteur de liaison hydrogène (Hydrogen bond acceptor) |
| HBD : | Donneur de liaison hydrogène (Hydrogen bond donor) |
| HD : | Gaz moutarde ou Ypérite |
| HDES : | Liquides eutectiques profonds hydrophobes |
| HF-EME : | Microextraction liquide assistée par électromigration sur fibre creuse |
| HF-LPME : | Microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse |
| iBMPA : | Acide isobutyl méthylphosphonique |
| ILs : | Liquides ioniques |
| iPrMPA : | Acide isopropyl méthylphosphonique |
| K : | Coefficient de partage |
| LC : | Chromatographie en phase liquide (Liquid chromatography) |
| LOD : | Limite de détection (Limit of detection) |
| LOQ : | Limite de quantification (Limit of quantification) |
| LLE ou ELL : | Extraction liquide-liquide (Liquid-liquid extraction) |
| LPME : | Microextraction en phase liquide (Liquid phase microextraction) |
| MPA : | Acide méthylphosphonique |
| MS : | Spéctrométrie de masse |
| MTBSTFA : | N-tert-Butyldiméthylsilyl-N-méthyltrifluoroacétamide |
| NaHDES : | |
| OIAC ou OPCW : | Organisation d'Interdiction des Armes Chimiques (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons) |
| OPNA | Agents neurotoxiques organophosphorés |
| Pa-EME : | Microextraction liquide par électromigration assistée par membrane parallèle artificielle (Parallel electromembrane extraction in the 96-well format) |

| | |
|------------------------------------|--|
| PALME : | Extraction liquide assistée par membrane parallèle artificielle (Parallel artificial liquid membrane extraction) |
| PDMS : | Polydiméthylsiloxane |
| PEG : | Polyéthylènes glycols |
| PGC : | Carbone graphite poreux |
| PMPA : | Acide pinacolyl méthylphosphonique |
| PP : | Polypropylène |
| PVDF : | Difluorure de polyvinylidène |
| R% : | Rendement (Recovery) |
| RPM : | Rotations par minute |
| RSD : | Ecart type relatif (Relative standard deviation) |
| S/N : | Rapport signal sur bruit |
| SAX : | Phase solide échangeuse d'anions forts |
| SBSE : | Microextraction sur barreau aimanté |
| SCX : | Phase solide échangeuse de cations forts |
| SDME : | microextraction sur simple goutte |
| SLM : | Extraction liquide supportée par membrane |
| SPE : | Extraction en phase solide (Solid phase extraction) |
| SPME : | Microextraction en phase solide |
| TBDMS : | Terbutyl diméthylsilyl |
| TDG : | Thiodiglycol |
| TMPAH : | Hydroxyde de phényle triméthylammonium |
| TMS : | Triméthylsilyl |
| TOA : | Trioctylamine |
| UV : | Ultra-violet (Ultraviolet) |
| V _a et V _d : | Volumes accepteur et donneur |
| VX : | S-[2-(diisopropylamino)éthyl]méthylphosphonothioate d'O-éthyle |

INTRODUCTION GENERALE

Depuis leur utilisation à grande échelle durant la première guerre mondiale, l'exposition des populations civiles ou militaires à des agents chimiques de guerre, qu'elle soit intentionnelle ou accidentelle, demeure une préoccupation majeure pour la communauté internationale. C'est la raison pour laquelle un traité international de désarmement connu sous le nom de Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) a été signé à Paris en Septembre 1993 et est entré en vigueur en Avril 1997 pour interdire le développement, la production, le stockage et l'utilisation des armes chimiques. Afin de veiller à l'application effective de ses dispositions, l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC) a été créée et a permis la destruction de 99 % des stocks d'armes chimiques déclarés par les États détenteurs. Il existe cependant des réserves non déclarées dans certains pays et leur facilité de synthèse à partir de produits disponibles commercialement augmente la probabilité de leur utilisation comme arme de destruction massive. Parmi toutes les classes d'agents chimiques de guerre, les agents neurotoxiques organophosphorés (OPNA) sont les plus toxiques. Par ailleurs, leur utilisation a été récemment rapportée comme lors de l'utilisation du gaz sarin en 2013 puis en 2017 en Syrie ou le Novichok en 2018 et 2020 dans des tentatives d'assassinat. Ainsi, ils constituent la cible prioritaire du système d'inspection administré par l'OIAC. Cependant, la majorité de ces agents se dégradent rapidement dans un environnement aqueux pour donner naissance à des produits d'hydrolyse, les acides alkyl méthylphosphoniques (AMPA) plus stable que leurs molécules parentes. Ainsi, la preuve d'attaques chimiques par les OPNA peut être également apportée par la mise en évidence de ces produits de dégradation dans des échantillons environnementaux et/ou biologiques.

Par ailleurs, l'utilisation des OPNA implique souvent leur large dispersion dans l'environnement afin de causer le plus de dégâts possibles. Aussi, suite à de tels attaques chimiques, des centaines d'échantillons environnementaux et/ou biologiques peuvent être collectés afin d'être analysés. Au vu de l'urgence de telles situations, il est indispensable que ce grand nombre d'échantillons soient traités le plus rapidement possible grâce à des techniques de traitements de l'échantillon permettant le traitement à haut débit.

Parallèlement, il apparaît aujourd'hui important de prendre en compte la demande sociétale grandissante visant au développement de stratégies alternatives pour développer des méthodes de traitement de l'échantillon plus « vertes » par la diminution notamment de l'utilisation de solvants organiques nocifs pour la santé humaine et l'environnement.

L'objectif principal de cette thèse a donc été le développement d'une méthode de traitement d'échantillons efficace pour la détermination des produits de dégradation des OPNA dans des échantillons aqueux, d'origine environnementale ou biologique, regroupant l'ensemble des avantages suivants : facile à

mettre en œuvre, fiable, robuste, sensible et permettant le traitement d'échantillons à haut débit tout en respectant les principes de la chimie analytique verte.

Une étude biobibliographique a donc été réalisée pour mieux cerner la problématique de la thèse. Le premier chapitre est dédié à la présentation des agents toxiques de guerre et plus particulièrement à leurs produits de dégradation, les AMPA. Ensuite, un deuxième chapitre bibliographique a été consacré à la présentation des méthodes d'analyses et de traitement de l'échantillons applicables aux composés cibles présents dans des matrices aqueuses. Cela a conduit au choix de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) pour l'analyse des analytes d'intérêt. Parmi les méthodes de traitement de l'échantillon décrites dans la littérature, la microextraction assistée par fibre creuse (HF-LPME) semble être la plus intéressante. Cependant, elle reste inadaptée au traitement d'échantillons à haut débit. C'est la raison pour laquelle une autre variante à la HF-LPME, qui permet le traitement de 96 échantillons en parallèle, et nommée l'extraction liquide assistée par membrane parallèle artificielle (PALME) a été retenue pour l'extraction des AMPA. Cette méthode est basée sur le même principe de fonctionnement que la HF-LPME avec pour avantage, comme son nom l'indique, de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons en parallèle. Néanmoins, cette parallélisation implique un changement de géométrie du système qui n'est pas sans conséquences sur les performances attendues en termes de rendements et de durée d'extraction.

Ainsi, un premier chapitre expérimental décrit l'optimisation des différents paramètres influençant l'efficacité de l'extraction des AMPA en milieu pur. Suite à cette optimisation, la PALME a été appliquée en premier lieu à l'extraction des AMPA à partir de matrices environnementales tel que les eaux usées simulées, une eau de rivière ou un extrait aqueux de sols. Ce chapitre se termine par une étude comparative entre la PALME et la HF-LPME des AMPA.

Un second chapitre porte sur l'amélioration de « l'aspect vert » de la méthode PALME par l'étude de solvants émergents tel que les liquides ioniques (IL) et les solvants eutectiques profonds (DES) en remplacement du solvant organique classique « octanol » utilisé précédemment. Cette nouvelle méthode a alors été appliquée sur des échantillons d'urines dopés avec les AMPA ciblées pour évaluer son potentiel pour une application toxicologique permettant d'établir une contamination ou une intoxication par les OPNA.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'Homme a cherché à concevoir et développer des armes pour se défendre. Pour se faire, il a fait appel à toutes les ressources qui existaient dans son environnement y compris des produits chimiques. En effet, l'utilisation d'arme chimique est apparue sous sa forme la plus primitive dans la chasse par l'utilisation d'armes empoisonnées (flèches, lances), l'empoisonnement de l'eau (points d'eau, pêche) ou la fumigation d'animaux avec des produits de combustion toxiques [1] (Figure 1). Les chinois sont considérés comme étant les premiers à utiliser des armes chimiques à proprement parlé en ayant recours à des fumées d'arsenic il y a près de 3000 ans. Les fumées et les flammes toxiques ont continué d'être utilisées durant près de 2000 ans dans différentes guerres en Eurasie. Néanmoins, les agents chimiques de guerre à proprement parlé ont principalement été développés pendant la fin du XIX^{ème} et le début du XX^{ème} siècle grâce au progrès effectués dans le domaine de la chimie de synthèse. Leur utilisation massive n'est donc apparue que lors de la première guerre mondiale et leur développement technique s'est poursuivi pendant la deuxième guerre mondiale puis pendant la guerre froide [2].

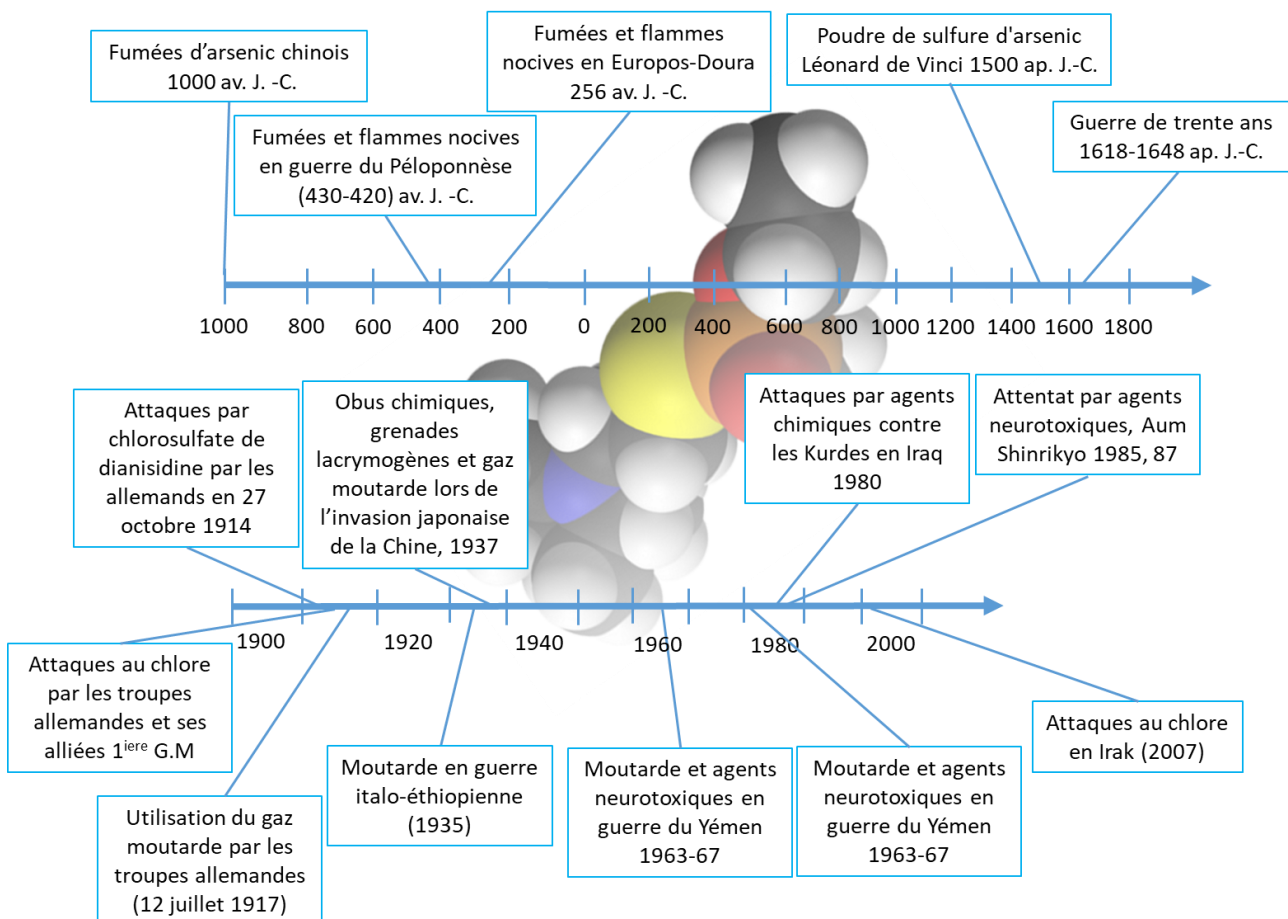


Figure 1 : Chronologie des accidents sérieux liés à l'utilisation de substances toxiques comme agents chimiques de guerre. Adapté de [2].

Le monde entier a progressivement pris conscience de l'ampleur de la terreur causée par ces armes de destruction massive conduisant la communauté internationale à œuvrer pour mettre fin à l'utilisation de ce type d'armes par la signature du protocole de Genève en 1925. Ce n'est que suite à la signature à Paris de la Convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques et sur leur destruction (encore appelée Convention sur l'interdiction des armes chimiques, abréviation : CIAC) en 1993 que le stockage a été banni. L'entrée en vigueur effective de la CIAC a eu lieu en 1997, et l'Organisation d'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC) a également été mise en place pour veiller à l'application effective de cette convention [3].

Depuis sa création, l'OIAC a réussi à accompagner le processus d'élimination de la quasi-totalité (99%) des armes chimiques existantes qui devait prendre fin le 29 avril 2012. Néanmoins un temps supplémentaire a été accordé puisque certains Etats-membres n'étaient pas dans la possibilité d'atteindre cet objectif [4]. Ainsi, le risque d'une guerre chimique entre Etats est de plus en plus réduit. Malheureusement, le risque de l'utilisation de ces produits chimiques toxiques a pris une autre forme inquiétante via des actions terroristes. En effet, le recours à l'empoisonnement par des substances toxiques a toujours existé mais le développement technico-scientifique dans le domaine de la chimie et de la synthèse organique a conduit à l'apparition de nouveaux agents chimiques encore plus toxiques, méconnus par les laboratoires de criminalistique et de médecine légale, et donc difficiles à identifier.

Plusieurs auteurs croient à la combinaison du terrorisme et des armes de destruction massive qui résulte en une nouvelle forme de terrorisme appelée ultra-terrorisme [1], d'autant que la documentation et les moyens de synthèse de ce type de composés chimiques sont d'un accès facile pour le grand public [5, 6], comme en témoignent les attaques dans le métro de Tokyo en 1995, œuvre de la secte Aum Shinrikyo [7].

L'empoisonnement de l'agent russe Sergei Skripal et de sa fille par l'agent neurotoxique NOVICHOK le 4 mars 2018 est un exemple de l'utilisation de nouvelles substances toxiques comme « outil » de terreur [8, 9]. Plusieurs études ont été menées pour lever le mystère sur ces molécules toxiques de conception russe, en récoltant toutes les données existantes [10, 11, 12]. Leur structure générique a été donnée [13] ainsi que les spectres de masse de ces nouvelles molécules pour enrichir la base de données des produits chimiques faisant l'objet de contrôle et de vérification par la CIAC, l'OCAD (Organization for the Prohibition of Chemical Weapons Central Analytical Database) [14].

La lutte contre cette forme de criminalité ne peut se faire que par le développement des techniques d'investigations utilisées par les enquêteurs dans le cadre des sciences criminalistiques qui visent l'étude des scènes de crime en exploitant les traces existantes en respect au principe d'échange de Locard [15]. Actuellement, le laboratoire de l'OIAC ne s'intéresse qu'à l'analyse des composés chimiques ayant trait à la convention, sans pour autant donner de l'importance à d'autres types d'indices qui peuvent résoudre ces

affaires. Raison pour laquelle une nouvelle approche d'investigation plus généraliste a été adoptée. Cette dernière nécessite plus de moyens. Ainsi elle a constitué l'une des motivations principales qui a fait que le laboratoire de l'OIAC sera abandonné au profit d'un nouveau centre «ChemTech Centre», plus grand en terme de surface et beaucoup mieux équipé pour répondre aux exigences et défis actuels [16].

De nombreuses études ont portées sur les risques et les impacts sur la santé et l'environnement des agents chimiques toxiques de guerre [17, 18, 19, 20, 21]. Parmi les problèmes environnementaux réels existants en lien avec les agents chimiques toxiques de guerre, l'abandon et le déversement des armes chimiques dans la mer Baltique et à l'est de l'île de Bornholm suite au désarmement de l'Allemagne après la seconde guerre mondiale continuent de questionner les scientifiques. En effet, environ 50000 tonnes d'armes chimiques (armes, munitions, équipements associés vides ou chargés) et environ 15000 tonnes d'agents chimiques ont été déversées dans ces zones [22]. La problématique de la contamination de la mer, des organismes marins et même de l'homme suite à la consommation du poisson pêché dans la région a été traitée [23, 24, 25, 26, 27]. C'est dans ce cadre que plusieurs projets de recherche ont été lancés comme le projet «CHEMSEA» (*Chemical Munitions Search & Assessment*) financé par l'Union Européenne qui porte sur l'amélioration des méthodes d'analyse et de détection de ces composés et sur l'évaluation de leur impact possible sur l'environnement [28]. La même problématique a été soulevée pour le déversement des résidus de guerre et des munitions après la deuxième guerre mondiale dans le sud de la mer adriatique dans la méditerranée [29].

L'analyse chimique constitue une partie importante des activités menées dans le cadre de la CIAC [30]. Pour permettre son application effective, une liste non-exhaustive des produits chimiques toxiques doivent faire l'objet de mesures de vérification et de contrôle [31]. Au vu de la sensibilité de ses missions, l'OIAC a toujours veillé à disposer d'un réseau de laboratoires compétents pour l'analyse des échantillons dans le cadre de l'application des dispositions de la convention. Pour se faire, elle dispose d'un programme de tests de d'aptitudes qui se base sur l'envoi d'échantillons dopés par des analytes d'intérêt à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$ aux laboratoires visant à intégrer ou à garder leurs places dans le réseau [32, 33, 34].

De mai 1996 à avril 2018, 46 tests d'aptitude officiels de l'OIAC ont été conduits et ont permis la désignation de 22 laboratoires dans le monde entier, dont 10 en Europe et 2 aux Etats Unis d'Amérique. La France dispose d'un seul laboratoire désigné, à savoir le département de chimie analytique de la Direction Générale de l'Armement (DGA). Par ailleurs, l'Afrique ne dispose d'aucun laboratoire désigné à ce jour [35].

Par ailleurs, les tests d'aptitudes de l'OIAC visent principalement des matrices environnementales dopés à des concentrations relativement élevées de l'ordre de $1 \mu\text{g/ml}$. Cependant, le besoin d'identifier les

composés dans des matrices plus complexes à l'état de traces (quelques ng/ml) a conduit à une réflexion sur la mise en place d'une autre série de tests désignés exclusivement pour les matrices biologiques. Il s'agit des tests d'aptitudes biologiques[36]. Actuellement, 17 laboratoires au monde font partie de ce réseau dont le laboratoire français de la DGA déjà accrédité pour l'analyse des armes chimiques dans des matrices biologiques [37].

CHAPITRE I :

La chimie des agents toxiques de guerre et leurs produits de dégradation

I.1. Les agents chimiques toxiques de guerre

Ces agents chimiques appartiennent à différentes familles ayant des propriétés physico-chimiques différentes. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères :

(i) leur volatilité qui permet de les classer en tant qu'agents persistants ou non persistants. Plus l'agent est volatil, plus il s'évapore et se disperse rapidement. Les agents les plus volatils tels que le chlore, le phosgène et le cyanure d'hydrogène sont des agents non persistants, tandis que les agents moins volatils tels que le gaz moutarde et le VX sont des agents persistants. (ii) leur structure chimique : ils peuvent être classés en composés organophosphorés (OP), organosulfurés, organofluorés et arséniés. (iii) leurs effets physiologiques. On trouve les agents neurotoxiques comme le VX, les agents vésicants comme le gaz moutarde (HD), les agents hémotoxiques comme le cyanure d'hydrogène, les agents suffocants comme le phosgène, les agents anti-émeute comme le gaz lacrymogènes (CS), les agents psychomimétiques comme le benzilate de 3-quinuclidinyl (BZ) et les toxines produites de manière naturelle comme la toxine botulique (issue de bactérie), la saxitoxine (issue d'algues) et la ricine (issue de plantes) [38].

Par ailleurs, l'OIAC dispose également d'un classement spécifique lui permettant la mise en œuvre des dispositions de la convention [39]. Les produits chimiques toxiques sont répertoriés et classés en trois (03) tableaux. Où chaque tableau est divisé en deux parties : A- produits toxiques et B- les précurseurs de synthèses (Voir Annexe 1).

La majorité des produits chimiques toxiques inclus dans les tableaux de la convention concernent les trois classes structurelles d'agents neurotoxiques et les trois classes structurelles de vésicants illustrées en Figure 2. À l'exception des moutardes azotées et du tabun, ces agents constituaient la majeure partie des stocks de produits chimiques toxiques déclarés suite aux termes de la convention [40].

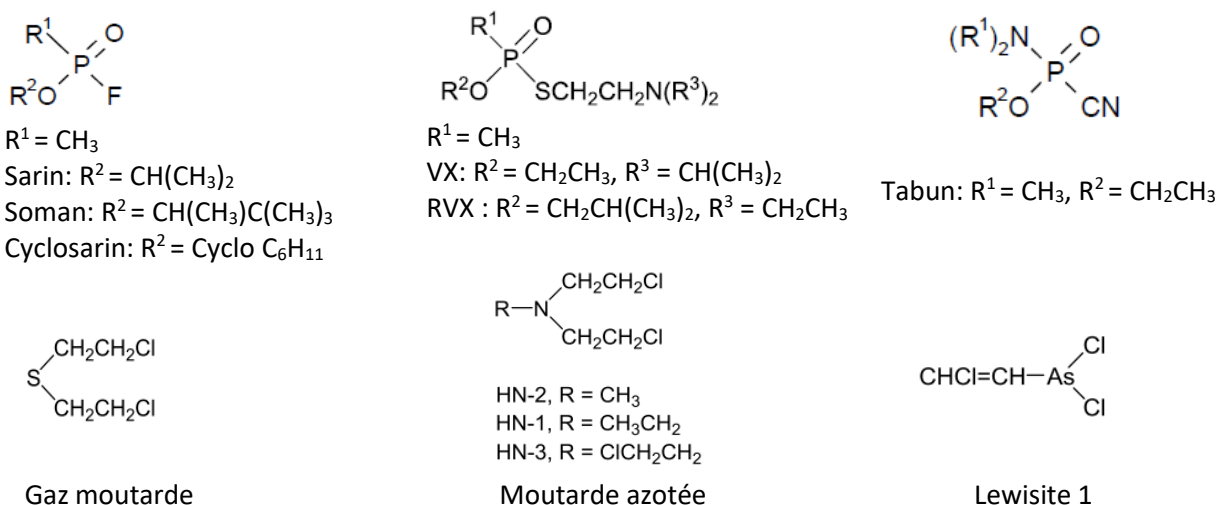


Figure 2 : Structure des principaux agents chimiques toxiques [40]

I.2. Les agents neurotoxiques de guerre et leurs produits de dégradation

I.2.1. Les agents neurotoxiques de guerre et leurs simulants

Les agents chimiques neurotoxiques de guerre font partie des composés toxiques contrôlés par la convention. Il s'agit de produits organophosphorés qui sont généralement divisés en deux classes : les agents de type G et V. Les plus courants des agents G sont le : tabun (GA), sarin (GB), soman (GD), cyclohexyl methylphosphonofluoridate (GF). Et pour la classe V, on peut citer le VX comme exemple [41].

Les agents neurotoxiques organophosphorés (OPNA) sont les agents chimiques les plus dangereux. Ils ont en effet, un mécanisme de toxicité assez particulier, basé sur l'inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase, une enzyme présente dans de nombreux organismes vivants, qui libère de l'acétylcholine (neurotransmetteur) par les récepteurs nerveux. Cette inhibition empêche la transmission de toute impulsion nerveuse dans l'organisme affecté. Ce même mécanisme de toxicité est utilisé pour la conception de certains pesticides [42]. Les concentrations létales (DL50) pour ces agents de guerre neurotoxiques peuvent atteindre 0,07 mg/kg pour l'être humain. La Figure 3, illustre une comparaison des différents types d'agents chimiques toxiques sur la base de leur toxicité par deux voies : inhalation et exposition par voie cutanée. Les composés toxiques sont disposés selon une échelle verticale qui les classe selon la concentration létale médiane pour l'inhalation (CLt50 en mg min/m³) et une échelle horizontale qui les classe selon la dose létale médiane pour l'exposition cutanée (DL50 en mg/kg de poids corporel) [43].

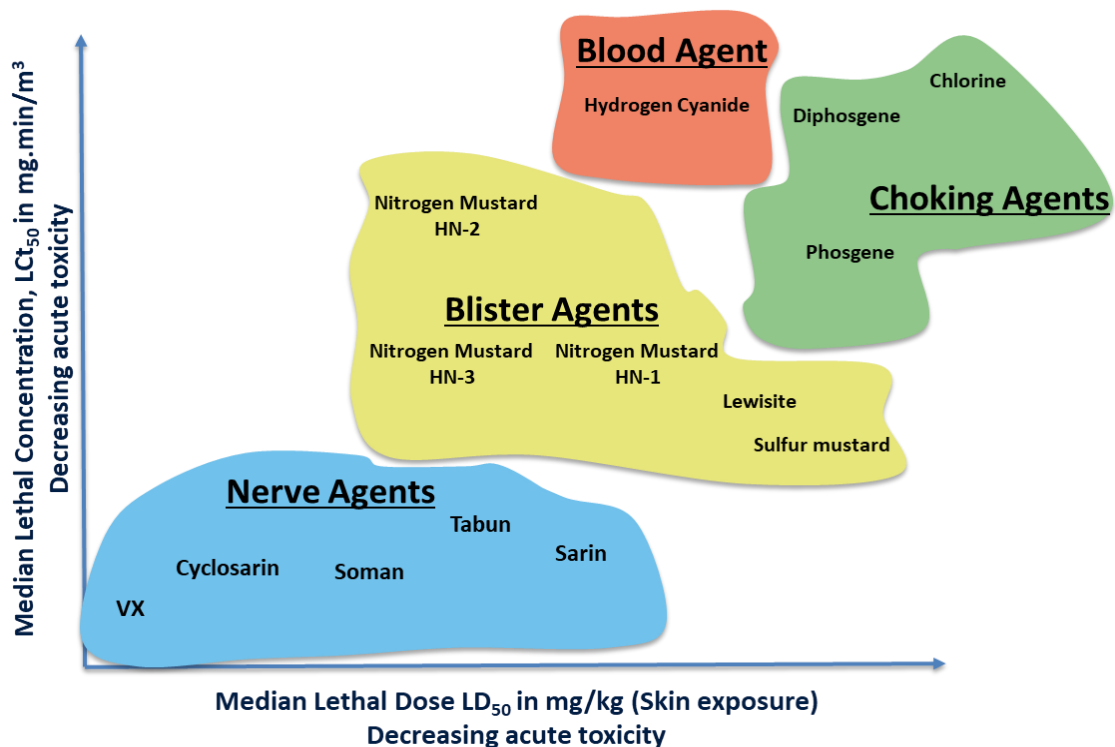


Figure 3 : Echelle de toxicité relative des agents chimiques de guerre. Adapté de [43].

Certaines propriétés physico-chimiques des agents neurotoxiques sont résumées dans le Tableau 1. Il est important de signaler que ces composés chimiques ont une très faible volatilité, ce qui rend leur appellation « gaz neurotoxique » discutable car les agents neurotoxiques militaires sont principalement des liquides à la température ambiante. C'est lorsqu'ils sont dispersés en aérosol qu'ils constituent une grande menace par inhalation principalement [44].

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des agents chimiques neurotoxiques de guerre [44]

| | Pression de vapeur | Volatilité | Apparence | Odeur | Solubilité | Persistence |
|----------------------------|------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Tabun (GA) CAS#77-81-6 | 0,037 mm Hg à 20°C | 576-610 mg/m ³ à 25°C | Liquide clair à marron | Fruitée | 9,8 g/100 g à 25°C | T1/2= 24-36 heures |
| Sarin (GB) CAS#107-44-8 | 2,1 mm Hg à 20°C | 16400-22000 mg/m ³ à 25°C | Liquide clair | Sans odeur | Miscible | 2-24 heures à 5-25°C |
| Soman (GD) CAS#96-64-0 | 0,40 mm Hg à 20°C | 3060-3900 mg/m ³ à 25°C | Liquide clair | Fruitée ; huile de camphre | 2,1 g/100 g à 20°C | Relativement persistante |
| GF CAS#329-99-7 | 0,07 mm Hg à 25°C | 59 ppm | Liquide clair | Sans odeur | 3,7 g/100 g à 25°C | Inconnue |
| VX CAS#20820-80-8 | 0,0007 mm Hg à 20°C | 10,5 mg/m ³ à 25°C | Liquide épais clair à jaune | Sans odeur | Miscible à < 9,4°C | 2-6 jours |

La persistance d'un agent neurotoxique est définie par sa capacité à rester actif dans l'environnement après son utilisation. Les facteurs impactant leur persistance incluent la volatilité, la densité et la stabilité en cas d'exposition à la lumière et/ou à l'eau. Les agents les moins volatils mettent plus de temps à s'évaporer, tandis que les agents plus denses ont tendance à rester dans les zones proches du sol et sont moins susceptibles d'être dispersés par le vent. Ainsi, les agents de la série V ont tendance à avoir une plus grande persistance que les agents de la série G. Cependant, certains agents de la série G, en particulier le soman, peuvent être mélangés à des liquides visqueux pour augmenter leur persistance dans l'environnement [44].

Se procurer ce type de composés, même à de très faibles quantités pour des activités de recherche, demeure extrêmement compliqué, car il s'agit de produits très toxiques interdits à la vente. Plusieurs études dans ce domaine ont donc été faites grâce à des simulants, c'est-à-dire des composés ayant les mêmes caractéristiques physico-chimiques (température de fusion, volatilité, polarité, acidité...) que les composés d'intérêt mais moins toxique et disponibles commercialement [45]. A titre d'exemple : le diphényl chlorophosphate (DPCP) a été utilisé comme simulant des agents neurotoxiques de guerre (GA, GB et GD) et le diisopropyl méthylphosphonate (DIMP) comme simulant d'agents chimiques de guerre G lors d'études de décontaminations [46, 47]. L'Amiton (VG) a également été utilisé comme simulant courant du VX, notamment pour l'étude de leurs marqueurs et impuretés [48]. Cependant cette approche montre ses limites puisque pour pouvoir disposer de suffisamment de données sur seul un agent chimique de guerre, plusieurs simulants doivent être utilisés et étudiés [49].

1.2.2. Les produits de dégradations des agents neurotoxiques de guerre

En dépit de cette persistance relativement grande par rapport aux autres agents chimiques de guerre, les agents neurotoxiques de guerre subissent une dégradation rapide dans les milieux environnementaux ou biologiques par des réactions d'hydrolyse qui conduisent à la production de produits caractéristiques des organophosphorés par la liaison C-P qui n'existe pas pour d'autres organophosphorés comme certains herbicides. Cette dégradation intervient assez rapidement, dans un intervalle allant de quelques heures pour le sarin à quelques jours pour le VX (voir Tableau 1). La cinétique des réactions de dégradation de ces derniers démontre le potentiel existant en terme de mise en évidence de leur utilisation dans le temps. Un exemple de cette cinétique de dégradation pour le sarin (GB) en acide isopropyle méthylphosphonique (iPrMPA) puis en acide méthylphosphonique est présenté sur la Figure 4 [42]. Les paramètres principaux contrôlant cette cinétique de dégradation des agents neurotoxiques sont le pH du milieu et la température.

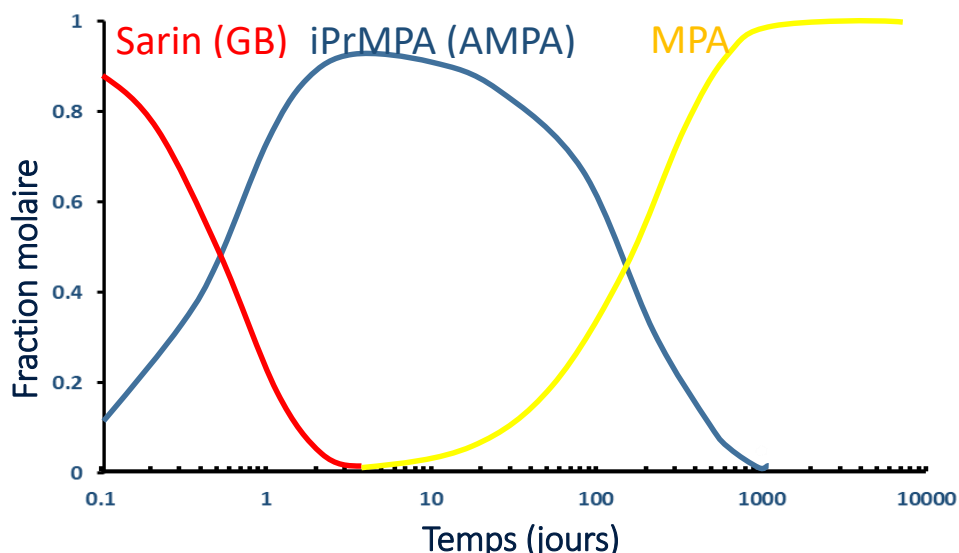


Figure 4 : Cinétique de dégradation du sarin dans le sol donnant de l'isopropyl méthylphosphonique iPrMPA puis l'acide méthylphosphonique (MPA). Adapté de [42].

Les produits de dégradation générés sont spécifiques à chaque agent neurotoxique et n'ont aucune source naturelle, ils sont donc des marqueurs précieux de l'utilisation d'agents neurotoxiques. Les acides alkyl méthylphosphoniques (AMPA) peuvent subir une hydrolyse supplémentaire par perte du groupement O-alkyle, ce qui donne l'acide méthylphosphonique non spécifique (MPA). La disponibilité de méthodes d'analyse sensibles pour la détermination des produits d'hydrolyse primaires peut donc être essentielle pour permettre de prouver l'utilisation d'agents neurotoxiques [50]. La Figure 5 présente leurs produits de dégradations qui peuvent être spécifiques comme les acides alkyl alkylphosphoniques et non spécifiques comme les acides alkylphosphoniques [51].

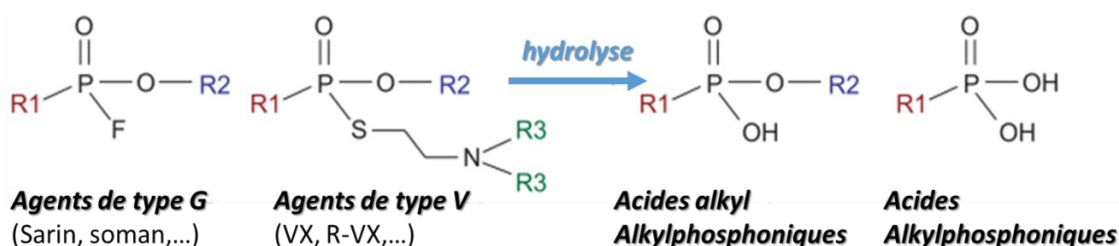


Figure 5: Dégradation des agents neurotoxiques en produits spécifiques et non-spécifiques. Adapté de [51].

Leur mécanisme de dégradation dépend d'une de leurs trois structures alkylphosphonofluoridates, alkyl alkylphosphonates ou type V.

- i) Les agents chimiques ayant la structure d'un alkyl alkylphosphonofluoridates donnent naissance à des acides alkyl alkylphosphoniques, produits primaires de cette réaction d'hydrolyse. Ils sont formés par le déplacement du fluorure. Une hydrolyse plus lente peut se produire par la suite pour donner des acides alkylphosphoniques, par la perte de l'alcool R²OH, comme indiqué sur la Figure 6 :

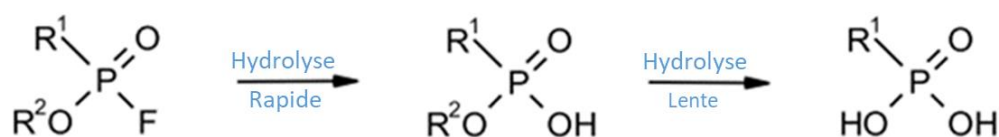


Figure 6: Mécanisme de dégradation des agents neurotoxique ayant la structure d'un alkyl alkylphosphonofluoridates comme le sarin. Adapté de [52].

Les alkyl alkylphosphonates et les acides alkylphosphoniques conservent le substituant P-alkyle et sont compris dans la définition générique des produits chimiques du tableau 2.B de l'annexe 1 de la convention. Les alcools, dans la plupart des cas, n'ont que peu d'utilité du point de vue criminalistique car ils sont largement utilisés dans l'industrie et d'autres applications quotidiennes.

- ii) Les agents neurotoxiques ayant la structure O-Alkyl N,N-dialkylphosphoramidocyanidates ont deux voies de réaction d'hydrolyse possible en fonction du pH. Soit par le déplacement du (R¹)₂NH₂⁺ en milieu acide ou du CN⁻ en milieu basique. Les produits formés s'hydrolysent par la suite en phosphates d'alkyle ou encore en acide phosphonique comme présenté sur la Figure 7.

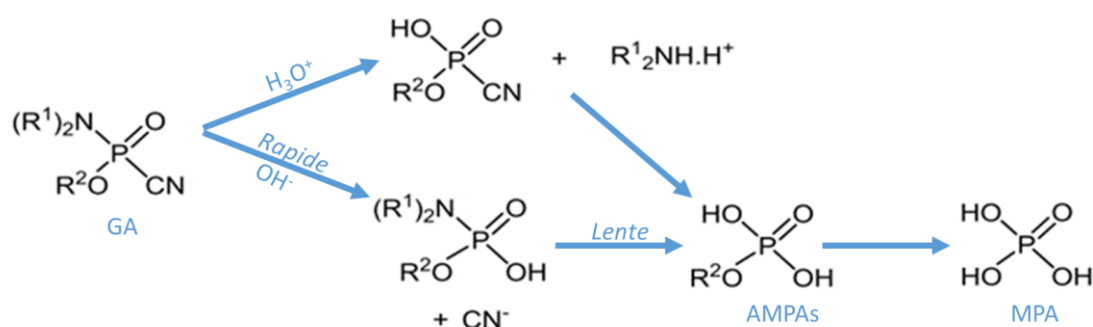


Figure 7 : Mécanisme de dégradation des agents neurotoxiques ayant la structure O-Alkyl N,N-dialkylphosphoramidocyanidates comme le Tabun. Adapté de [52].

Étant donné que cette classe d'agents neurotoxiques ne contient pas de substituant P-alkyle, leurs produits de dégradation ne sont pas des produits chimiques inscrits dans le cadre du régime de vérification. Certains acides alkylphosphoniques, comme l'acide éthylphosphonique, sont en effet des contaminants environnementaux omniprésents dérivés de pesticides et de plastifiants [52].

iii) Dans le cas des agents V, l'hydrolyse peut se produire selon trois voies (clivage des liaisons P – S, P – O et/ou S – C), en fonction du pH, de la température et de la concentration, comme présenté sur la Figure 8. Les voies 1 et 2 prédominent dans des conditions basiques ; la 3^{ème} voie est une voie mineure pour le VX dans des conditions faiblement basiques (avec R¹ = méthyle).

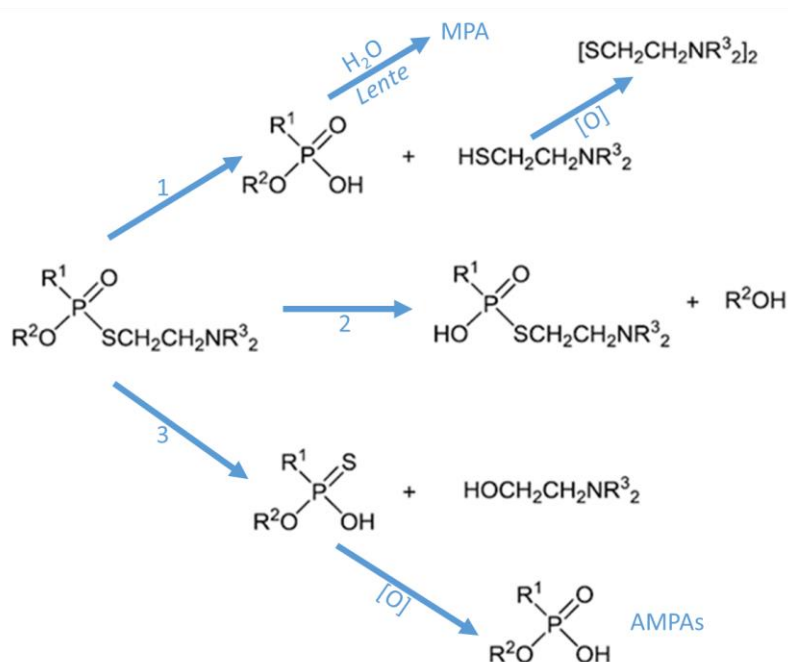


Figure 8 : Mécanisme de dégradation des agents neurotoxique de type V comme le VX. Adapté de [52].

La dégradation des agents neurotoxiques de guerre peut se faire également avec d'autres mécanismes que l'hydrolyse comme la photolyse, l'oxydation radicalaire et la biodégradation enzymatique par C-P lyase. Tous ces mécanismes ont été revu par Kingery et Allen mais l'hydrolyse reste la voie principale [42].

I.2.3. Structures et propriétés des acides alkyl méthylphosphoniques

Les acides alkyl méthylphosphoniques : acide isopropyl méthylphosphonique (IPrMPA), acide pinacolyl méthylphosphonique (PMPA), acide cyclohexyl méthylphosphonique (CMPA), acide éthyl méthylphosphonique (EMPA), acide isobutyl méthylphosphonique (iBMPA) sont les produits de dégradation spécifiques des agents neurotoxiques Sarin (GB), Soman (GD), cyclosarin (GF), VX et le VX russe (VR ou rVX) respectivement, tel que montré sur la Figure 9 [53]. Ils sont uniques en comparaison aux autres produits de dégradation des organophosphorés comme les pesticides ou les herbicides. Et cela est due à la liaison

carbone – phosphore qui est spécifique aux agents chimiques de guerre. Ce qui fait d'eux de bon marqueur de l'utilisation d'agents neurotoxiques de guerre [54].

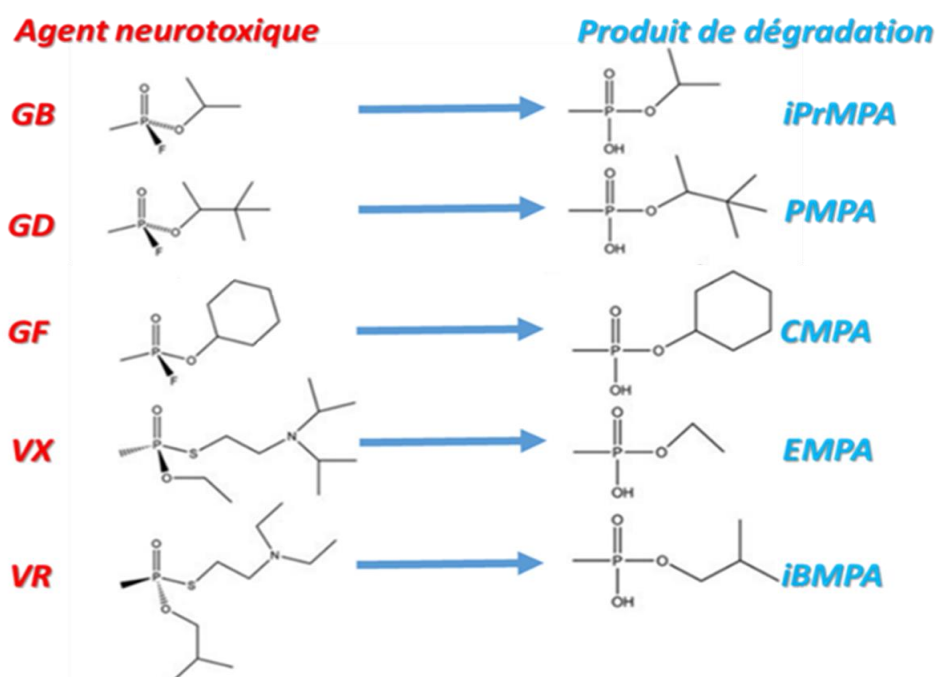


Figure 9 : Structures des agents neurotoxiques et de leurs produits de dégradation respectifs. Adapté de [53].

Les acides alkyl méthylphosphoniques (AMPA) sont des composés chimiques acides polaires. Le Tableau 2 donne les différentes valeurs de pKa et log P de ces produits de dégradation d'agents neurotoxiques de guerre.

Tableau 2 : Propriétés physicochimiques des produits de dégradation des agents chimiques neurotoxiques de guerre [55]

| Produit d'hydrolyse | Agent neurotoxique parent | pKa | Log P |
|---------------------|---------------------------|------|--------|
| iPrMPA | Sarin | 1.96 | 0.101 |
| PMPA | Soman | 2.06 | 1.409 |
| CMPA | Cyclosarin | 1.97 | 1.037 |
| EMPA | VX | 1.99 | -0.310 |
| iBMPA | rVX | 2.03 | 0.564 |

Les AMPA conduisent à des difficultés pendant les étapes de traitement d'échantillon préalables à leur analyse, notamment lors de leur extraction à partir d'une matrice aqueuse en raison de leur forte polarité. Contrairement aux agents neurotoxiques dont ils sont issus, leur analyse par chromatographie en phase gazeuse se fait toujours après dérivation, cependant leur faible volatilité permet leur analyse directe par chromatographie en phase liquide. Comme ils ne possédant pas de groupes chromophores ni fluorophores dans leur structure cela impose l'utilisation de la spectrométrie de masse pour leur détection sous forme non dérivée [56].

CHAPITRE II:

**Les techniques d'analyses et les méthodes de traitement
de l'échantillons applicables aux AMPA**

II.1. Les techniques d'analyse des acides alkyl méthylphosphoniques

Il existe toute une gamme de techniques analytiques permettant d'analyser les agents neurotoxiques de guerre et de leurs produits de dégradation, allant des détecteurs simples de terrain indiquant seulement la présence ou l'absence de ces composés jusqu'aux instruments de laboratoire les plus pointus permettant de quantifier de façon précise les composés ciblés et d'atteindre des seuils de détection très bas.

Parmi ces méthodes analytiques, on peut distinguer :

- les détecteurs portables à base de techniques comme : ondes acoustiques de surface, électrochimique, spectrophotométrie ou encore les techniques immunochimiques.
- les méthodes analytiques couplant un système séparatif comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) [57], liquide (LC) [58], la mobilité ionique (IMS) [59] ou l'électrophorèse capillaire (CE) [60] avec une détection par spectrométrie de masse (MS)[61].

Cependant, si on intègre les besoins en spécificité et en sensibilité recherchés, il est important de se focaliser sur les plus cités dans la littérature pour l'analyse des acides alkyl phosphoniques.

II.1.1. La chromatographie en phase gazeuse (GC) et dérivation

La GC couplée avec différents détecteurs sensibles et/ou sélectifs comme la capture d'électrons (ECD), le détecteur photométrique à flamme (FPD), le détecteur azote-phosphore (NPD), le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le détecteur d'émission atomique (AED), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou la spectrométrie de masse (MS) [62, 63, 64, 65, 66] est historiquement la technique la plus couramment utilisée pour l'analyse des produits chimiques relevant de la CIAC. Bien que les agents neurotoxiques de par leur volatilité importante, soit le plus souvent séparés par GC [67], l'analyse de leur métabolites, les AMPA, ne peut pas se faire directement par GC car ce sont des espèces électrophiles modérément réactives et non-volatiles. Ainsi, une étape de dérivation est nécessaire pour transformer l'analyte d'origine en dérivé au moyen de réactions chimiques avec un ou plusieurs réactifs pour le rendre à la fois plus volatil et moins polaire [68]. Trois principales stratégies de dérivation (silylation, méthylation et pentafluorobenzoylation) utilisées pour l'analyse des AMPA sont présentées dans ce chapitre.

II.1.1.1. Silylation

C'est la méthode de dérivation la plus couramment utilisée pour les AMPA. Elle vise leur conversion soit en ester-triméthylsilyle (TMS) soit en ester-tertbutyldiméthylsilyle (TBDMS). Dans le premier cas, la réaction se fait rapidement (environ 30 minutes) avec le N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) ou le BSTFA+1% de chlorure de triméthylsilyle (TMSCI) dans un solvant organique. Des rendements de dérivation de l'ordre de 80 à 100% sont obtenus. De même, Le N-tert-Butyldiméthylsilyl-N-

methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) donne des conversions aussi efficaces mais un peu plus lente. Cependant l'utilisation de cet agent permet d'obtenir des produits de dérivation plus stables, et plus facilement ionisable lorsqu'une détection par spectrométrie de masse est utilisée [69].

La comparaison entre les dérivés du TBDMS et du TMS des AMPA a permis de démontrer que la dérivation par TBDMS est beaucoup plus avantageuse en terme de facilité de formation des dérivés, de stabilité, de sensibilité et permet d'obtenir des chromatogrammes plus « propres » comparée à la triméthylsilylation des AMPA [70].

Une autre limitation à la dérivation des AMPA par silylation réside dans la sensibilité des dérivés à la présence des ions calcium et/ou magnésium qui sont naturellement présents dans l'environnement, et plus particulièrement dans les échantillons de sol [71]. Un prétraitement des échantillons est alors nécessaire (sur des résines échangeuses de cations) pour éliminer ces cations divalents préalablement à l'étape de dérivation, ce qui complexifie grandement le protocole de traitement de l'échantillon.

II.1.1.2. Méthylation

La méthylation des AMPA en leurs esters méthyliques (alkyl méthyl méthyl phosphonates) de diazométhane est une réaction relativement rapide (15 min). Les rendements de cette dérivation peuvent être supérieurs à 99 %, si l'agent de dérivation est utilisé en large excès. En cas de réaction incomplète, les échantillons analysés peuvent causer une détérioration rapide de la colonne analytique et une contamination du chromatographe. Mais contrairement à la silylation, les AMPA méthylés ne sont pas sensibles à l'humidité. Le diazométhane est le plus souvent utilisé pour sa réactivité élevée et sélective pour les analytes étudiés ainsi que sa grande volatilité permettant son élimination facile. Cependant, il présente de nombreux inconvénients tels que sa toxicité élevée et son potentiel détonant. D'autres alternatives ont été proposés, comme le (triméthylsilyl)diazométhane [67, 72], qui est assez stable et disponible dans le commerce sous forme de solution dans l'hexane ou le diéthyl éther. Bien que l'avantage rapporté de la méthode réside dans sa simplicité, son utilisation reste très limitée à cause de sa sensibilité plutôt modeste de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$ [73].

Plus récemment, un groupe de chercheurs américains a utilisé un sel de tétrafluoroborate de triméthylxonium (TMO.BF_4) [74, 75, 76]. Ce réactif, en plus d'être sûr à utiliser, présente aussi l'avantage de ne pas générer des sous-produits interférents et ce malgré son utilisation en grand excès (>10.000) dans le mélange réactionnel [76]. Cependant cette méthode est assez longue (2 heures) et fastidieuse à appliquer et sa sensibilité donnée après une application sur le sol reste modeste.

II.1.1.3. Autres agents de dérivations

Plusieurs tentatives ont été faites pour trouver des réactifs plus adaptés pour la dérivation des AMPA afin d'améliorer le seuil de détection, de faciliter leur identification et d'alléger les protocoles de traitement de l'échantillon nécessaire. Subramaniam *et al*, ont proposé l'utilisation d'un réactif de phényldiazométhane hautement fluorés (1-(diazométhyl)-3,5-bis-(trifluorométhyl)benzène) pour augmenter la sensibilité de détection des AMPA grâce aux dérivés fluorés obtenus qui offrent une excellente sensibilité en GC-MS avec une ionisation chimique négative (NICI). Cependant ce réactif n'est pas disponible commercialement et sa synthèse au laboratoire passe par une procédure assez complexe ce qui n'encourage pas son utilisation [77,78]. Avec le même désavantage, Östin *et al*, ont synthétisé et présenté un nouveau réactif, le 3-pyridyldiazométhane permettant la dérivation des acides phosphoniques pour produire les esters picoliniques correspondants. Cette dérivation se fait par rapport à la chaîne O-alkyle et peut être utilisée pour une élucidation détaillée de la structure de ce fragment, ce qui a permis de déterminer leur structure en utilisant la GC-EI-MS. Et ce, contrairement aux méthodes de dérivation précédentes qui donnent des spectres très similaires pour de nombreux isomères d'acide alkylphosphonique, ce qui complique le processus de leur identification. Cette méthode a été testée sur douze isomères de l'acide hexyl méthylphosphonique. La comparaison avec les dérivés triméthylsilyl correspondants a montré que les esters picoliniques étaient séparés plus efficacement en GC. Bien que cette dérivation facilite effectivement l'identification et la distinction des isomères de cette classe de produits chimiques, le temps de réaction optimisé est parmi les plus important des méthodes de dérivation (90 minutes) [79].

Même si la GC a été largement utilisée pour l'analyse des AMPA, elle nécessite une étape de dérivation particulièrement contraignante. Du point de vue analytique, les agents de dérivation et leurs produits de réaction avec la matrice produisent des bruits de fonds complexes et indésirables et dans certains cas les analytes ciblés co-éluent avec l'agent de dérivation induisant un risque important de perturber la détection des analytes cibles [69].

II.1.2. Chromatographie en phase liquide (LC)

L'analyse par chromatographie en phase liquide des agents chimiques toxiques de guerre, semblent donc être plus avantageuse pour l'analyse des produits de dégradation des armes chimiques et elle a donc été largement décrite dans la littérature.

Compte tenu de leurs propriétés acides ($pK_a = 2,5$) et leur polarité élevée ($\log P$ entre -0,3 et 1,4), les AMPA ont été séparés par chromatographie d'échange d'anions simples [80] ou en mode mixte [81], et en mode HILIC sur colonne polaire [82, 83, 84]. Cependant, les phases HILIC sont connues pour être moins tolérantes aux changements de nature du solvant injecté et aux changement rapides de gradient et nécessitent des temps d'équilibrage de colonne plus longs que les autres phases stationnaires couramment

utilisées [85]. De même, leur séparation a été effectuée sur une colonne en carbone graphitique poreux (PGC), une phase stationnaire permettant des interactions hydrophobes et électroniques [86]. La chromatographie en phase inverse (RPLC) reste cependant la méthode la plus décrite et utilisée dans la littérature [58] et ce, même si la polarité des AMPA peut compliquer sa mise en œuvre.

Des études ont été menées pour choisir la colonne de chromatographie en phase inverse qui assure la meilleure séparation entre l'EMPA, l'iPrMPA, l'IBMPA, le CMPA et le PMPA. Parmi toutes les colonnes testées (non communiquées), la colonne Cortecs C18 de Waters de 3 × 150 mm avec une taille de particule de 2,7 µm s'est avérée la seule à permettre la séparation entre le CMPA et le PMPA [58]. Dans le même contexte, et afin d'obtenir un pic chromatographique gaussien pour l'EMPA (l'analyte le plus polaire et donc le moins retenu), une étude comparative a été menée au LSABM sur cinq colonnes analytiques à polarité de phase inversée de même géométrie (C18, 150 mm × 2,1 mm i.d.). Cette étude a permis de constater que la forme du pic chromatographique obtenu pour l'EMPA est très différente d'une colonne à une autre, incluant divers degrés d'asymétrie. Au final, la dC18 d'Atlantis, colonne de type « aqua », s'est avérée la seule à donner des pics gaussiens [87].

Pour la séparation des AMPA, une étude a mentionné l'utilisation d'une colonne ZORBAX Extend C18 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 µm) pour séparer 55 produits de produits de dégradation d'agents chimiques de guerre et de précurseurs simultanément dont le MPA, EMPA, iPrMPA et PMPA. Mais comme l'objectif de cette étude était le dépistage de plusieurs produits inconnus, un temps d'analyse relativement long de 20 minutes était nécessaire suivi de 5 minutes pour l'équilibre post-analyse de cette colonne qui devrait assurer une meilleure résolution de pics comparée aux colonnes conventionnelles.

Dans une autre étude dont l'objectif est de réduire les temps d'analyse des AMPA, une colonne Acquity BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 µm) a été utilisée et comparée à une autre colonne conventionnelle, l'Atlantis dC18 (2.1 mm × 150 mm, 3 µm). La figure 10 montre les deux chromatogrammes obtenus avec ces deux colonnes montées sur deux systèmes différents. En effet, la comparaison entre les deux techniques de chromatographie en phase liquide HPLC et UPLC a démontré le pouvoir de séparation des produits de dégradation des agents neurotoxiques par UPLC qui a permis de donner des pics fins, bien résolus en un quatre fois moins de temps par rapport à la technique classique HPLC [88].

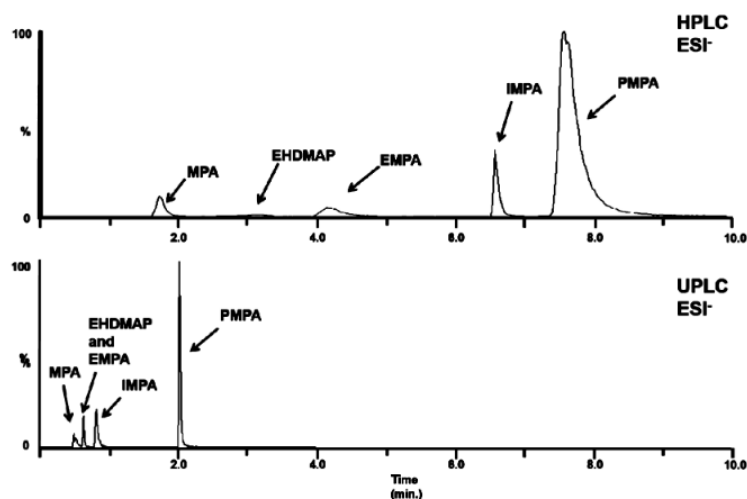


Figure 10 : Comparaison des temps de rétention UPLC et HPLC d'un volume d'injection de 10 μ L de solution d'étalonnage. Les pics correspondant aux analyses cibles des analyses HPLC et UPLC de gauche à droite sont MPA, EHDMAP, EMPA, IMPA et PMPA respectivement [88].

Comme mentionné précédemment, les détecteurs spécifiques revêtent une grande importance dans l'analyse des agents chimiques toxiques (notamment pour les molécules contenant du phosphore, soufre et azote). C'est pourquoi, la LC a été fréquemment couplée avec ce type de détecteurs comme ce fut le cas dans les travaux de Kientz et Verweij depuis les années 90. Mais, s'il a été montré qu'il était possible de détecter les AMPA en couplant la LC à un détecteur à photométrie de flamme [89, 90] ou à l'UV après dérivation [91], l'absence de chromophore sur ces molécules et la faible sensibilité de ces méthodes ainsi que des problèmes de couplage ont majoritairement conduit au couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse [92].

La supériorité du mode ESI négatif comparée au mode positif pour les AMPA a été déjà mentionnée dans la littérature [93]. En effet, l'ionisation ESI⁻ est le premier choix pour la détection et l'identification de ce type de composés car ils sont chargés négativement sur une large gamme de pH [94]. En plus, il a été remarqué que les spectres donnés par ESI⁻ étaient beaucoup plus net et dominés par l'ion moléculaire déprotoné comparés aux spectres ESI⁺ qui étaient un peu compliqués à interpréter en raison de la formation d'adduits métalliques en plus de l'ion moléculaire protoné. Un travail récent avec un système UPLC-MS/MS (ACQUITY UPLC I/ Class-Xevo TQ-XS) vient confirmer ce constat. En effet, une comparaison entre les deux modes ESI positif et négatif dont l'objectif était l'optimisation de la détection de l'iPrMPA a montré que le mode négatif conduit à des pics plus intense qu'en mode positif [95]. La faible intensité de signal obtenu pour l'ion [M+H]⁺ a été expliquée par les niveaux élevés de fragmentation dans la source pour ce composé. Ainsi, sur la base de ces raisons, le mode négatif a été largement choisi et utilisé dans les analyses LC-MS/MS des AMPA.

Par ailleurs, en fonction de l'objectifs des différentes études, divers analyseurs ont été utilisés pour la détection des AMPA. En effet, la RPLC a été couplée à des pièges à ions (trappes ioniques) [96] ou

Orbitrap™ [97] ou des analyseurs de masse à temps de vol (TOF [98] ou hybride QTOF [84]). La spectrométrie de masse à haute résolution a le plus souvent été utilisée pour l'élucidation de la composition élémentaire et de la structure chimique des AMPA ou de produits en lien avec ces composés puisque les mesures de masse précises sont spécifiques et universelles pour les molécules cibles et leurs ions fragments. Ainsi, plusieurs méthodes analytiques combinant la LC avec le QTOF ont été rapportées pour le dépistage et la confirmation sans équivoque des AMPA ou dans l'étude des produits de leur réaction en dérivaison chimique [99], ou les produits de matrice interférents [100]. Bent Tore *et al*, a utilisé la LC-TOF pour l'analyse des AMPA dans le sérum et les urines en se limitant à une identification des composés grâce à leur ion produit principal. En effet la grande résolution de la masse a permis de se passer d'un second ion de confirmation. Par ailleurs, la LC-QTOF a été aussi utilisée lors des procédures de screening de plusieurs composés ciblés. En effet, Tak *et al*, ont présenté une méthode en LC-QTOF permettant l'identification simultanée de 55 produits de produits de dégradation d'agents chimiques de guerre et de précurseurs dans l'eau potable. Parmi ces composés on trouve les AMPA suivants : MPA, EMPA, iPrMPA et PMPA [101]. Cependant l'analyseur quadripolaire reste très utile pour l'analyse ciblée des AMPA [102], notamment en format triple quadripolaire (TQ) [58, 82, 103], en raison de sa grande sensibilité. Lors d'une étude récente, Rubin *et al*, ont utilisé la LC-QTOF pour analyser et identifier les ions inhérents au tissu osseux et identifier les espèces d'ions interférents dans l'objectif d'améliorer la compréhension de la biologie et de la chimie des os. Cependant, les auteurs ont opté en parallèle pour un analyseur de type TQ pour réaliser la quantification des AMPA au vu des très faibles concentrations attendues dans les os [100].

Diverses procédures de dérivaison chimique ont également été adaptées pour améliorer la séparation des AMPA en chromatographie en phase liquide en phase inverse et leur détection, notamment pour les analytes très polaires. Afin d'assurer une meilleure sensibilité, la dérivaison vise à augmenter la taille des petites molécules pour les mieux les détecter dans une gamme de masse supérieure moins sujette à un bruit de fond important. De plus, les analytes dérivés sont beaucoup moins polaires ce qui permet une meilleure rétention en RPLC. C'est dans cette optique que le bromure de p-bromophénacyle a été utilisé pour diminuer la polarité des AMPA et améliorer ses limites de détection suite à une ionisation par bombardement atomique rapide [104]. Cette technique d'ionisation implique l'utilisation d'un faisceau d'atomes à haute énergie afin d'impacter une surface pour créer des ions. Weissberg *et al*, ont utilisé un réactif commercial à base d'amine qui dispose d'une haute affinité protonique qui est le 3-(bromoacetyl)pyridine pour la détermination des AMPA en améliorant leur spécificité structurelle et leur rétention chromatographique en plus de la sensibilité de la méthode [94]. Une autre approche a consisté à augmenter la sensibilité de la détection des AMPA dans des échantillons aqueux en utilisant des réactifs dicationiques à base d'imidazolium [105]. Mais les limites de détections de cette dernière (1–5 ng/ml) restent généralement assez proches des méthodes LC-MS sans dérivaison.

Le travail le plus récent en matière de dérivation des AMPA a été mené par Otsuka *et al*, [99] grâce au pentafluorobenzyle. Cette méthode a été comparée à l'analyse directe des composés ciblés sur le même système analytique et en utilisant la même colonne mais aussi à l'analyse par GC-MS d'un échantillon obtenu avec la même dérivation dans les mêmes conditions mais en récupérant le résidu final de la réaction dans l'acétonitrile pour son injection en GC-MS au lieu d'un mélange acétonitrile/eau (1 : 4) plus adapté pour une injection en LC.

Les résultats en termes de limites de détections des trois méthodes sont donnés dans le Tableau 3. Après dérivation, la méthode LC-ESI⁻-MS/MS en mode MRM est en effet beaucoup plus sensible que la GC-MS en mode SIM. Par ailleurs, la pentafluorobenzoylation a permis d'améliorer la sensibilité de la LC-ESI⁺-MS/MS pour les analytes très polaires comme le MPA ou l'EMPA. Cependant, l'analyse directe des AMPA peu polaires (PMPA et iBMPA) par LC-ESI⁺-MS/MS reste la méthode la plus sensible.

Tableau 3 : Limites de détection (en ng injecté) obtenues pour l'analyse des AMPA par différentes méthodes [99].

| | EMPA | iPrMPA | iBMPA | CMPA | PMPA | MPA |
|---|------|--------|-------|------|------|------|
| GC-MS (SIM) (après dérivation) | 1000 | 11 | 1.1 | 111 | 33 | 1111 |
| LC-ESI ⁻ -MS/MS (analyse directe) | 24 | 2.8 | 2.8 | 8.0 | 8.0 | 74 |
| LC-ESI ⁺ -MS/MS (après dérivation) | 0.4 | 0.3 | 3.3 | 3.3 | 33 | 4.1 |

En conclusion, bien que quelques tentatives de dérivation aient été tentées pour résoudre certains problèmes analytiques pour les AMPA les plus polaires, les méthodes LC présentées dans la littérature pour les AMPA se font très majoritairement sans dérivation. Par ailleurs, la sélection de la phase inverse pour leur séparation associée à l'ESI en mode négatif pour leur ionisation et le TQ en mode MRM pour leur détection constitue la méthode de choix pour quantifier ces analytes d'intérêt dans une matrice complexe [58].

II.2. Traitement de l'échantillon et leurs applications dans le domaine d'analyse des acides alkyl méthylphosphoniques

L'analyse des produits de dégradation des agents neurotoxiques de guerre est couramment effectuée dans des matrices (i) environnementales (eau, sol, sédiments [56, 106]), (ii) biologiques (sang, salive, urine, cheveux, ongles [107, 108, 109]) ou (iii) des matrices alimentaires [80] mais également dans des matériaux synthétiques (vêtements, plastiques). La complexité de ces différents types d'échantillons varie grandement. Par exemple, les aliments sont riches en acides aminés, en sucres et en pigments alors que les tissus biologiques et le sang sont riches en protéines, en sels et en lipides. Quant aux matrices environnementales, elles contiennent les analytes d'intérêt à l'état de trace voire d'ultra-trace et peuvent contenir d'autres substances chimiques ou contaminants en grande quantité qui peuvent générer des interférences importantes lors de la quantification des composés d'intérêt. L'étape de traitement de l'échantillon est donc nécessaire pour permettre une quantification fiable des composés d'intérêt présents à l'état de traces.

Même lorsque l'on s'intéresse uniquement aux échantillons liquides comme c'est le cas dans ce projet, il n'existe pas de technique universelle de préparation d'échantillons convenant à tous les types d'échantillons (eaux, fluides biologiques...). De plus, les propriétés physico-chimiques des analytes orientent le choix de la technique de traitement de l'échantillon. Diverses techniques de préparation des échantillons liquides ont donc été développées pour obtenir des extraits compatibles avec les techniques d'analyse couramment utilisées et décrites dans le chapitre précédent. Néanmoins, le type de la matrice d'échantillon et de la technique d'analyse disponible détermine généralement la meilleure procédure pour la préparation de l'échantillon [56].

Les méthodes classiques de préparation des échantillons liquides reposent sur le partage de l'analyte (i) entre l'échantillon aqueux et un solvant non miscible selon une méthode dite d'extraction liquide-liquide qui peut être miniaturisée voire assistée par le biais d'une fibre ou d'une membrane imprégnée par un solvant, ou (ii) entre l'échantillon aqueux et un support solide par extraction en phase solide (SPE) selon un procédé apparenté à de la chromatographie en phase liquide ou selon un procédé reposant sur un équilibre de partage [30][56].

De nombreuses techniques permettant l'extraction des acides alkyl alkylphosphoniques se sont développées ces dernières années. Des efforts ont été particulièrement entrepris pour aller vers des procédés respectant d'une part les dix principes de la chimie analytique verte (GAC) [110] et du traitement d'échantillon vert (GSP) [111], tout en réduisant le temps nécessaire pour l'étape de traitement de l'échantillon. Cette étape est effectivement particulièrement chronophage puisqu'elle correspond généralement à deux tiers du temps total d'une procédure analytique (Figure 11-a), et génère environ jusqu'à

30% des erreurs dans la procédure analytique globale (Figure 11-b). Elle reste donc une priorité pour les chercheurs dans le domaine.

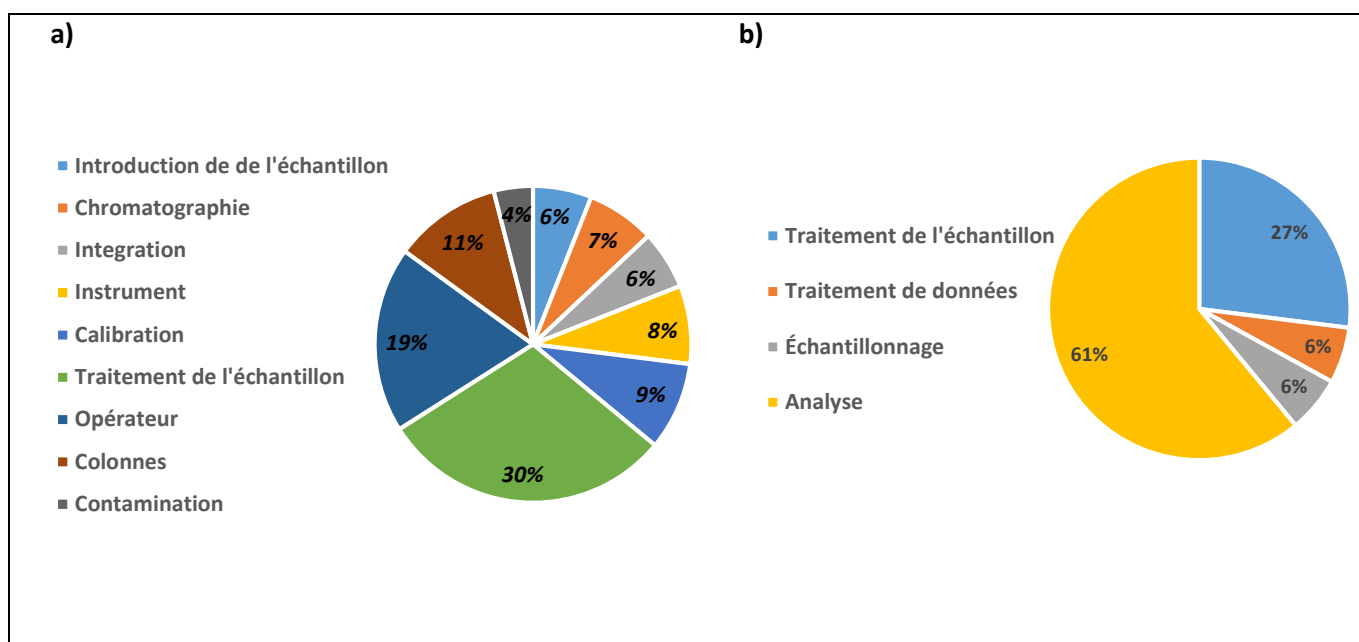


Figure 11 : Les temps consacrés pour chaque étape de la procédure analytique (a) sources d'erreurs générés lors d'une procédure analytique (b), adapté de [112].

II.2.1. L'extraction liquide-liquide (ELL)

L'extraction liquide-liquide (ELL) est l'une des méthodes les plus largement utilisées pour l'extraction des agents chimiques de guerre et de leurs produits de dégradation dans différentes matrices telles que les eaux environnementales, les urines, le sang [113][114][115][30][40]. Cette technique est basée sur le principe du partage des analytes entre deux phases non miscibles (généralement une phase aqueuse, à savoir l'échantillon, et une phase organique) en se basant sur leurs solubilités différentes pour les deux phases tel que présenté sur la Figure 12. Le principe de fonctionnement de la LLE repose sur le transfert d'une espèce chimique (i) d'une phase à une autre. Lorsque l'équilibre entre les phases est atteint, le coefficient de répartition ou le coefficient de partage (K_i) est donné par l'équation $K_i = C_{i,o} / C_{i,a}$ [116]. Tel que K_i correspond au rapport entre la concentration d'une espèce i dans la phase organique ($C_{i,o}$) et celle dans la phase aqueuse ($C_{i,a}$).

Réussir une extraction liquide-liquide dépend principalement du choix du solvant. En effet, son efficacité d'extraction dépend de (a) l'affinité des analytes pour le solvant (K_i), (b) du rapport de volumes entre la phase aqueuse et la phase organique. Tel que le volume de cette dernière est largement supérieur à celui de la phase aqueuse. (c) du nombre successives d'extractions.

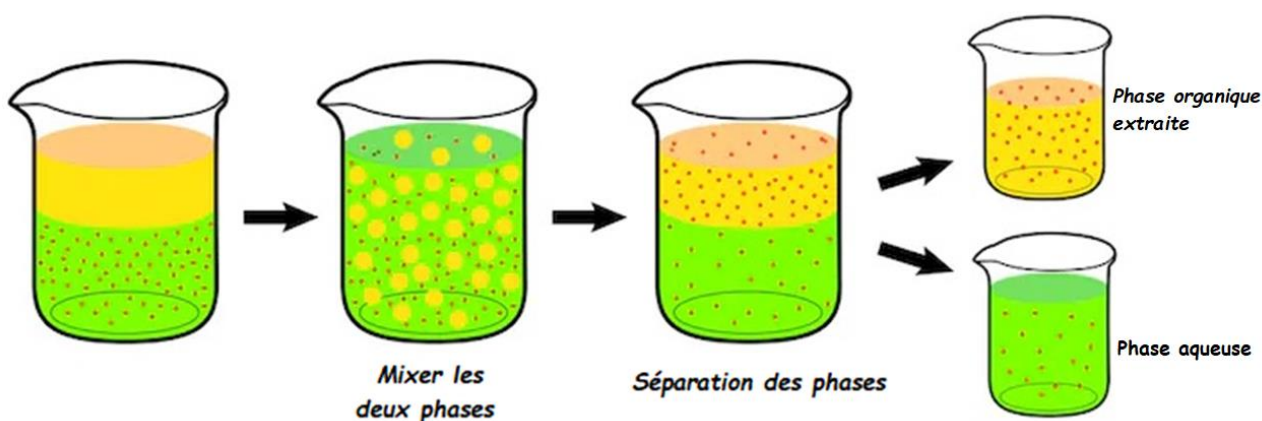


Figure 12 : Principe de l'extraction liquide-liquide, adapté de [117].

Cette technique a été couramment utilisée pour extraire des composés organophosphorés peu polaires à partir d'échantillons aqueux (eaux ou extraits liquide de légumes par exemple) par différents solvants organiques, tel que le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'iso-butanol-toluène pour le sérum ou l'éther diéthylique pour l'urine acidifiée [118].

Saradhi *et al*, ont utilisé la LLE pour l'extraction des agents toxiques de guerre qui sont des produits peu polaires à partir d'un millilitre d'hexane polluée par des hydrocarbures (gasoil). La méthode consistait en trois extraction liquide/liquide successive avec de l'acétonitrile (CH_3CN). Les 3 phases organiques sont ensuite combinées. Les rendements d'extractions étaient dans l'intervalle de 70 à 90% [119].

L'extraction dépend également du solvant utilisé et de la polarité des analytes ciblés (caractérisée par le $\log P$, le coefficient de partage octanol/eau). Les AMPA étant des analytes très polaires, leur extraction d'un milieu aqueux a été toujours problématique.

Un seul rapport établi en 1998 évoque l'extraction de l'iPrMPA à partir des matrices de sérum de citoyens japonais qui auraient été exposés au sarin lors d'un attentat terroriste. La phase organique utilisée lors de cette LLE est constituée d'un mélange d'isobutanol/toluène (1:1, v/v) et les auteurs réclament avoir obtenu un taux d'extraction supérieur à 70% [113]. Cependant, la méthode proposée nécessite le recours à des étapes fastidieuses de centrifugation et d'évaporation ainsi qu'à plusieurs extractions. De plus, une quantité importante de l'analyte deutré (l'iPrMPA- d_3) a été utilisée afin rendre l'analyse plus fiable.

D'une manière générale et bien que la LLE semble être une méthode simple à mettre en œuvre au laboratoire, elle souffre de plusieurs limitations. En effet, elle implique l'utilisation de quantités importantes de solvants organiques. Ce que la communauté scientifique tend à éviter dans le cadre du concept de la chimie verte. De plus, elle nécessite beaucoup de temps pour son élaboration. Par ailleurs, elle se révèle peu sensible, s'il elle n'est pas suivie d'une étape d'évaporation préalable à l'analyse et les options

d'automatisation et/ou d'amélioration de la cadence d'extraction semblent être extrêmement limitées. Aussi, elle s'avère parfois difficile voire impossible à accomplir dans les cas de formation d'émulsion importante.

Pour remédier à toutes ces limitations, d'autres techniques ont été proposées et largement utilisées tel que l'extraction sur phase solide.

II.2.2. L'extraction en phase solide (SPE)

L'extraction en phase solide (SPE) est aussi une technique très courante et très utilisée pour la préparation d'échantillons préalable à une analyse par chromatographie. La demande croissante sur cette technique se traduit par l'offre importante de produits SPE (nombreuses phases de différentes chimies de surface et disponibles sous différents formats, mais également robot permettant l'automatisation et/ou la parallélisation des extractions). Cette méthode d'extraction sur phase solide est de plus en plus mise en œuvre pour les échantillons liquides en raison de sa grande facilité d'utilisation.

Cette technique repose sur l'utilisation d'un support solide sous formes de particules maintenues entre deux frittés dans une colonne de petite dimension ou dans le corps d'une seringue, généralement en polypropylène ou en verre, et consiste à faire passer l'échantillon contenant les analytes d'intérêt à travers le support. La Figure 13 illustre le dispositif SPE sous différents formats où la préconcentration / purification de l'analyte est obtenue suite à un effet de rétention ou d'élution différentielle entre les analytes d'intérêt et les autres composés interférents de la matrice, la matrice aqueuse étant éliminée au cours de l'étape de percolation de l'échantillon par le choix du support solide généralement hydrophobe [120].

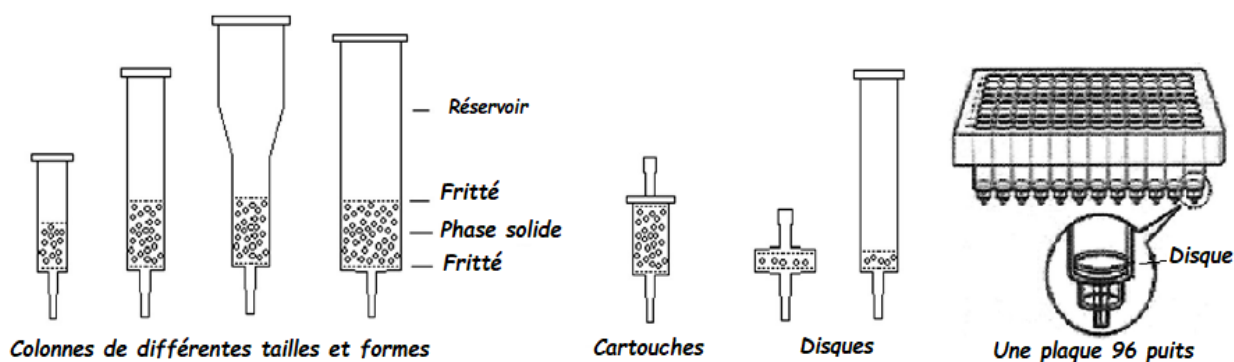


Figure 13 : Illustration des différents formats de la SPE, adapté de [120].

Une procédure d'extraction sur phase solide comporte trois ou quatre étapes en général. La Figure 14 illustre les différentes étapes de cette extraction : (i) la première est le conditionnement de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction. Cette étape permet de mouiller le support en solvant les groupements fonctionnels présents à sa surface. (ii) Lors de la seconde étape, on procède à la percolation de l'échantillon sur le support. Les interférents n'ayant aucune affinité avec la phase solide ne sont pas retenus

sur le support lors de cette étape. Tout composé présentant une forte affinité avec l'adsorbant est alors fixé sur le support. (iii) Une étape supplémentaire de lavage (étape 3) peut être effectuée de manière à éliminer les composés interférents faiblement retenus par le support. On choisira de ce fait un solvant de faible force éluante de façon à éluer les interférents tout en gardant fixés les composés d'intérêt. Le but de l'élution est de récupérer 100% des composés d'intérêts présents sur l'adsorbant. Dans cette étape, le solvant ou mélange de solvants utilisé doit avoir le maximum d'interactions avec les analytes et le moins possible avec les autres interférents qui peuvent rester adsorbés.

Le solvant d'élution doit être le plus efficace possible, son volume doit être faible de manière à obtenir un facteur d'enrichissements (FE) très important [121]. Ce dernier est donné par l'équation :

$$FE = \frac{C_{finale}}{C_{initiale}}$$

Où $C_{initiale}$ est la concentration initiale de la substance à analyser dans l'échantillon et C_{finale} est la concentration finale de la substance à analyser présente dans l'extrait.

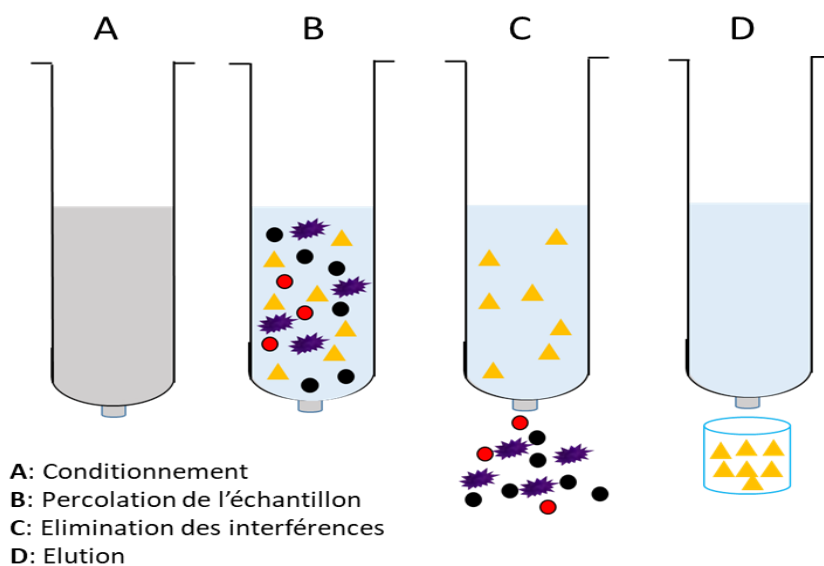


Figure 14 : Description d'une procédure d'extraction par SPE

En SPE, un large choix de phase d'adsorbant est disponible selon le type des analytes et la matrice traitée : la phase normale (Si), la phase inverse (C18, C8), les phases échangeuses d'ions : SAX (échangeuse d'anions) et SCX (échangeuse de cations) ou encore en polymère (mixte) ou polymère à empreinte moléculaire (MIP).

Dans le domaine de l'analyse des agents chimiques de guerre, les cartouches de silice (Si) ont été largement utilisées pour le nettoyage des échantillons et l'élimination de tous les produits apolaires comme les hydrocarbures souvent associés à des matrices environnementales après avoir extrait les analytes d'intérêts du sol dans des solvants organiques comme l'acétonitrile. Des solvants plus polaires sont ensuite

utilisés pour éluer les analytes retenus par la phase de silice [40].

En ce qui concerne les AMPA, un certain nombre de procédures SPE ont été utilisées pour leur extraction dans des matrices environnementales et/ou biologiques. Les AMPA sont extraits soit dans leur état non ionisés (neutres) sur des phases hydrophobes soit dans leur état ionisé sur des cartouches échangeuses d'anions. Une autre alternative à l'extraction des AMPA consiste non pas à les retenir sur le support mais à nettoyer l'échantillon en retenant toutes les composés potentiellement interférents prédominants de l'échantillon comme réalisé pour des cations inorganiques éliminés par des cartouches SPE échangeuses de cations [122].

L'extraction des AMPA sur des cartouches SAX a été largement rapportée depuis les années 1990 [123][124][125]. En effet, Seto *et al*, après avoir étudiés plusieurs types de cartouches comme l'échangeuse d'anions, de cations et en phase inverse, l'échangeuse d'anion s'est révélée la plus adaptée pour l'extraction des AMPA dans des échantillons aqueux suivie par leur dérivation par TBDMS. En effet, les cations métalliques divalents tels que les ions calcium et magnésium rendent impossible la dérivation, ainsi que de certains composés neutres comme les glucides qui contiennent des groupes hydroxyle entrant en compétition avec les AMPA dans la réaction de silylation au TBDMS. Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie précédente, cette dernière est une étape cruciale pour l'analyse des AMPA par GC-MS. Par ailleurs, une procédure de SPE sur une cartouche échangeuse d'anion permet de réduire l'interférence dans la procédure de dérivation et de régler le problème d'adsorption des analytes ciblés sur des matrices tel que sol ou le sérum humain [71]. En effet, pour diminuer l'adsorption des AMPAs sur les sols, une méthode d'extraction alcaline a été adoptée par les auteurs. Quant aux échantillons de sérum humain, la déprotéinisation à l'acétonitrile ou à l'acide trichloracétique a permis de rompre la liaison entre les protéines et les AMPAs. Ainsi, les rendements d'extraction des AMPA à partir des sols et du sérum humain ont été considérablement augmentés en utilisant ces procédures de prétraitement combinées à l'extraction SAX-SPE.

Dubey *et al*, ont procédé à la comparaison des cartouches SAX pour l'extraction des AMPA et APAs à partir de matrices aqueuses avec des supports Oasis échangeuses d'anions en mode mixte (MAX) suivie d'une triméthylsilylation et une analyse par GC-MS. Ces derniers sont des phases polymériques constitués de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) et de motifs ammonium quaternaire permettant à la fois une rétention par échange d'anions ainsi que par interactions hydrophobes (en mode phase inversée), et convient donc à l'extraction des composés acides. Après optimisation de l'extraction sur les deux types de cartouches par l'évaluation de plusieurs paramètres (capacité de chargement, choix du solvant d'extraction, de son volume, et de même pour le solvant de lavage), les cartouches MAX (30 mg, 1ml and 0.25 mequiv.g⁻¹) se sont avérées efficaces pour ce type d'analyte puisque des taux d'extractions exhaustifs (90 à 95%) à partir d'échantillons d'eau pure avec un volume de 2 ml, la sensibilité (LODs : 0.5-5 ng/ml) et la qualité des

chromatogrammes obtenus après une SPE MAX comparée à celles de la SPE SAX dont les rendements varient entre 55 et 65 %, et les LODs entre 5 et 50 ng/ml [126].

D'autres supports comme Oasis HLB ont été utilisés pour l'extraction des AMPA. Cette phase Celle-ci est composée de divinylbenzene (lipophile) et d'un polymère à base de N-vinylpyrrolidone (hydrophile) et présente une surface spécifique élevée, de l'ordre de 800 m²/g qui lui confère un pouvoir de rétention bien supérieur aux supports de silice greffée C18, tout en pouvant être utilisée sur une large gamme de pH. Dans la littérature, la cartouche Oasis HLB est souvent utilisée pour le prétraitement d'échantillons aqueux comme les eaux de surface ou les eaux usées lors du développement de méthodes multi-résidus. Ce support a été testé par Riches *et al*, dans une étude visant l'extraction des AMPA dans des matrices biologiques. La méthode développée permet des extractions de l'ordre de 90% pour tous les AMPA excepté pour l'EMPA (analyte le plus polaire) qui a été extrait avec un taux de 24% à partir d'un 1 ml d'urine et montre une bonne sensibilité qui peut avoisiner 0.5 ng/ml [122]. Cependant, la méthode exige une dérivation par le pentafluorobenzyle en présence de carbonate de potassium avant l'analyse par GC/MS, ce qui a impliqué le recours à une autre cartouche Bond-Elut Florisil SPE afin d'éliminer l'excès d'agent de dérivation et limiter la maintenance du GC en prolongeant la durée de vie de l'insert au niveau de l'injecteur [122]. En plus, la procédure présentée est considérée très fastidieuse. En effet, elle implique 3 étapes d'évaporation à sec suivie de 3 reconstitutions (une fois dans l'acétonitrile et deux fois dans du dichlorométhane). Dans cette procédure l'acétonitrile a été surtout utilisé comme solvant d'élution sur le support Oasis HLB et le dichlorométhane comme solvant d'élution sur le support Bond-Elut Florisil.

Dans la littérature, des méthodes SPE C18 ont également été développées, mais elles affichent des taux d'extraction très faibles par rapport aux méthodes SPE basées sur l'échange d'ions [127]. Afin d'assurer une meilleure extraction des AMPA, une approche basée sur l'utilisation des agents d'appariement d'ions (IP) a été adoptée. Ces agents d'appariement d'ions permettent d'augmenter la rétention des composés hautement polaires et ionisables sur des supports hydrophobes [128]. Ces réactifs contiennent typiquement une partie apolaire, telle qu'un hydrocarbure aliphatique à longue chaîne, et une partie polaire ionisable, telle qu'un acide ou une base. La partie polaire du réactif interagit avec le groupement chargé sur l'analyte, formant ainsi une "paire d'ions". Tandis que la partie non polaire interagit avec les greffons hydrophobes de l'adsorbant. La rétention d'un analyte peut être augmentée en augmentant la concentration du réactif d'appariement d'ion et/ou en augmentant la longueur de la chaîne carbonée.

Saradhi *et al*, ont eu recours au tetrabutylammonium bromide (TBAB) comme agent IP pour l'extraction des produits de dégradation des agents chimiques de guerre (méthyl, éthyl, propyl) phosphoniques, thiodiglycolique et benzilique) de l'eau de robinet sur une cartouche SPE (C18). L'analyse a été faite par GC/MS-EI après dérivation de l'extrait obtenu après évaporation à sec de la fraction d'élution résultante de la SPE et sa reconstitution dans l'acétonitrile. La méthode développée a conduit à des taux

d'extraction dépassant les 90% pour les AMPA les moins polaires. Cependant des taux d'extractions faibles ont été obtenus pour les acides méthylphosphonique et éthylphosphonique (20.6 % et 35.8 %, respectivement), avec une limite de détection dans l'intervalle de 5 à 50 µg/L [129]. Afin d'améliorer leur rétention, les auteurs ont utilisé le phényl triméthyl ammonium hydroxyde (PTMAH) comme agent IP sur un support SPE à base de charbon actif. Le PTMAH agit aussi comme agent de dérivation pendant la SPE car il permet la méthylation pyrolytique in-situ des AMPA dans le port d'injection du GC-MS évitant ainsi à la nécessité d'une étape supplémentaire de dérivation. Cette nouvelle méthode a permis d'obtenir des taux d'extraction dépassant 95%, et une limite de détection de l'ordre de 10 ng/mL, compatible avec les prérequis des tests de compétence de l'OIAC. Cependant la méthode proposée consomme un volume d'échantillon important (5 ml) et elle n'a pas été testée pour les échantillons réels. De plus, la méthode nécessite plusieurs étapes comme le séchage de l'extrait par une autre cartouche de sulfate de sodium anhydre (1 g, 6 mL) ou la concentration de l'extrait sous flux d'azote. Les auteurs ont aussi reconnu la limite d'applicabilité de leur méthode sur des matrices très acide [127]. Par ailleurs, et très récemment, le même groupe a encore estimé que même si les méthodes IP en association à la SPE présentées auparavant étaient simples et rapides, les esters méthyliques obtenus conduisaient souvent à l'observation de traînées de pic sur les chromatogrammes après injection des extraits sur colonnes non polaires ce qui nuit à la sensibilité de la méthode. L'utilisation de l'hydroxyde de tetrabutylammonium pour une butylation (TBAH) *in situ* des AMPA pendant l'étape d'élution en SPE a permis d'améliorer de la forme des pics des analytes, les temps de rétention et la sensibilité. Par cette méthode, de très bons taux d'extraction allant de 85% à 110% en fonctions des analytes cibles couplées à une excellente sensibilité avec des limites de quantification de l'ordre de 1 ng/mL ont été obtenus. Cependant, en plus de l'aspect fastidieux de mise en œuvre du aux multiples étapes, cette méthode n'est applicable qu'à des matrices de pH supérieur à 10 [130].

Très récemment, le groupe de Weissberg a présenté la méthode la plus sensible pour l'extraction des AMPA à partir des échantillons d'urines. Des LOQs de l'ordre de 0.1 ng/mL pour l'EMPA, 0.05 ng/mL pour l'iPrMPA et 0.001 ng/mL pour le CMPA ont été atteintes. Cette méthode est basée sur la technologie SPE hybride combinant deux cartouches de résine à base de (Ba/Ag/H) pour l'élimination des interférences (anions inorganiques, y compris les sulfates et les halogénures) et la cartouche à base d'oxyde de zirconium (ZrO₂) pour l'enrichissement des AMPA (voir Figure 15). En effet, les composés ciblés sont considérés comme de bases fortes de Lewis en raison de leur groupe phosphonate électronégatif qui leur confère une forte affinité pour les phases en ZrO₂ [131].

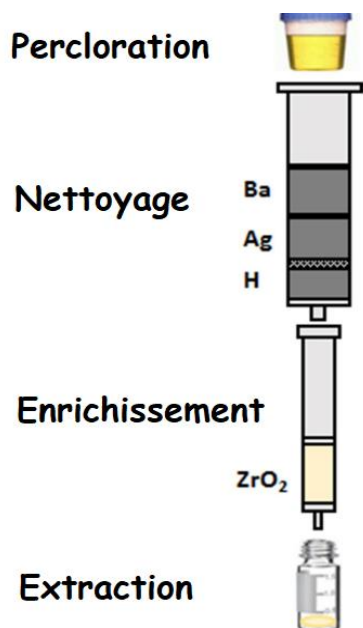


Figure 15 : Schéma montrant une méthode SPE hybride, adapté de [131].

En parallèle à l'utilisation des phases SPE commerciales, d'autres adsorbants synthétisés à l'échelle du laboratoire ont été utilisés. Il s'agit de phases à base de polymères à empreintes moléculaires (MIP) qui ont été développées de manière à assurer une meilleure sélectivité pour les analytes d'intérêt dans des matrices complexes. Il s'agit de polymères réticulés, stables et hautement sélectifs dont les propriétés spécifiques sont dues à la voie de leur synthèse. En effet, ils sont obtenus par copolymérisation de monomères avec une molécule empreinte, puis par réticulation du polymère autour du complexe empreinte-monomère. Après cette polymérisation, les molécules empreintes sont éliminées avec des solvants appropriés, laissant dans la structure du polymère des cavités de forme et de taille complémentaires avec la molécule cible. Les étapes de synthèse sont illustrées sur la Figure 16 [132].

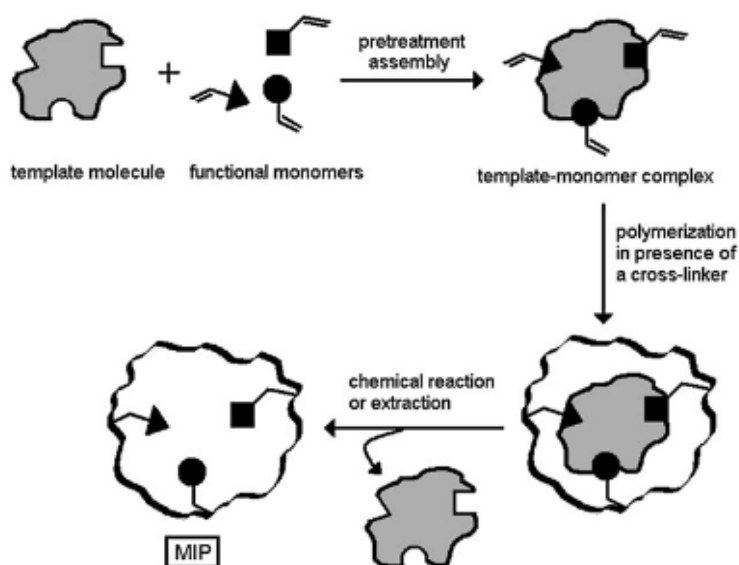


Figure 16 : Schéma montrant la synthèse de polymères à empreinte moléculaire (MIP) [132]

Un MIP à base d'acide méthacrylique (MAA) utilisant le PMPA comme molécule empreinte a été utilisé avec succès par Meng Zi-Hui *et al*, pour l'extraction des AMPA (PMPA, iPrMPA et EMPA) du sérum humain. Cependant, les auteurs ont reconnu que des améliorations de leur méthode devraient être effectuées pour diminuer la limite de détection et augmenter l'intervalle de linéarité de la méthode et surtout alléger la procédure d'extraction qui implique plusieurs étapes. En effet, le support utilisé devrait être d'abord conditionné avec 5 ml de HCl (30 %), 50 ml d'eau distillée et 5 ml d'acétonitrile à un débit de 1,5 ml/min. Ensuite, une extraction liquide-liquide doit être faite sur le sérum pour disposer d'une phase en acétonitrile qui après son séchage sur du Na₂SO₄ anhydre sera appliquée à plusieurs reprises sur la cartouche SPE préparée (10 fois). Ensuite, cette dernière fera l'objet d'une élution répétée à cinq fois et les éluants obtenus seront combinés et concentrés avant l'analyse [133].

De même, Moullec *et al*, ont réussi à synthétiser un MIP similaire à celui de l'étude précédente à base de MAA comme monomère et de PMPA comme molécule empreinte pour l'extraction de l'EMPA des échantillons de sols. Cependant les limites du MIP présenté était sa faible capacité (97 µg/g), et sa sensibilité à la présence d'eau dans le milieu de percolation ou de lavage qui ont tendance à perturber les interactions sélectives basées sur les liaisons hydrogène [134]. Mais d'une manière générale, la grande limite des MIP réside dans la possibilité de générer des faux positifs à cause du relargage de la molécule prise comme empreinte moléculaire pour la synthèse du MIP. Ceci combiné la non commercialisation de ces supports constitue un frein majeur pour leur mise en place comme supports dans le cadre des tests de l'IOAC [135][134][136].

De façon générale, l'utilisation de la SPE en différé (off-line) présente plusieurs inconvénients. Elle nécessite souvent une étape d'évaporation de la fraction d'élution afin de reconcentrer l'extrait et de gagner en facteur d'enrichissement et/ou le changement de solvant permettant l'injection dans le système analytique. De plus, seule une fraction de l'extrait est réellement injectée dans le système chromatographique limitant ainsi la sensibilité de la méthode, qui est alors compensée par la percolation d'importants volumes d'échantillons afin d'améliorer le facteur d'enrichissement. Ces inconvénients peuvent être éliminés en travaillant par couplage de la SPE en ligne avec le système chromatographique. En effet, une SPE en ligne offre divers avantages, entre autres, en minimisant les manipulations de l'échantillon, en automatisant les injections de l'échantillon, en utilisant un volume d'échantillon plus faible, en augmentant le nombre d'extractions possibles dans un même intervalle de temps, en éliminant les risques de perte d'analytes par évaporation ou par dégradation au cours des étapes de traitement de l'échantillon, en utilisant moins de solvant organique et finalement en étant globalement moins couteux à long terme [137]. La Figure 17, illustre la configuration de cette technique en ligne couplée à la chromatographie en phase liquide [138].

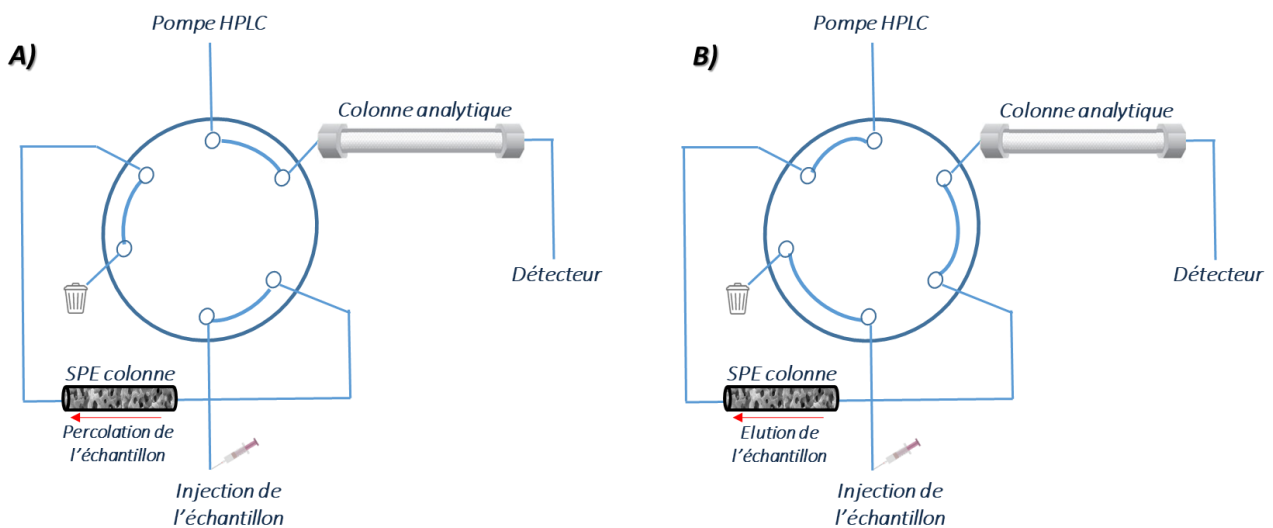


Figure 17 : Configuration de la SPE-LC pour l'étape de percolation de l'échantillon (A) et d'élution (B), adapté de [138].

La SPE en ligne pour l'extraction et l'analyse des AMPA a été étudiée par un groupe de chercheurs relevant du centre norvégien de recherche sur la défense (FFI) qui l'a appliqué à trois reprises pour le traitement de différents types d'échantillons [83][50][84]. Différents dispositifs ont été proposés : une SPE sur carbone graphitique poreux (PGC) associée à une colonne HILIC pour la séparation des AMPA en LC dans l'eau environnementale [83], une SPE sur oxyde de zirconium (ZrO_2) associée à une colonne en phase inverse (RP) dans des extraits aqueux de sols [50] et une SPE sur oxyde de zirconium (ZrO_2) associée à une colonne HILIC dans des fluides biologiques (urines et sérums humains) [84].

Parmi ces travaux, une comparaison de 4 phases, à savoir PGC, MAX, ZrO_2 et oxyde de titane (TiO_2), a montré que la phase en ZrO_2 a plus de potentiel pour l'extraction des analytes étudiés [50]. Cependant afin de réussir l'extraction de ce type d'analytes dans des échantillons d'urine et de sérum humain, une extraction liquide-liquide avec ajout de sel (Salting-out assisted liquid-liquid extraction : SALLE) est nécessaire en amont de la SPE en ligne. La séparation des analytes a été réalisée par chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) plus adaptée au contexte au vu de la phase éluante riche en phase organique utilisée pour l'élution des analytes de l'adsorbant utilisée pour la SPE.

La SPE en ligne souffre cependant de certaines limitations comme la capacité de charge limitée non à cause de l'adsorbent mais à cause de certains automates qui ne permettent pas la percolation de grands volumes d'échantillon mais surtout de l'incompatibilité de certains supports avec le système séparatif sélectionné. En effet, dans le couplage en ligne, l'élution du support SPE contenu dans la précolonne est assurée par la phase mobile dont la composition est fixée en fonction du mode chromatographique choisi et donc de la colonne analytique sélectionnée pour effectuer la séparation. La non-compatibilité certaines phases telle que la MAX a été soulignée [50]. De plus, les précolonnes étant réutilisables, un problème de contamination peut avoir lieu entre les différentes injections [83]. Par ailleurs, elle est sensible à d'autres

phénomènes tels que l'accumulation de pression dans la colonne et le colmatage. Par conséquent, ces systèmes doivent souvent être remplacés, ce qui augmente les coûts pour les laboratoires visant des analyses à haut débit [139]

Les méthodes SPE ont été souvent utilisées et appliquées dans le domaine de l'extraction des agents chimiques de guerre et leurs produits de dégradation [40]. Cependant la majorité des méthodes se font manuellement et séquentiellement sur chaque échantillon. Pour pallier au manque de débit de la méthode, des systèmes SPE à 96-puits ont été utilisés et automatisés [140][141][82]. Cependant, toutes ces méthodes sont consommatrices de solvants et génèrent de grandes quantités de déchets chimiques. A titre d'exemple, l'une des études consomme plus de 25 ml de solvants pour l'extraction des AMPA d'un échantillon d'un millilitre d'urine [82]. Ainsi, elle a été considérée comme non-verte et non respectueuse de l'environnement avec un impact environnemental élevé. De plus, ce type de préparation d'échantillon est connu pour être coûteux selon le type et le nombre de cartouches utilisées par échantillon.

II.2.3. Les méthodes miniaturisées

Les progrès réalisés dans le domaine de la préparation des échantillons sont importants et ont augmenté de manière significative ces dernières années. L'une des avancées les plus importantes dans ce domaine implique la miniaturisation des techniques d'extraction basées sur les procédures classiques de préparation d'échantillons telles que l'extraction liquide-liquide et l'extraction sur phase solide.

Ces techniques modernes ont pris de l'importance face aux méthodes traditionnelles car elles minimisent la consommation de solvants organiques ainsi que le volume d'échantillon.

II.2.3.1. La microextraction en phase solide (SPME)

La microextraction en phase solide (SPME) est une méthode miniaturisée de preconcentration basée sur le partage des analytes entre l'échantillon et une faible couche de polymère (7 à 100 μm) enrobant l'extrémité d'un barreau de silice sur 1 cm. La Figure 18 illustre la constitution d'une fibre SPME et son utilisation. Cette méthode basée sur un équilibre de partage conduit à une extraction non exhaustive, contrairement à la SPE mais s'avère simple, portable, peu coûteuse et ne nécessite aucun solvant. Elle a été développée par Pawliszyn *et al*, en 1990 [142] puis commercialisée à partir de 1993 et est applicable à tous types d'échantillons liquides, gazeux et solides. Plus de 13000 articles ont été publiés en se basant sur le travail de Pawliszyn selon Web of science. Ceci ne peut que témoigner de l'intérêt porté à cette technique dans le domaine de la recherche.

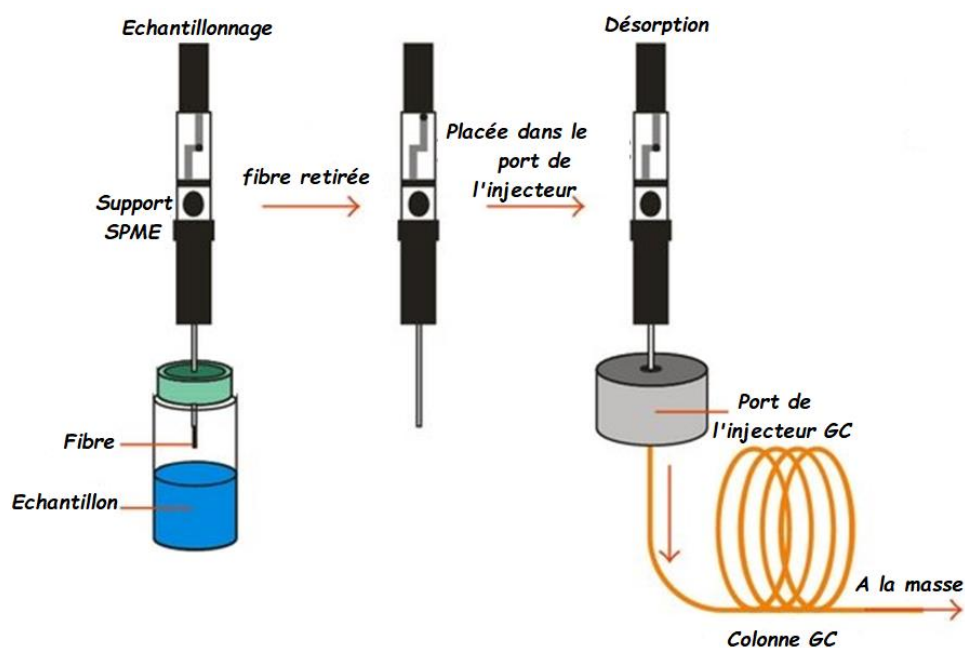


Figure 18 : Constitution de la seringue SPME et son utilisation, adaptée de [143].

La SPME était initialement associée à la chromatographie en phase gazeuse (GC) pour la détermination des composés organiques volatils et modérément volatils dans différents types d'échantillons environnementaux (sol, eau, air) [144], alimentaires [145] ou biologiques [146]. Dans ce cas la désorption des composés de la fibre se fait directement par thermodesorption dans un injecteur de GC conçu pour cette technique. Par la suite, cette technique a également été utilisée avec la chromatographie en phase liquide pour l'analyse des composés et des produits chimiques thermo-dégradables et faiblement volatils qui ne peuvent pas être analysés par GC directement [147]. Dans ce cas la désorption est assurée par immersion de la fibre dans un faible volume de solvant organique.

L'optimisation du processus d'extraction de l'analyte par SPME est basée sur l'équilibre entre l'analyte dans l'échantillon (solution ou espace de tête) et le polymère enrobant la fibre, ce qui nécessite de prendre en compte la nature de la phase stationnaire de la fibre, le pH de la solution, la force ionique, le temps d'échantillonnage, l'agitation et la température de désorption. Ces paramètres peuvent varier considérablement en fonction de la polarité, de la volatilité et de la taille de l'analyte qui entraînent un processus de désorption compétitif [56].

En ce qui concerne le domaine de l'analyse des agents chimiques de guerre et leurs produits chimiques associés, la SPME a été largement décrite dans la littérature comme en témoignent deux revues publiées pour ce domaine [147][148].

Un intérêt particulier a été accordé à l'utilisation de la SPME lors des inspections effectuées sur le terrain par les inspecteurs de l'OIAC tel que le montrent les premiers essais d'adaptation de la technique pour une utilisation sur le terrain entrepris par un groupe de chercheurs relevant du Laboratoire National

Lawrence Livermore en 1994. En effet, ils ont réussi à détecter certains produits résiduels de la synthèse d'agents neurotoxiques et d'autres produits comme le thiodiglycol (TDG), un produit de dégradation de l'ypérite mais à des niveaux de concentration très élevés ($> 30 \mu\text{g/ml}$) [149].

En 1999, l'équipe singapourienne de l'agence de recherche de la défense nationale a utilisé une microfibre SPME en carboxen avec une dérivation *in-situ* pour extraire l'acide éthyl méthylphosphonique (EMPA), l'acide méthylphosphonique (MPA), et l'acide n-pro-pylphosphonique (nPPA) dans l'eau désionisée. Plusieurs paramètres tel que le type de la fibre, l'effet du pH et du contenu en sels et la température de dérivation ont été optimisée, permettant d'atteindre des limites de détection de l'ordre de quelques ng/ml dans ce milieu pur [150]. De même, Koryagina *et al*, ont procédé en 2016 à la détermination des AMPA dans des échantillons d'urine par SPME en utilisant une microfibre StableFlex 50/30 DVB/Carboxen/PDMS. Cette dernière a été d'abord conditionnée pendant 15 min dans l'injecteur à 280°C puis exposée pendant 5 minutes dans un flacon rempli de l'agent de dérivation MTBSTFA. Elle a ensuite été immergée dans l'échantillon pendant 30 minutes sous une agitation continue. Après avoir retiré la fibre, une dérivation des composés ciblés a été réalisée pendant 15 minutes en phase vapeur, et ce par son placement dans le flacon contenant le réactif de silylation. Enfin, la désorption thermique des analytes a été effectuée dans l'injecteur pour entamer leur analyse. Cette méthode de SPME permet de combiner l'extraction d'échantillons à partir d'une matrice, la préconcentration, la dérivation et l'injection en une seule étape d'analyse. Cependant les auteurs évoquent certains problèmes liées à la reproductibilité des résultats qui ne peuvent être fixés qu'avec le maintien précis des conditions opératoires et surtout le recours à l'utilisation des étalons internes [97]. Par ailleurs, la SPME présente plusieurs autres limitations : les fibres SPME ont un cout très élevé et leur durée de vie est limitée puisqu'elles se dégradent au fur et à mesure de leurs utilisations. La perte partielle de leur phase stationnaire impacte directement la résolution par une génération de pics qui peuvent causer une co-élution avec les analytes d'intérêt. De plus, quand la SPME est couplée à une séparation en GC, un problème de contamination entre les différentes injections est possible impliquant la nécessité d'élever la température de désorption et de refaire le conditionnement de la fibre plusieurs fois ce qui est très fastidieux et entraîne des coûts supplémentaires importants [151].

Bien que les fibres SPME disponibles dans le commerce sont actuellement conçues pour l'analyse d'une large gamme de produits chimiques, de nouveaux revêtements de fibres SPME devraient être développés pour augmenter la sensibilité, abaisser les niveaux de détection et augmenter la sélectivité pour la détermination des produits de dégradation d'armes chimiques.

Pour améliorer la sensibilité de la SPME et remédier au problème de fragilité des fibres SPME, de nouvelles approches basées sur l'augmentation de la quantité de la phase utilisée avec des géométries différentes ont été adoptées comme c'est le cas pour Microextraction sur barreau aimanté (SBSE)[152].

II.2.3.2. La microextraction sur barreau aimanté (SBSE)

La technique de microextraction sur barreau aimanté (Stir Bare Sorptive Extraction, SBSE) a été mise en place initialement par Erik Baltussen *et al*, pour extraire des analytes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques d'une matrice aqueuse en 1999 [152]. Elle est basée sur le même principe de fonctionnement que la SPME. Son dispositif est présenté sur la Figure 19. Il s'agit de barreaux de 10 à 20 mm de long enrobés de 0,5 à 1 mm de PDMS, soit un volume de phase compris entre 24 et 126 μL au lieu de 0,5 μL pour les fibres les plus épaisses de SPME. Le barreau est introduit dans l'échantillon liquide et agité par le biais d'un agitateur magnétique. Après un temps d'extraction suffisant à optimiser, le barreau est retiré de l'échantillon, séché, introduit dans un tube, puis installé sur un passeur de chromatographie en phase gazeuse pour effectuer une thermodésorption des analytes qui y sont piégés [153].

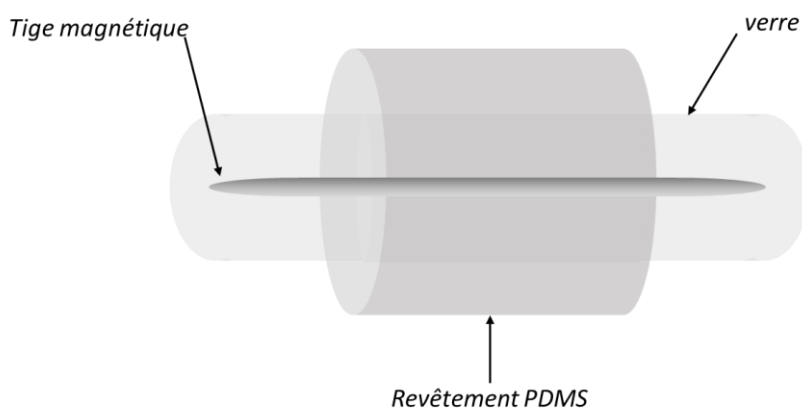


Figure 19 : Présentation de la technique SBSE, adapté de [154].

Les analytes peuvent également être désorbés en ayant recours à un solvant, puis être injectés en chromatographie en phase liquide. La société Gerstel GmbH & Co a automatisé ce processus [155].

Tout comme en SPME, il est nécessaire d'optimiser de nombreuses conditions pour obtenir une extraction efficace comme la température et durée d'extraction. Le barreau utilisé pour la SBSE est plus robuste que les fibres utilisées en SPME et présente l'avantage de posséder une quantité de phase stationnaire jusqu'à 250 fois plus importante permettant d'augmenter par ce facteur la quantité d'analyte extraite et ainsi de gagner en sensibilité pour des analytes polaires trop faiblement extraits en SPME [156].

Cependant, en raison du caractère apolaire du PDMS, seule phase commercialisée pour le SBSE, elle a été principalement appliquée pour extraire des composés non polaires ou faiblement polaires, et a échoué dans l'extraction de composés fortement polaires comme les phénols [157]. Des tentatives ont été effectuées pour trouver des alternatives au PDMS comme revêtement. Mais il apparaît que les matériaux testés ont montré de nombreuses limites, entre autre le « bleeding » excessif lors de la thermodésorption, la non-

reproductibilité des revêtements ou juste des améliorations légères en comparaison au PDMS, et qui ne constituent pas un intérêt justifiant son introduction commerciale [158].

Par ailleurs et afin de résoudre cette problématique d'affinité des analytes polaires sur les revêtements de la SBSE en PDMS, une autre approche qui implique le recours à la dérivation en son mode *in-situ*, c'est-à-dire diminuer la polarité des AMPA par dérivation afin de pouvoir les extraire [158].

Une seule étude visant l'extraction des AMPA avec cette technique a été rapportée. Cela est sûrement dû à la non existence de phases adaptées pour l'extraction de ce type d'analytes très polaires. En effet, Li *et al*, ont dû concevoir une nouvelle phase à l'échelle du laboratoire à partir d'une SBSE commerciale en PDMS pour disposer d'une phase finale riche en oxyde de zirconium (ZrO_2) capable d'extraire les AMPA, comme déjà évoqué dans la partie SPE. La méthode finale présentée a montré un très grand potentiel pour l'extraction des AMPA dans leur état non-dérivés avec des taux d'extraction supérieurs à 94% pour les trois analytes étudiés (MPA, EMPA et PMPA) après 20 minutes d'extraction et 20 minutes de désorption dans une solution de NH_4OH et de méthanol dans un bain ultrason. Des limites de détection de l'ordre de 15 ng/ml ont été obtenues après analyse par CE-UV indirecte dans des eaux environnementales mais les volumes d'échantillons utilisées étaient importants (10 ml) [159].

II.2.3.3. La microextraction en phase solide dispersive (DSPE)

La microextraction en phase solide dispersive (DSPE) consiste à disperser des particules solides dans un échantillon généralement aqueux (étapes a et b de la Figure 20). Le fait de travailler généralement avec des particules de faibles granulométrie voire des nanoparticules augmente la surface spécifique disponible et donc la surface de contact entre les analytes et l'adsorbant par rapport à une extraction SPE traditionnelle. Comme en SPME et SBSE, le mécanisme de partage impose un temps d'équilibre suffisant pour que les composés soient extraits par les particules. Après centrifugation ou l'utilisation d'un aimant (dans le cas de particules magnétiques), pour séparer les particules de phase du surnageant, un solvant organique approprié est ensuite utilisé pour éluer les analytes de l'adsorbant solide, étape nécessitant à nouveau une mise à l'équilibre. L'extrait organique est ensuite injecté pour analyse par une technique appropriée après une éventuelle étape de reconcentration par évaporation.

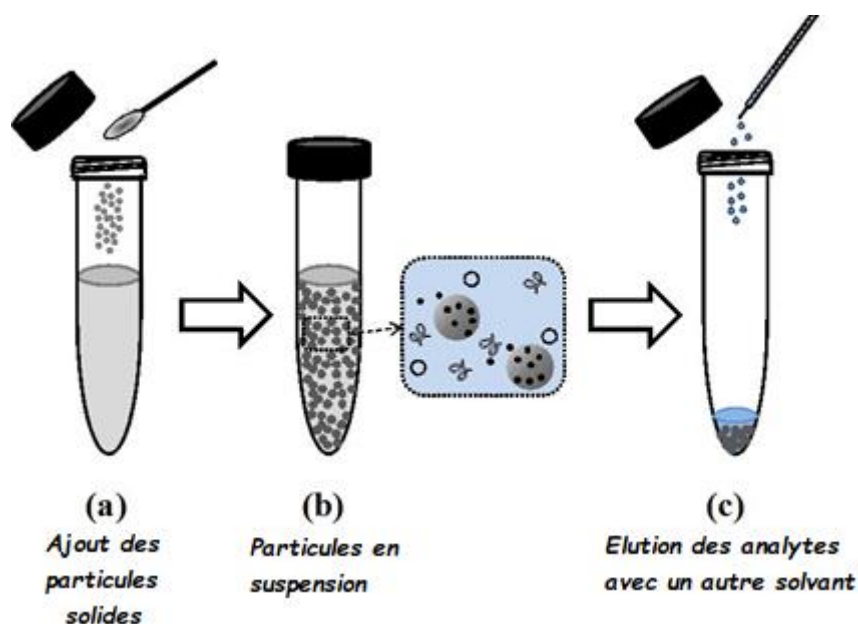


Figure 20 : Représentation de la technique de microextraction en phase solide dispersive (DSPE), adapté de [160]

La DSPE utilisant une phase Oasis HLB a été utilisée dans le domaine des armes chimiques pour l'analyse, l'identification et la quantification des marqueurs et produits de dégradation des agents neurotoxiques tel que des acides diméthyle méthylphosphonique (DMMP), dipropyle méthylphosphonique (DPMP), di-isopropyle méthylphosphonique (DIMP) et dihexyle méthylphosphonique (DHMP) dans des matrices aqueuses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) [161].

Par ailleurs de nouvelles résines HLB ont été aussi synthétisés et testées pour une meilleure extraction des agents chimiques toxiques et leurs produits de dégradation à l'instar de la résine hybride magnétique (MHLB) constituée de particules sphériques avec une taille de 200–260 nm, préparée par polymérisation à partir de N-vinylpyrrolidone (PVP), divinylbenzène (DVB) comme monomère et des nanoparticules de Fe_2O_3 (matériau magnétique) [162]. Les avantages de la méthode développée grâce à cette nouvelle résine faite-maison est la mouillabilité à l'eau, la finesse des particules assurant un transfert de masse rapide des analytes, la désorption facile des analytes et la simplicité opérationnelle.

Dubey *et al*, ont aussi utilisé la microextraction en phase solide dispersive magnétique (MDSPE) comme technique d'extraction de plusieurs agents chimiques toxique de guerre comme le sarin et le tabun et leurs marqueurs comme l'acide di éthyle méthylphosphonique (DEMP) d'une matrice organique (dodécane, n-hexane et huile de silicium. Pour se faire, ils ont synthétisé un nouvel adsorbant magnétique (nanoparticules de Fe_2O_3 qui ont été enrobés d'acide méthacrylique-co-éthylène glycol diméthacrylate, $\text{Fe}_2\text{O}_3@Poly(\text{MAA-co-EGDMA})$). La méthode développée avec ce nouveau support a permis d'obtenir des taux d'extraction allant de 53 à 97% en fonction des composés [163].

Cependant toutes ces méthodes sont fastidieuses et nécessitent un choix judicieux de la phase solide à utiliser pour l'extraction à l'instar de toutes les extractions sur phase solide. De plus, l'étape de désorption des analytes peut être source de nombreux problèmes notamment de contamination.

En ce qui concerne les AMPA, aucun travail impliquant l'utilisation de ce type de traitement de l'échantillon n'a été mentionné dans la littérature. Probablement, à cause du manque d'une phase adsorbante adéquate pour ce type d'analytes.

II.2.3.4. La microextraction sur simple goutte (SDME)

Le développement de la miniaturisation de l'extraction liquide-liquide durant les deux dernières décennies a conduit au développement de la SDME (Single Drop Microextraction) [164][165] où les analytes d'intérêt sont extraits d'une phase aqueuse par une petite goutte de solvant organique non miscible suspendue à la pointe d'une micro seringue. La goutte est ensuite rétractée dans la micro seringue avant d'être injectée dans un système d'analyse chromatographique pour analyse [166] [167][168][169].

La SDME a été développée principalement pour : (i) réduire la consommation des solvants ; (ii) augmenter la pré concentration des analytes (iii) éliminer le recours à une étape d'évaporation (iv) et améliorer la compatibilité de l'échantillon avec la LC.

Liu et Dasgupta ont été les premiers à mettre en œuvre cette technique d'extraction, en proposant un système d'extraction de goutte-à-goutte dans lequel une microgoutte d'un solvant organique non miscible à l'eau (1,3 μL), suspendue dans une goutte plus grande de l'échantillon aqueux. La phase aqueuse (l'échantillon) est délivrée en continu dans la goutte externe et elle est aspirée en même temps pour assurer un flux continu d'échantillon. L'analyse a été réalisée par un détecteur d'absorbance à base de diode électroluminescente. En effet, la préconcentration de l'analyte dans la goutte organique lui fait changer sa couleur, ce qui est mesurable et correspond à maximum d'absorbance. La Figure 21 présente le dispositif de cette technique tel que proposé par ses inventeurs [164][151].

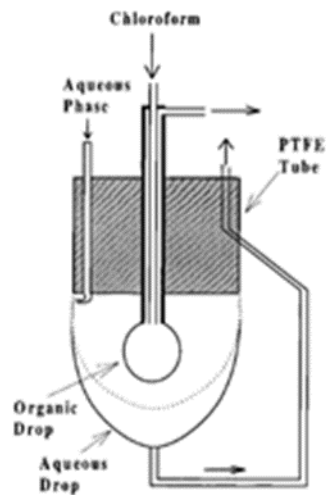


Figure 21 : Représentation de la technique SDME telle que proposée par Liu et Dasgupta [164]

Cantwell *et al*, ont été les premiers à développer une SDME directement compatible avec un système chromatographique [168][165]. La Figure 22 présente une configuration simple de cette technique. Il s'agit de l'utilisation d'une seringue pour manipuler la phase acceptrice (la goutte) pour permettre son injection directe en GC [170] et/ou en LC [171].

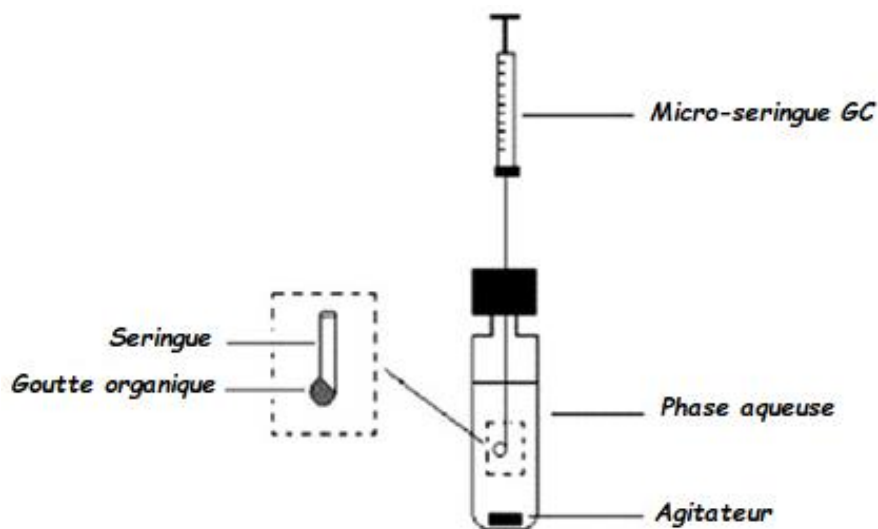


Figure 22 : Configuration du système SDME (travaux de Cantwell), adapté de [168].

Plusieurs travaux ont été publiés en utilisant cette technique de préparation de l'échantillon [172] mais surtout pour l'extraction de composés hydrophobes comme le Sarin, le cyclo-sarin, l'ypérite et certains de leurs marqueurs dans des matrices aqueuses. Dans le même domaine, Park *et al*, [173] ont utilisé la SDME avec paire d'ions suivie d'une analyse par GC-MS pour la détermination des produits de dégradation des agents toxiques de guerres : EMPA pour le VX, PMPA pour le GD, TGA pour le HD et BA pour le BZ dans l'eau pure. Les analytes de nature acide ont formé des complexes avec l'agent de paires d'ions, le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), avant d'être extrait dans une goutte de chloroforme contenant un agent

de dérivation (MTBSTFA) pour permettre une dérivation *in-situ* dans le port d'injection du système GC. Les facteurs d'enrichissements étaient de 1 et 276 pour l'EMPA et le PMPA, respectivement et les limites de détections étaient de l'ordre de 0.05 ng/ml dans l'eau pure.

Xu *et al*, ont proposé une autre configuration de la SDME. Leur méthode consiste en une extraction initiale dans un film d'octanol, puis une extraction dans une goutte de phase aqueuse présente dans ce film tel que montré sur la Figure 23. Ainsi, ils ont réussi à extraire quatre produits de dégradations des agents neurotoxiques à savoir le MPA, l'EMPA, l'iPrMPA et le CMPA. Lors de cette étude les analytes ciblés ont été convertis à leurs états de complexes paires d'ions et d'importants facteurs d'enrichissements ont été obtenus, variant de 450 à 11900 [174].

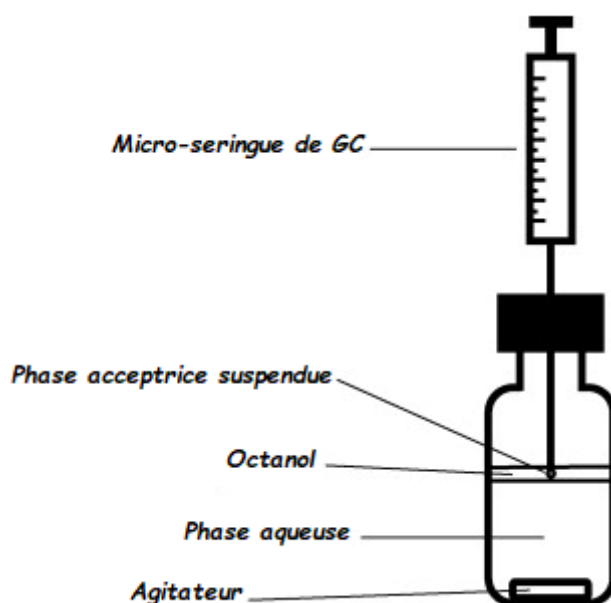


Figure 23 : Système SDME des AMPA, adapté de [174].

Cependant, il existe certains problèmes qui peuvent engendrer des limitations à cette technique, tels que l'instabilité de la goutte au contact des matrices complexes qui peut être perdue lors de l'extraction sous agitation. Aussi les variations causés par l'évaporation du solvant pendant l'extraction, peut nuire à la répétabilité [166].

II.2.3.5. La microextraction liquide-liquide dispersive (DLLME)

La micro extraction liquide-liquide dispersive (DLLME) a été introduite par Assadi *et al*, en 2006 pour l'analyse des hydrocarbures poly-aromatiques cycliques dans l'eau. Elle consiste à injecter dans l'échantillon aqueux un faible volume de solvant extractant (5-100 μ l), non miscible avec l'eau, dilué dans un solvant dispersif (0,2-1 ml). Les analytes sont extraits de la phase aqueuse et récupérés dans le petit volume de phase organique après centrifugation du mélange. Ses différentes étapes sont présentées sur la Figure 24 [175]. Initialement, le mélange binaire composé de solvant dispersif et de solvant extractant est injecté dans

l'échantillon. Un état trouble est vite constitué. Suite à lequel une étape de centrifugation doit être accomplie pour séparer les phases. La phase sédimentée est finalement récupérée pour analyse. La DLLME est actuellement un domaine de recherche très actif et près de 2500 publications existent dans la littérature avec près de 531 articles rien que pour la période 2019-2022. La majorité de ces articles présentent la DLLME pour une application à partir d'échantillons d'eaux (analyse environnementale), d'aliments et de boissons. Ceci est dû à sa simplicité de son fonctionnement, sa rapidité et surtout elle ne nécessite aucun équipement spécialisé [176].

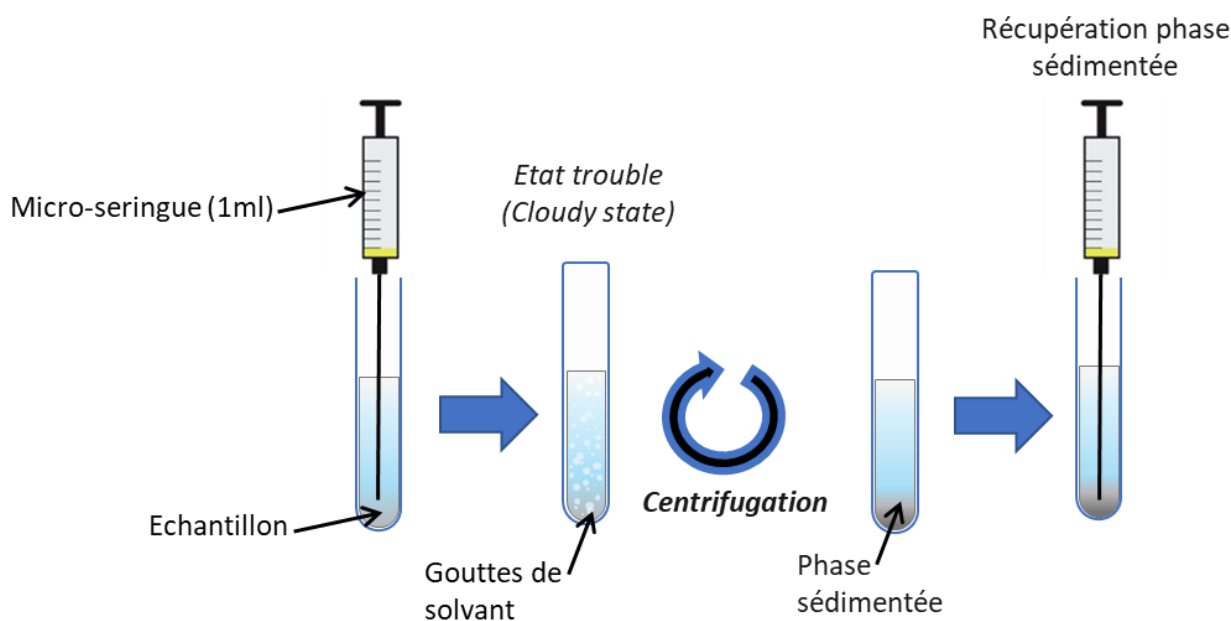


Figure 24 : Représentation de la technique de micro extraction liquide-liquide dispersive, adapté de [175]

Malgré les applications nombreuses de cette technique, aucune étude dans la littérature n'a mentionné son utilisation pour l'extraction des AMPA, probablement à cause de la difficulté de trouver les solvants adéquats pour leur extraction.

En dehors des avantages de la technique, cités précédemment, elle présente certains inconvénients comme l'utilisation de solvants halogénés toxiques, tels que le chlorobenzène, le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone, et le fait que son automatiser pour le traitement haut débit des échantillons reste dans ses débuts et pas encore suffisamment mature. Par ailleurs, peu d'applications de cette technique sur des échantillons de sérum et de sang ont vu le jour et ce à cause des propriétés émulsifiantes de ces échantillons qui posent problème lors du protocole d'extraction. En effet, ces échantillons constituent des mélange hétérogène avec la phase à extraire rendant la séparation de phase difficile [176].

II.2.3.6. La microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME)

Pedersen-Bjergaard a introduit en 1999 une technique de microextraction, initialement appelée microextraction liquide-liquide-liquide (LLLME) pour pallier les inconvénients associés à la stabilité des

gouttes et à la surface de solvant limitée de la SDME [177][178]. Cette technique a été ensuite connue sous le nom de microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME). Il s'agit d'un nouveau mode de LPME basé sur l'utilisation de fibres creuses économiques et jetables comme support de la phase liquide extractante. La HF-LPME figure parmi les techniques membranaires dont le procédé d'extraction se fait à travers un solvant organique qui est immobilisé dans les pores des parois d'une fibre creuse en polymère pour donner ce qu'on appelle la membrane liquide supportée (SLM) ou membrane liquide. La fibre creuse est ensuite placée dans la solution d'échantillon aqueux à analyser. Une solution acceptrice (qui peut être aqueuse ou organique) est contenue à l'intérieur de la fibre creuse. Quand le volume de la phase acceptrice est généralement compris entre 5 et 50 μL , celui de l'échantillon est par contre beaucoup plus important. Il peut varier de quelques millilitres à un litre voire plus [179][180]. C'est ce rapport important entre les volumes des deux phases associé à un bon rendement d'extraction qui permet d'avoir d'excellents facteurs d'enrichissements tel que donné par l'équation :

$$FE = \frac{C_{a,finale}}{C_{d,initiale}} = \frac{R}{100} * \frac{V_d}{V_a}$$

Où R est taux d'extraction exprimé en pourcentage. $C_{d,initiale}$ est la concentration initiale de la substance à analyser dans la phase donneuse et $C_{a,finale}$ est la concentration finale de la substance à analyser présente dans la phase acceptrice. V_d et V_a représentent les volumes des phases donneuse et acceptrice, respectivement.

Comparée à d'autres méthodes LPME, la HF-LPME présente une efficacité d'extraction plus élevée, qui peut être attribuée au processus de transfert de masse amélioré par l'agitation vigoureuse de l'échantillon lors de l'extraction grâce aux fibres creuses qui maintient le solvant organique. Cette agitation permet de favoriser la convection dans la solution d'échantillon, ce qui n'est pas envisageable en SDME puisque la goutte peut être instable et facilement perdue lors de cette forte agitation. Par ailleurs, son pouvoir de préconcentration a fait d'elle une technique de choix pendant les deux dernières décennies. En effet, des facteurs d'enrichissement élevés allant jusqu'à 27 000 peuvent être obtenus par cette méthode [181]. Ainsi, depuis son apparition, elle a été utilisée pour une large variété d'applications comme l'analyse des phénols, des acides carboxyliques, des œstrogènes, des fongicides, des pesticides, de divers médicaments et d'agents chimiques toxiques de guerre et de leurs produits de dégradation [178][182].

La fibre creuse en HF-LPME peut être placée selon plusieurs configurations. Les plus connues dans la littérature sont les configurations D et U. Cette dernière a été introduite lors du premier travail sur la HF-LPME [177] et elle consiste à l'insertion d'une fibre creuse sous forme de lettre « U » dans l'échantillon. Où chacune de ses extrémités sont déjà reliées à deux aiguilles en acier. La première servait à guider une micro-

seringue dans la cavité de la fibre pour délivrer la solution acceptrice, tandis que la deuxième aiguille est utilisée pour faire sortir la phase acceptrice une fois l'extraction terminée.

En dépit des excellentes performances obtenues avec cette configuration, sa procédure de transfert de la solution acceptrice reste difficile à mettre en œuvre et surtout très compliquée à automatiser.

C'est pour cette raison qu'une version simplifiée a été proposée. Il s'agit de la configuration D, qui est la plus couramment utilisée. C'est une version simplifiée où une des extrémités de la fibre est directement connectée à la micro-seringue qui a le double rôle d'injecter et de récupérer la solution aqueuse après le processus d'extraction. L'autre extrémité n'a aucun rôle à jouer, elle est tout simplement scellée. La Figure 25 donne une illustration du dispositif de la HF-LPME sous ses deux configurations D et U [160][183].

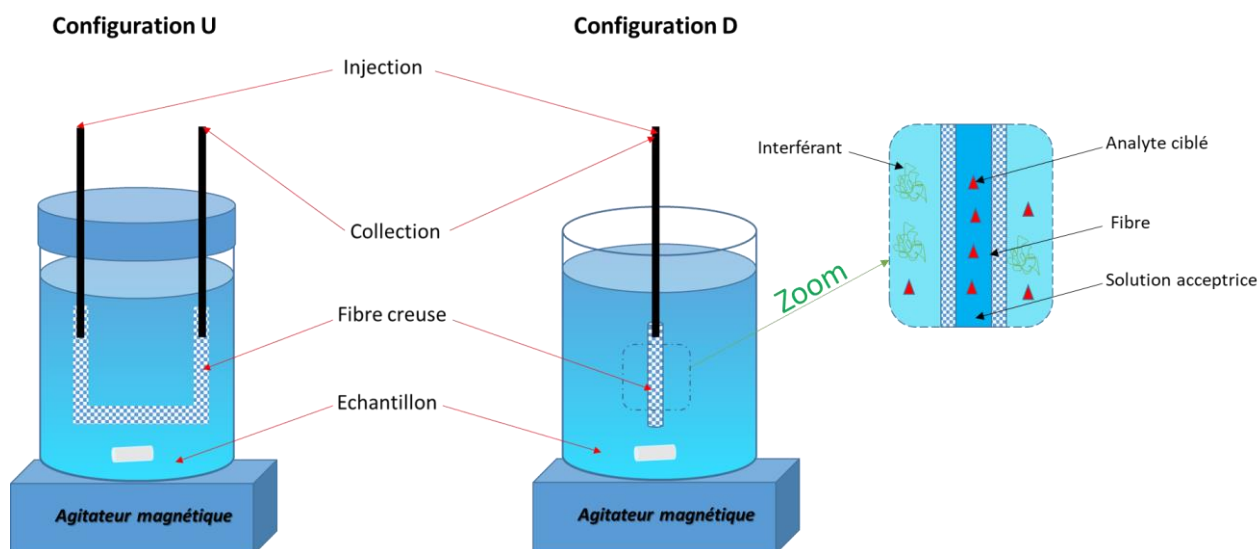


Figure 25 : Microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse en configuration D (à droite) : (a) phase donneuse (b) fibre creuse avec sa phase organique (c) phase acceptrice. Et configuration U (à gauche) [160][183].

D'une manière générale et quelle que soit configuration de la HF-LPME, les fibres creuses utilisées sont de très petites tailles, ce qui conduit à utiliser de petits volumes de solvant et donc de considérer cette méthode comme une technique de microextraction. De plus, la quasi-totalité des systèmes utilisés en HF-LPME sont basés sur des fibres en polypropylène (PP) car ce polymère hydrophobe est compatible avec un grand nombre de solvant [184]. Le type de propylène utilisé est le « Accurel Q 3/2 » de la société Membrana avec un diamètre intérieur de 600 μm , une épaisseur de 200 μm , un diamètre de pore de 0.2 μm et dont la porosité est d'environ 70 %. La grande porosité de ce polymère assure l'immobilisation de grandes quantités de solvants dans la membrane [172]. La figure 26-A est une photo qui illustre les petites dimensions d'une fibre creuse ainsi qu'une photo 26-B prise par microscope électronique à balayage (MEB x1000) du polypropylène Accurel Q 3/2 qui constitue cette fibre.

Il existe des tentatives visant à remplacer ce matériau par d'autres polymères. Jager *et al*, ont essayé de remplacer les fibres creuses en PP par une fibre creuse Cellmax® en difluorure de polyvinylidène (PVDF) pour l'extraction de la cocaïne et ses métabolites mais sans succès [185], tandis que dans une autre étude, les fibres en PVDF se sont avérées plus appropriées que celles en PP pour extraire du flunitrazépam dans le plasma et l'urine [186]. Le même constat a été fait lorsqu'une SLM constituée de fibre creuse en PVDF et d'octanol a été comparée à plusieurs SLM constituées de fibres creuses en PP imprégnés par divers solvants organiques pour l'extraction des pesticides organochlorés à partir des échantillons textiles [187]. Très récemment, un groupe de chercheurs chinois ont modifié la composition chimique des fibres creuses en PP par l'ajout des nanoparticules de sépiolite. Il s'agit d'une silicate de magnésium hydraté de formule cellulaire unitaire théorique $Mg_8Si_{12}O_{30}(OH)_4 \cdot (H_2O)_4 \cdot 8H_2O$. Cette fibre a présenté une excellente force de liaison au solvant et un excellent effet de transfert de masse par rapport à la technique d'extraction conventionnelle, ce qui a pu améliorer l'extraction de cinq agents de blanchiment fluorescents issus d'emballages plastiques alimentaires [188].

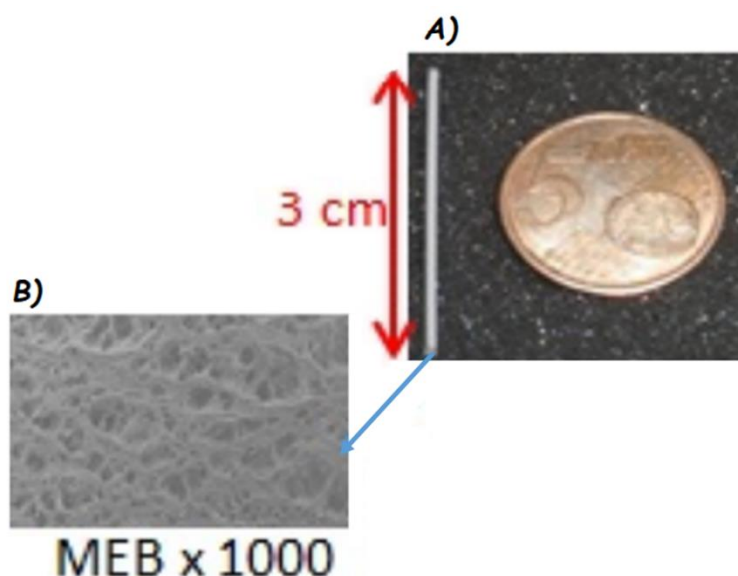


Figure 26 : Photo de la fibre creuse : A) une section de la fibre creuse en HF-LPME en propylène poreux vue par microscope électronique à balayage (MEB x1000), B) Dimensions de la fibre comparée à une pièce de 5 centimes [189].

La HF-LPME peut être également réalisée en deux modes différents selon le nombre de phases liquides impliquées. Ainsi, on évoque le mode biphasique (2 phases) ou triphasique (3 phases). Dans la HF-LPME biphasique, la phase acceptrice est généralement composée du même solvant organique que celui utilisé pour former la SLM (Figure 27-a) [190]. Le système triphasique, consiste, quant à lui, en un système aqueux-organique-aqueux dans lequel le solvant organique immobilisé dans la membrane est exposé à deux phases aqueuses, d'une part la solution d'échantillon et la phase acceptrice située à l'intérieur de la fibre creuse, pour assurer leur non miscibilité (Figure 27-b).

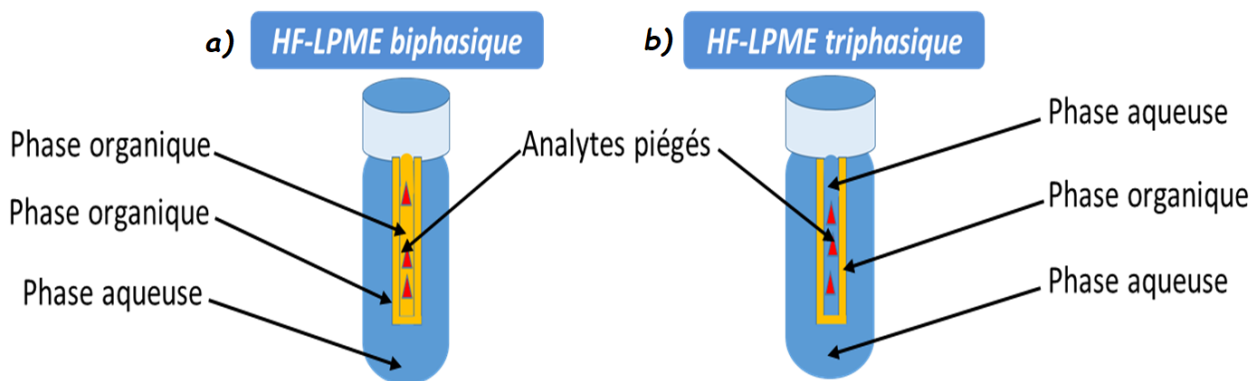


Figure 27 : Microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse en mode biphasique et mode triphasique, adapté de [191].

Il convient de mentionner que l'avantage d'avoir ces deux modes réside dans la nature de l'extrait final et sa compatibilité avec les instruments analytiques. En effet, l'extrait de nature organique obtenu avec le mode biphasique est aisément compatible avec des analyses par GC tandis que l'extrait aqueux d'une HF-LPME triphasique est compatible avec une analyse en LC [87]. Par ailleurs, la HF-LPME biphasique est mieux adaptée à l'extraction des analytes hydrophobes non chargés, qui ne peuvent pas être extraits efficacement par le mode triphasique. En effet, cette classe d'analytes dispose d'une solubilité plus élevée dans les solvants organiques que dans l'eau. Cependant quand il s'agit de l'extraction des analytes ionisables qu'ils soient de caractère basique ou acide, la HF-LPME triphasique est beaucoup plus adaptée.

Dans le domaine des agents chimiques de guerre et leurs produits de dégradation, la HF-LPME a été utilisée avec ses deux modes biphasique et triphasique à plusieurs reprises pour l'extraction des agents parents et/ou leurs produits de dégradations. Le premier travail présenté en 2006 par l'équipe de VERTOX (un laboratoire indien accrédité par l'OIAC) porte sur l'extraction par HF-LPME biphasique des agents chimiques de guerre GA, HD et leurs analogues [192]. Lors de cette étude, le trichloréthylène a été sélectionné comme solvant d'extraction. Des facteurs d'enrichissements allant de 41 à 231 ont été obtenus avec des LODs dans l'intervalle de 0.1 à 10 ng/ml.

En parallèle et dans la même année, une équipe singapourienne du laboratoire DSO a présenté une méthode HF-LPME biphasique similaire à l'étude précédente pour l'extraction des agents chimiques de guerre (GB, GD, GA, VX et HD) à l'état de traces à partir d'échantillons d'eau pure et de boue. Le choix du solvant pour l'extraction de ce type de composés a été encore optimisé en optant pour le chloroforme au lieu du dichlorométhane, toluène, trichloréthylène et le tétrachlorométhane. Les facteurs d'enrichissement de cette méthode n'ont pas été communiqués. Cependant, une nette amélioration des LODs a été observée comparée à l'étude indienne. Lors de cette étude, les auteurs ont procédé à une comparaison entre les performances de la méthode HF-LPME biphasique développée avec la SDME et la SPME en terme de sensibilité pour mettre en avant la supériorité de la HF-LPME comme méthode de préconcentration [193].

Il existe à ce jour 5 études qui ont utilisé la HF-LPME pour extraire les AMPA de différentes eaux, Parmi ces études, 3 études ont eu recours à la HF-LPME biphasique et 2 à la HF-LPME triphasique. Le détail des conditions opératoires de ces méthodes ainsi que leurs performances en termes d'extraction (rendement, FE) et de sensibilité (LOD ou LOQ) sont répertoriées dans le Tableau 4.

En mode biphasique, l'extraction et l'analyse des AMPA ne peut se faire qu'après dérivation. Ainsi, les 3 méthodes HF-LPME en mode biphasique ont été associées à l'utilisation de 3 agents de dérivation différents : le MTBSTFA (proposée par une l'équipe singapourienne de Hian Kee Lee relevant du laboratoire DSO) [194], le 1-bromopropane (proposée par une équipe indienne relevant du laboratoire VERTOX) [195] et le 1-(diazométhyl)-3,5-bis(trifluorométhyl) benzène (35F) (proposée par une équipe finlandaise relevant du laboratoire VERIFIN) [196].

Bien qu'étant la plus ancienne, la HF-LPME biphasique basée sur l'utilisation du MTBSTFA et chloroforme (V : V, 1 : 1) reste la plus performante [194]. Si on la compare à la HF-LPME biphasique basée sur l'alkylation des AMPA par le 1-bromopropane [195], on constate que cette dernière implique une procédure lourde de plusieurs étapes. De plus, cette méthode reste peu sensible comparée à celle basée sur l'utilisation de MTBSTFA, qui permet d'atteindre des LOD 4500 à 5000 fois plus faibles. De plus, cette procédure consiste à l'extraction directe des AMPA silylés, puisque la dérivation se fait *in-situ*, c'est-à-dire en même moment que l'extraction.

Tableau 4 : Etat de l'art des méthodes HF-LPME en mode biphasique et triphasique pour l'extraction et l'analyse des AMPAS

| Analytes | Mode | Matrice | Vd/Va (ml / µl) | pHd/ pHa | Ajout de sel (NaCl) (w/v) | Solvant | Membrane | Vitesse d'agitation (rpm) | t _{ext} (min) | FE | Technique | LOD* ou LOQ** (ng/ml) | Ref |
|---|-------------|---|--------------------|-------------|------------------------------------|---|----------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------------|-------|
| | | | | | | | | | | R(%) | | | |
| MPA, EMPA, iPrMPA, PMPA et d'autres produits de dégradation du gaz moutarde | Biphasique | Eau pure | 3 / 5 | 0/ORG | 33% | CHCl ₃ / MTBSTFA (1:1, v :v) | PP | 1000 | 45 min | 2 à 216 0.33 à 36 | GC-MS (avec dérivation) | 0.01– 0.54* | [194] |
| | | Eau usée | 1.5 / 8 | 13/ORG | 0% | C ₂ HCl ₃ | PP | 1000 | 30 min | n.c | GC-MS (avec dérivation) | 100- 750* | [195] |
| | | Eau du robinet, eau de rivière et urine | 4 / 5 | 1.8/ORG | >30% | Heptane + 35F | PP | 400 | 70 min | <40 <0.05 | GC-MS (avec dérivation) | 0.1– 10** | [196] |
| iPrMPA, iBMPA, PMPA, PenMPA, HMPA, HepMPA, PenIPA, MMPA | Triphasique | Eau pure | 6 / 8 | 1/14 | 10% | 1-octanol | PP | 900 | 60 min | 11 à 135 1.5 à 18 | LC-ESI ⁺ - MS/MS (sans dérivation) | 0.1- 100* | [86] |
| MPA, EMPA, iPrMPA, iBMPA, CpenMPA, PMPA | | Eau pure, eau simulée, eau de rivière et urine | 3 / 6 | 1/14 | 30% | 1-octanol | PP | 600 | 50 min | 0.3-225 6*10 ⁻³ -45 | LC-ESI- MS (sans dérivation) | 0.013- 63.5** | [87] |

35F : 1-(diazométhyl)-3,5-bis(trifluorométhyl) benzène, EPA : acide éthylphosphonique, PPA : acide propylphosphonique, PIPA : acide O-propyl isopropylphosphonique, MMPA : acide méthyl méthylphosphonique ; PenMPA : *acide n*-pentyl méthylphosphonique ; HMPA : *acide n*-hexyl méthylphosphonique ; HepMPA : *acide n*-heptyl méthylphosphonique ; PiPrPA : *acide n*-pentyl méthylphosphonique ; CpenMPA : *acide cyclo*-pentyl méthylphosphonique ; C₂HCl₃ : trichloréthylène ; CHCl₃ : chloroforme ; MTBSTFA : N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide

La méthode présentée en 2016 par l'équipe finlandaise de VERIFIN [196] qui consiste au remplacement du MTBSTFA utilisé précédemment et qui est connu pour sa sensibilité à l'eau par un agent de dérivation plus stable, à savoir le 1-(diazométhyl)-3,5-bis(trifluorométhyl) benzène (35F). Si cette méthode présente l'avantage d'une dérivation et d'une extraction simultanées en 70 minutes, la récupération des AMPA dérivés reste l'étape la plus compliquée. Elle implique de couper la fibre creuse en petits morceaux une fois l'extraction terminée, et de les mettre dans une solution d'heptane avant une étape de 15 minutes de sonication. Le volume de la solution finale est enfin réduit par évaporation partielle (sous flux de N₂) jusqu'à obtention d'un volume d'extrait de 100 µl. Par ailleurs, les limites de détections obtenues par cette méthode étaient 10 à 20 fois plus élevées que la méthode HFLPME associée à l'utilisation du MTBSTFA [194].

Cette méthode paraît donc la plus simple à mettre en œuvre mais elle n'a été utilisée que pour extraire les AMPA d'eau pure dopée. Il paraît donc nécessaire de vérifier ses performances lors de son application pour les échantillons biologiques. Les travaux de thèse de Desoubries font mention d'essais visant à prendre en main cette technique pour l'extraction du PMPA et du thiodiglycol (TDG : produit de dégradation du gaz moutarde), et pour une éventuelle application au niveau du centre DGA MNRBC. Cependant, les essais entrepris ont conclu à l'extrême difficulté de remplir la fibre en solvant (chloroforme) sans que celui-ci ne s'évapore rapidement (pression de vapeur saturante : 21.2 kPa à 20 °C). Des précautions ont été prises pour réduire cette volatilité en éteignant les hottes aspirantes et en introduisant la fibre rapidement dans l'échantillon. Ceci a pu résoudre le problème partiellement, car à la fin des expériences seulement des volumes de l'ordre de 3 µL (37%) peuvent être récupérés au lieu des 8 µL initialement introduit. De plus, les extraits récupérés étaient souvent mélangés à de l'eau provenant de l'échantillon et les FE étaient très faibles, ne dépassant pas 1.

Toujours dans le même contexte, Desoubries *et al*, a opté pour le remplacement du chloroforme par un autre solvant moins volatil et connu pour son efficacité à extraire ce type de molécules, le trichloréthylène, ce qui a permis d'augmenter grandement le FE (73 ± 28.4) mais avec de grands écarts type qui ont été expliqués par les variations de taux de conversion lors de dérivation par le MTBSTFA. De plus, le problème de l'eau était toujours présent dans l'extrait, compliquant les analyses par GC-MS. Ainsi, il a été décidé d'abandonner cette approche d'extraction biphasique pour tenter la HF-LPME dans son mode triphasique.

L'extraction des AMPA par un système d'extraction liquide assistée par fibre creuse en mode triphasique a été initialement présentée par l'équipe de VERTOX en 2009 [86]. La méthode présentée était uniquement appliquée sur des échantillons d'eau pure pour l'extraction des AMPA suivants :

iPrMPA, iBMPA, PMPA, PenMPA, HMPA, HepMPA, PenIPA et MMPA. Lors de cette étude, seulement deux solvants, le toluène et le 1-octanol, ont été testés et le 1-octanol s'est avéré le plus adapté à l'extraction des AMPA.

Après optimisation de la méthode en termes de pH de la phase donneuse et de la phase acceptrice, de temps d'extraction, de vitesse d'agitation et de concentration en sel (Tableau 5), la méthode a été évaluée en terme de linéarité, de répétabilité, de sensibilité (FE et LOQ). Les coefficients de corrélation étaient supérieurs à 0.98, les coefficients de variation (CV) étaient inférieurs à 10%, les FE varient entre 11 et 135 et les LOD étaient dans la gamme de 0.1 à 100 ng/ml.

L'équipe de VERTOX n'avait pas pris en considération certains paramètres opérationnels importants en HF-LPME lors de son développement tel que les volumes des phases donneuse et acceptrice, la température appliquée lors du processus d'extraction ou encore le temps d'immersion de la fibre dans le solvant organique. De plus, elle ne l'avait pas évaluée sur des échantillons réels ni pour extraire l'AMPA le plus polaire, à savoir le MPA. Aussi, Desoubries *et al*, ont réoptimiser la méthode en 2012 ce qui a permis de multiplier les FE par environ 2.7 pour les analytes ciblés dans les deux études (PMPA, iBMPA et iPrMPA). De plus l'association de cette optimisation de la méthode de HF-LPME avec une méthode d'analyse en LC-MS plus sensible a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode globale de 12 à 30 fois. Les valeurs optimisées des paramètres d'extraction en HF-LPME des AMPA des deux méthodes précédentes dans l'eau pure sont présentées dans le Tableau 5.

L'application de la HF-LPME en mode triphasique pour extraire les AMPA des échantillons d'urine a également été investigué. En dépit des pertes de performance en terme de facteurs d'enrichissement (jusqu'à 2.6 pour le cPenMPA) causé par l'effet de matrice, la méthode reste applicable avec des FE allant de 1.75 à 140 pour les 6 analytes ciblés. En effet, il semble que l'effet de matrice impacte négativement l'extraction des composés les moins polaires, comme le PMPA, le cPenMPA et l'iBMPA, tandis que pour les analytes polaires, aucun n'impact n'est observé comme c'est le cas pour l'EMPA (17.3 dans l'eau pure contre 16.2 dans l'urine) et le MPA (0.30 dans l'eau pure contre 1.75 dans l'urine).

Tableau 5 : Comparaison entre les valeurs de paramètres d'extraction en HF-LPME entre deux études menées pour l'analyse des AMPA dans l'eau pure et les valeurs FE obtenues pour les analytes ciblés en commun par les deux méthodes

| Paramètres | Desoubries <i>et al</i> (2012) [87] | Dubey <i>et al</i> (2009) [86] |
|--|--|--|
| V_d/V_a^* | 3 ml/ 6 μ l | 3 ml/ 6 μ l |
| pH _d (acide)/pH _a (base) | 1 (HCl) / 14 (NaOH) | 1 (HCl) / 14 (NaOH) |
| Sel | 30 % (m/v) NaCl | 10 % (m/v) NaCl |
| Solvant organique | 1 octanol | 1 octanol |
| Temps d'immersion ** | 5 s | 20 s |
| Vitesse d'agitation | 600 rpm | 900 rpm |
| Température | 42°C | Ambiante |
| Temps de l'extraction | 50 min | 60 min |
| FE (PMPA, iBMPA et iPrMPA) | 225 \pm 30, 188 \pm 10 et 41 \pm 4 | 85 \pm 8, 68 \pm 6 et 16 \pm 0.2 |
| Limites de la méthode (PMPA, iBMPA et iPrMPA) | LOQ *** : 0.013, 0.13 et 0.34 ng/ml | LOD **** 0.1, 2 et 2 ng/ml |

*: V_d : volume de la phase donneuse et V_a : volume de la phase acceptrice

** : Temps d'immersion du solvant organique dans la phase de la fibre creuse

*** et **** : limites de quantification (LOQ avec S/N= 10) et limite de détection (LOD avec un S/N=5)

Bien que la HF-LPME présente de nombreux avantages, cette méthode nécessite des durées d'extraction longues pour atteindre l'équilibre suite à au processus de diffusion à travers la SLM (mode passif). Une modification importante a été effectuée pour augmenter l'extraction mais tout en gardant le même dispositif, cette nouvelle approche, s'intitule l'extraction par électromembrane (EME) ou la HF-EME. Elle est basée sur l'électromigration des espèces en plus de la diffusion passive, ce qui lui permet d'être 5 à 15 fois plus rapide que la HF-LPME [197].

II.2.3.7. La microextraction liquide assistée par électromigration

La microextraction liquide assistée par électromigration (EME) est une autre stratégie de microextraction analytique basée sur le transfert de masse des analytes cibles dans leur état ionisé sous l'action d'un champ électrique. La Figure 28 illustre le principe de cette technique utilisant une fibre creuse comme support (HF) dont la force motrice est basée sur un potentiel électrique de courant continu (CC) appliqué entre deux compartiments aqueux séparés par une couche de solvant organique

non miscible à l'eau se trouvant dans les pores de la membrane de la fibre creuse. Cela permet de réduire le temps nécessaire au processus d'extraction à quelques minutes. Si la HF-EME peut être réalisée en mode biphasique, où la phase acceptrice est un solvant organique [198], les applications en mode triphasique restent les plus courantes. Elles touchent à plusieurs domaines visant l'extraction de nombreux analytes, tels que les ions (cations et anions inorganiques/organiques, cations de métaux lourds, colorants organiques, amines, acides aminés, peptides, hormones, les molécules de médicaments et leurs métabolites). Ces analytes ont été extraits de différents types de matrices biologiques (urine, plasma, sérum, sang total, salive, liquide céphalo-rachidien, lait maternel), d'échantillons environnementaux (pluie, neige, eaux de surface, usées et potables) et alimentaires (boissons gazeuses et alcoolisées, extraits de plantes et d'aliments, etc.) [199].

La HF-EME est semblable à la HF-LPME en terme de pouvoir d'enrichissement. Par ailleurs, la HF-EME permet aussi un excellent nettoyage de l'échantillon car les différents interférents qui composent la matrice (ions salins et protéines, ainsi que d'autres espèces interférentes de faible et de haut poids moléculaire) sont efficacement éliminés du transfert à travers la SLM [200].

De même, la SLM en EME est généralement formée sur une membrane en polypropylène. D'autres polymères peuvent être utilisés comme le PVDF ou le polytétrafluoroéthylène (PTFE). Cependant, les membranes en PTFE ne sont pas adaptées à l'imprégnation avec certains solvants standard utilisés dans l'EME [199].

Depuis son introduction en 2006 [201], près de 300 articles scientifiques en relation avec la HF-EME ont été publiés. Il s'agit d'un domaine de recherche actif avec environ 40 nouveaux articles par an (en augmentation) [176], ce qui démontre l'intérêt croissant pour cette technique.

Le principe de la méthode de la HF-EME est basé sur la fixation du pH des solutions de l'échantillon et de la phase acceptrice afin d'assurer une ionisation complète des analytes. Ce qui est généralement obtenu par acidification de l'échantillon dans le cas des composés basiques ou par alcalinisation de l'échantillon quand il s'agit de composés acides [202]. La cathode est alors introduite dans l'échantillon et l'anode dans la solution acceptrice dans le cas où le processus d'extraction cible les composés chargés négativement (composés acides) [203]. Pour les bases, l'emplacement des deux électrodes décrit précédemment doit être inversé [201]. Les analytes ionisés migrent de l'échantillon agité en direction de la SLM. Une fois que les composés cibles atteignent l'interface donneur/phase de la SLM, ils passent dans la phase organique en fonction de leurs coefficients de distribution et de l'action du potentiel électrique. Ensuite, ces composés migrent vers la phase acceptrice [199].

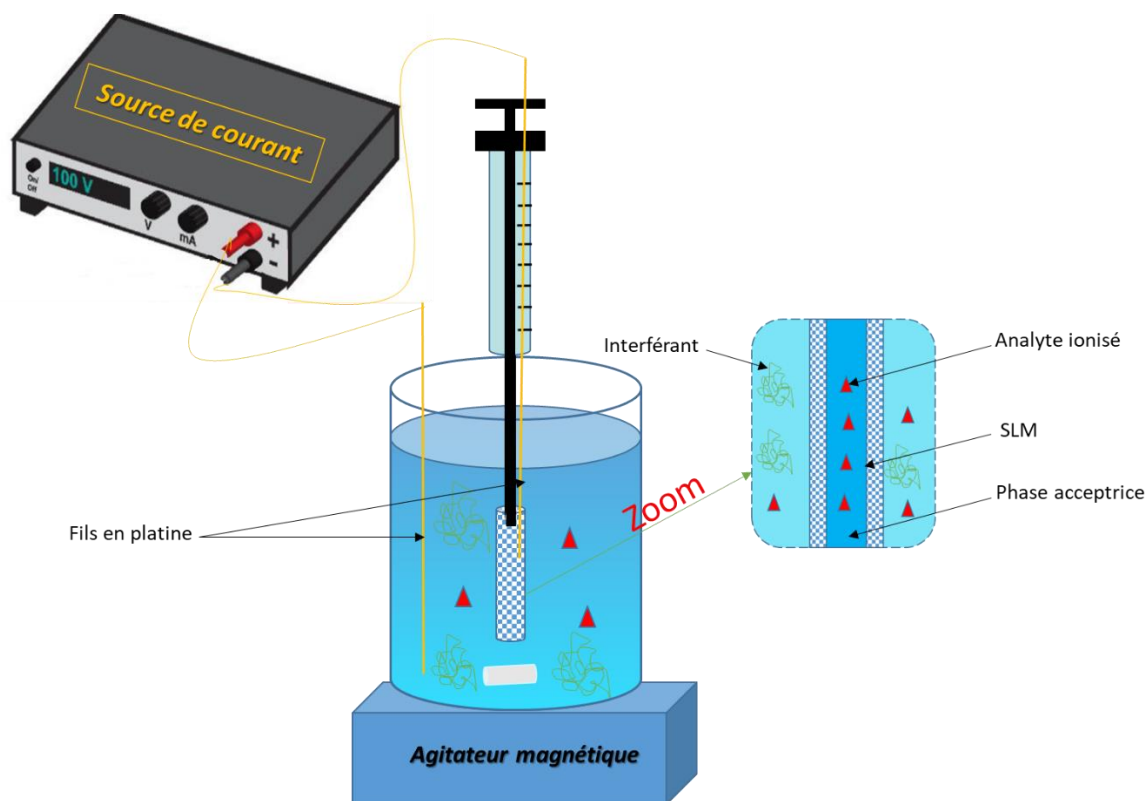


Figure 28 : Microextraction liquide assistée par fibre creuse en sa configuration instrumentale standard et le processus typique de la HF-EME, adapté de [202].

La HF-EME est une technique qui présente de nombreux avantages : (i) l'utilisation des fibres jetables qui permet d'éviter tout risque de contamination et assurer faibles coûts d'exploitation de la technique, (ii) la rapidité du processus d'extraction grâce à un transfert électrocinétique, les taux d'extraction élevés et la consommation très faible de solvants organiques et d'échantillons. Mais la sélectivité de l'extraction reste l'une des raisons principales qui motivent les analystes à utiliser de tels systèmes. En pratique, elle peut être contrôlée par la direction (contrôle du type de composés à extraire, soit les chargés positivement ou négativement) et l'amplitude du champ électrique (le type de composés à extraire). En parallèle, le choix de la SLM permet d'adapter le système d'extraction aux analytes polaires ou non-polaires. Par ailleurs, les conditions de pH dans l'échantillon et la solution acceptrice assure une meilleure maîtrise de la sélectivité [204].

L'EME a été utilisée dans le domaine de l'analyse des produits objet de vérification de la convention (CWC). Évidemment, les produits de dégradation d'agents neurotoxiques de guerre (AMPA) de par leur de nature acide, se prêtent très bien à la HF-EME. Un système d'EME a été utilisée pour l'extraction et la préconcentration des AMPA avant leur analyse par CE (CE-C⁴D) (détection par conductivité sans contact, *capacitively coupled contactless conductivity detection*) [205]. Lors de cette étude, les auteurs ont fait appel à un système de « poche » faite maison et facile à utiliser pour remplacer la fibre creuse qui présentait des difficultés techniques liées à l'insertion de l'électrode à

l'intérieur (opération très délicate au vu des dimensions de la fibre). Ainsi, la soudure de deux feuilles de polypropylène sur trois coté a permis d'obtenir un « petit sac » qui a servi de contenant pour la phase acceptrice d'un volume de 20 μ L. Ensuite, des fils de platine ont été introduits dans les deux phases opérationnelles et l'extraction a été effectuée en appliquant une différence de potentiel de 300 V. Les rendements d'extraction obtenus dans l'eau pure étaient très élevés malgré un temps d'extraction relativement court (30 min). Ils étaient de 52, 70, 85 et 98 % pour le MPA, EMPA, iPrMPA et le CMPA, respectivement, ce qui correspond à des FE allant de 104 à 197. Cependant, l'application de cette technique à des échantillons réels (eau de rivière), a conduit à une perte importante en termes de performance d'extraction (rendement d'extraction de seulement 2 à 3%). En effet, la présence d'acide humique dans l'eau environnementale à des concentrations inférieure ou égale à 20 mg/L semble réduire significativement les taux d'extraction des composés d'intérêt. Pour pallier cet important effet de matrice, une dilution de l'échantillon au 1/10^{ème} avec de l'eau pure a été réalisée en amont de l'extraction. Ce qui a permis d'obtenir des rendements d'extraction allant de 39.8 à 56.7 % ce qui correspondaient à des FE allant de 8 à 11.3.

Dans un autre travail [206], une fibre creuse en PP a été utilisée au lieu du dispositif décrit précédemment. Les différents paramètres de cette technique ont été optimisés et les différences entre les deux méthodes sont présentées sur le Tableau 6. Outre la différence de géométrie entre les deux dispositifs qui conduit à des rapports différents de volumes entre les phases opérationnelles (200 pour la EME « en poche » contre 500 en HF-EME), on remarque des différences importantes dans les paramètres optimisés, tel que la composition du solvant, la vitesse d'agitation, la différence de potentiel appliqué, le temps d'extraction mais aussi le pH de la phase acceptrice.

Pour tenter d'expliquer un tel résultat, les auteurs ont relié ces observations au changement de conductivité des solutions. Lors de l'ajustement du pH de la phase aqueuse, des ions supplémentaires doivent être introduits dans le système, ce qui entraîne un changement de la conductivité des solutions et donc, par conséquent, de la vitesse de migration de l'ion d'intérêt. Dans le cas de cette étude, l'efficacité d'extraction la plus élevée a été obtenue dans l'eau pure (avec la conductivité la plus faible). Cependant, en HF-EME, la comparaison entre l'ajout du KCl, NaOH et KOH à différents niveaux de concentration a permis de conclure que la solution acceptrice optimale est constituée de KOH (1M) soit un milieu accepteur de forte conductivité.

Tableau 6 : Comparaison entre les paramètres optimisés et les performances de la EME à travers une membrane en forme de poche et la HF-EME

| Etude | Xu <i>et al</i> , [205] | Desoubries <i>et al</i> , [206] |
|--|-----------------------------|---------------------------------|
| Paramètres | « Poche » en PP | Fibre creuse en PP |
| Vd/Va | 4 ml / 20 µL | 4 ml / 8 µL |
| pHd/pHa | pH neutre/ pH de l'eau pure | pH neutre/ 14 (1M KOH) |
| Solvant | 1-Octanol | 1-Octanol/tOABr (98/2) |
| Agitation | 800 rpm | Aucune |
| Différence de potentiel | 300 V | 100 V |
| Temps | 30 min | 20 min |
| FE des MPA et AMPA (eau pure) | 104-197 | 144-353 |
| Taux d'extractions des MPA et AMPA (eau pure) | 52-97 % | 29-71 % |
| FE des MPA et AMPA après dilution de 10 fois de l'eau de rivière | 8-11 | 7-21 |
| Taux d'extractions après dilution de 10 fois de l'eau de rivière | 3.9- 5.7 % | 1.4-4.2 % |

Si les résultats finaux obtenus font état d'une excellente performance en terme d'extraction dans l'eau pure, les deux techniques semblent être peu performantes en échantillons réels. Les travaux de Xu *et al*, [205] ont mentionnés l'existence d'autres interférents en plus des acides humiques dans l'eau de rivière qui impactent le processus d'extraction. Une grande variabilité des résultats est donc à craindre en fonction de la composition en minéraux et donc de la conductivité de chaque eau.

Les travaux de thèse de Desoubries [206] au niveau du laboratoire LSABM ont conclus que la HF-EME comparée à la HF-LPME est finalement intéressante uniquement dans le cas de l'extraction du MPA. Ce composé ne fait pas l'objet de cette étude, car il s'agit d'un analyte qui n'a aucune valeur criminalistique tel qu'évoqué dans le 1^{er} chapitre. De plus, les essais d'application de cette technique sur des échantillons d'urine ont montrés son inapplicabilité sur des matrices aussi chargées et ceci même en recourant à une dilution de l'urine au 10^{ème} par de l'eau pure avant extraction, avec des

facteurs d'enrichissement inférieurs à 1 pour presque tous les analytes et des coefficients de variation très importants, supérieurs à 100% pour certains analytes.

Au final, la HF-EME s'est avérée moins mature que les autres techniques LPME abordées dans les sections précédentes et la complexité du dispositif tout comme divers problèmes d'ordre pratique tel que la formation des bulles d'air, l'électrolyse et les modifications du pH des solutions opérationnelles induites par celle-ci lors du processus d'extraction limite son intérêt pour les composés visés [207].

D'une manière générale et au vu des éléments déjà présentés la HF-LPME est la méthode la plus adaptée pour le traitement des échantillons réels. Cependant, l'utilisation de cette méthode pour des analyses de routines présente certaines difficultés. En effet, malgré son application dans de nombreux domaines (plus de 80 articles par an sont publiés), elle n'a jamais réussi à sortir du cadre de la recherche académique. Son inventeur a compris la nécessité d'adapter sa technique pour permettre sa large utilisation aux niveaux des laboratoires d'analyse, de contrôle qualité, de criminalistique et autre. Cela implique de disposer d'une LPME automatisable pour permettre le traitement d'un nombre important d'échantillons. Ainsi, Stig Pedersen-Bjergaard en coopération avec la société VARIAN a proposé une première variante pour permettre un traitement d'échantillon en LPME à haut débit en ayant recours à la technologie des micro-plaques à 96 puits. Le système est présenté en Figure 29 mais ce projet a été abandonné pour des raisons des coûts élevés estimés de la production en série de cette technologie et de certains problèmes techniques liés à la géométrie du dispositif.

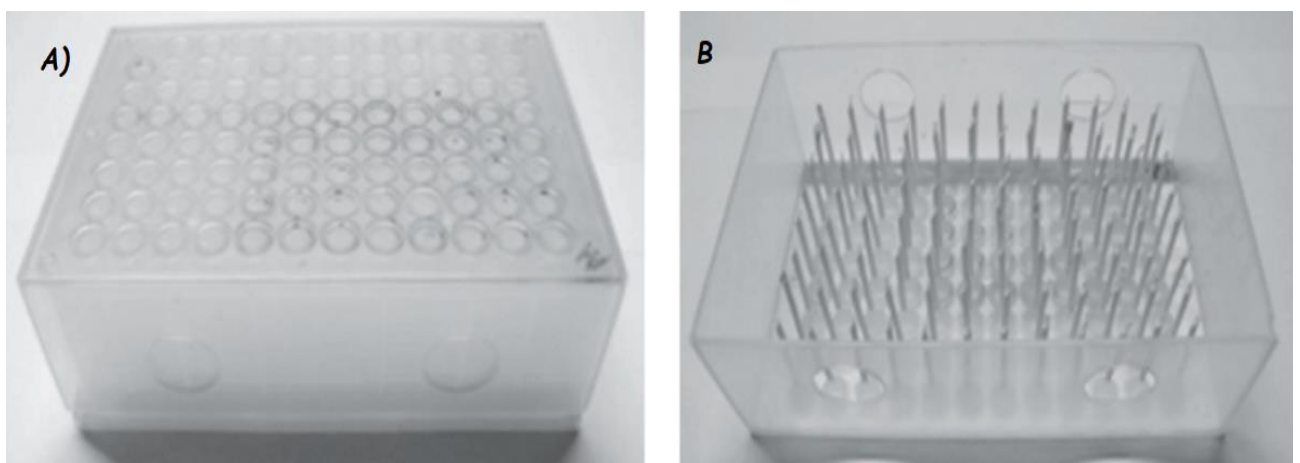


Figure 29 : photo d'un prototype de la HF-LPME en 96 puits proposé par Stig Pedersen-Bjergaard en coopération avec la société VARIAN constitué de : A) plaque acceptrice à 96 puits, B) Support pour 96 fibres creuses [208]

En voulant donner une "nouvelle chance" [208] à sa technique pour qu'elle puisse être commercialisée et automatisée et permettre un traitement de l'échantillon à haut débit, le groupe de Stig Pedersen-Bjergaard a fini par proposer une nouvelle approche de la HF-LPME en l'adaptant à des plaques 96 puits.

II.2.3.8. L'extraction liquide assistée par membrane parallèle artificielle (PALME)

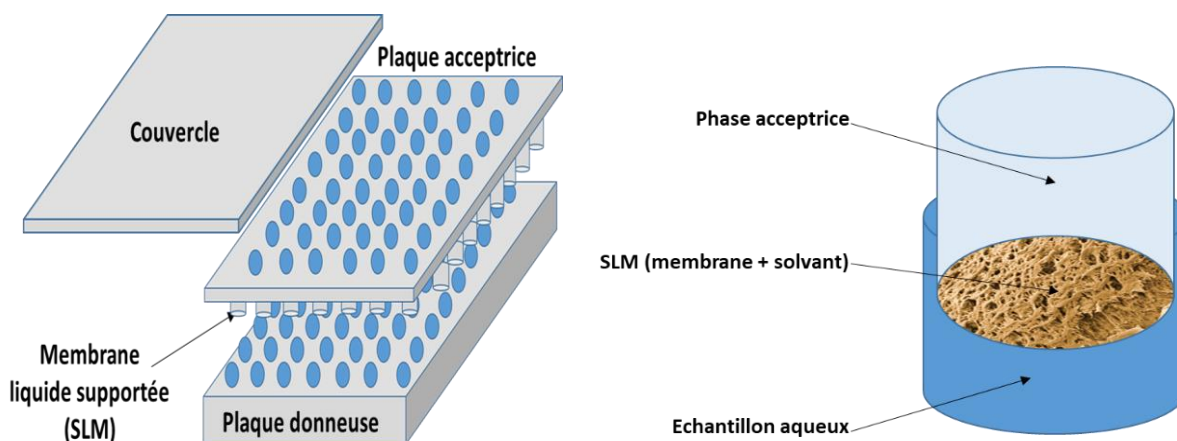
a) Présentation de la technique

En 2013, le groupe de Stig Pedersen-Bjergaard de l'université d'Oslo a donc développé une nouvelle technique de microextraction membranaire appelée « Parallel artificial liquid membrane extraction » ou « PALME », et qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet [190][209][210]. L'objectif des inventeurs était de standardiser et d'automatiser le processus de microextraction de la HF-LPME et de remplacer les autres techniques de traitement de l'échantillon qui peuvent se révéler laborieuses, gourmande en solvants organiques ou présentant des défauts en terme de rendement d'extraction et/ou de préconcentration des composés ciblés.

La PALME est une version miniaturisée de l'extraction liquide-liquide. Le principe de cette technique repose sur le même principe que la HF-LPME en mode triphasique mais avec une modification géométrique de la membrane. En effet, les membranes en fibres creuses de forme cylindrique sont remplacées par des membranes plates circulaires permettant l'interfaçage de deux microplaques 96 puits. Ainsi, le dispositif de la PALME est constitué d'une plaque donneuse et d'une plaque acceptrice dont l'assemblage constitue un « sandwich ». Le principe de base est illustré en Figure 30 [190]. Le dispositif de la PALME consiste donc en :

- une plaque à 96 puits donneuse qui contient les 96 échantillons à analyser
- une plaque à 96 puits acceptrice (plaque filtre) qui sert de support pour les membranes liquides supportées (SLM) et qui contient les solutions acceptrices ;
- un couvercle, en réalité constitué d'une feuille autocollante pour assurer l'étanchéité, qui permet d'éviter toute évaporation durant le processus d'extraction.

La procédure de la PALME consiste à pipeter Les échantillons dont le pH a été ajusté préalablement dans les puits de la plaque donneuse à 96-puits, puis à former la SLM et pipeter les solutions acceptrices dans la plaque acceptrice. A la fin de l'extraction, les phases acceptrices sont récupérées pour analyse. Cette procédure détaillée est donnée en annexe 2.



(A) Schéma représentant le dispositif d'extraction par membrane liquide artificielle parallèle

(B) Vue d'ensemble schématique d'un puit d'extraction.

Figure 30 : Technique d'extraction par membrane liquide artificielle parallèle.

Jusqu'à présent, le dispositif de la PALME n'est pas encore commercialisé. Cependant sa description dans la littérature peut permettre sa mise en place au laboratoire après adaptation avec des plaques 96 puits disponibles dans le commerce.

Si le dispositif expérimental de la PALME est différent de celui de la HF-LPME, son principe de transfert des analytes reste identique à celui de la HF-LPME en mode triphasique. Il s'agit d'un mode passif basé sur un gradient de pH entre les phases donneuse et acceptrice. En effet, si on cible à titre d'exemple des analytes de nature acide, tel que présenté en Figure 31, ces derniers migrent vers le SLM en tant qu'espèces neutres, grâce à l'acidification de l'échantillon à un pH inférieur aux pKa des analytes ciblés, et atteignent rapidement l'interface SLM/phase acceptrice. Ensuite, leur passage dans la solution acceptrice est obtenu grâce au pH basique de la phase acceptrice qui maintient les analytes sous leur forme ionisée, et empêche ainsi leur rétro-extraction vers la SLM (transfert monodirectionnel). Les analytes sont donc « piégés » dans la phase acceptrice au fur et à mesure de l'extraction, garantissant ainsi un enrichissement progressif du milieu accepteur. Ce milieu constitue « l'extrait » qui est alors analysé.

Les composés basiques potentiellement interférents présents dans l'échantillon, chargés positivement à pH acide, ne pourront pas passer dans la SLM. Quant aux composés neutres, ils passent dans le SLM mais ils ne seront pas libérés de manière significative dans la phase acceptrice alcaline et ils pourraient être rétro-extraire dans la phase donneuse (l'échantillon) conduisant à un partage de ces molécules entre les deux phases aqueuses [190].

Les principes de transfert décrits ci-dessus peuvent être facilement transposés pour réaliser la PALME pour des analytes basiques en inversant le gradient du pH (pH basique dans la phase donneuse et H acide dans la phase acceptrice) [190].

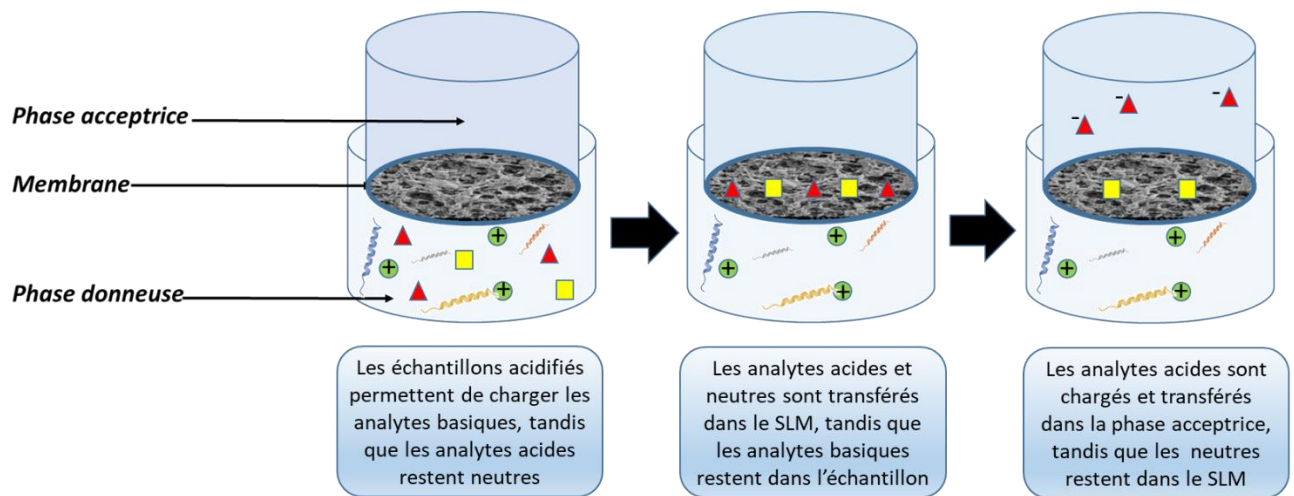


Figure 31: Processus d'extraction des analytes acides par la PALME, adapté de [211].

b) Les paramètres clefs de l'extraction en PALME

➤ Choix du solvant organique

La sélection du solvant organique à immobiliser dans les pores de la membrane pour former la SLM est l'une des étapes les plus critiques en PALME. En effet, pour atteindre une efficacité d'extraction optimale, il est recommandé d'opter pour un solvant ayant une grande affinité pour cet analyte cible. De plus, le solvant doit être suffisamment hydrophobe pour présenter une très faible solubilité dans l'eau et ainsi limiter sa diffusion dans les deux phases aqueuses (donneuse et acceptrice). Cette hydrophobie relative du solvant et favorise sa rétention forte dans les pores de la membrane constitué d'un polymère hydrophobe. De plus, il doit être relativement non volatil pour éviter toute évaporation durant le processus d'extraction et posséder la plus grande affinité possible pour les analytes cibles.

En PALME, de nombreux solvants ont été testés et utilisés mais deux solvants organiques semblent s'imposer : le dihexyl ether [190][209][210][212][213] et l'acétate de dodécyle [213][214][215][216]. Ces deux solvants ont l'avantage d'être très stables. En effet, l'acétate de dodécyle est connue pour être stable pendant des longues périodes, tandis que le dihexyl ether reste stable pendant quelques heures, mais il est susceptible de faire gonfler la membrane (le polymère) et de s'évaporer [210].

L'utilisation d'un seul solvant organique au lieu d'un mélange de plusieurs solvants et d'additifs est fortement recommandée pour assurer la plus grande simplicité du protocole ou respecter les principes de la chimie verte (si l'additif est toxique). Cependant, et lors de la seule étude qui évoque l'extraction de produits polaires basiques par PALME, le recours à un agent d'appariement d'ions, le 2-di(ethylhexyl) phosphate (DEHP) s'est avéré indispensable pour assurer le transfert des analytes à travers le solvant organique dans lequel ils sont peu solubles compte tenu de leur polarité élevée [217]. D'autres études ont signalé que l'ajout de trioctylamine à 1 % (TOA) dans le solvant organique comme additif permet d'éviter des interactions entre les analytes et la membrane PVDF [213][214][215].

➤ **Choix de la membrane**

La membrane en polymère joue un double rôle : elle constitue le support du solvant d'extraction et minimise les interférences potentielles lors du processus PALME. Elle doit donc être inerte et compatible avec le solvant d'extraction. Cependant seules des plaques filtrantes avec une membrane en PVDF sont disponibles dans le commerce. De nombreuses études ont été menées en remplaçant manuellement cette membrane par une membrane en PP pour éviter le problème d'interactions entre les analytes et la membrane de PVDF. Cependant aucune comparaison entre ces membranes n'a été faite [190][217][212][216]. Outre la nature, d'autres caractéristiques de la membrane telles que la taille des pores, l'épaisseur de la paroi, le diamètre interne et la porosité peuvent affecter les performances d'extraction. Ceci a été déjà évoqué dans des travaux visant à comprendre les mécanismes de transferts des analytes à travers le SLM en HF-LPME [186][218][219][220]. En effet, une comparaison de trois types de fibres en PP et PVDF de différentes dimensions a montré que la fibre creuse en PVDF était plus adaptée à l'extraction du flunitrazépam dans des échantillons de plasma et d'urine que celle en PP de mêmes dimensions. De plus, il a été démontré qu'à temps d'extraction constant, la réduction de l'épaisseur de la paroi des fibres améliore l'efficacité de l'extraction [186]. Une autre étude a indiqué que des pores de petite taille pour la fibre creuse pouvait influencer la vitesse de transfert de masse des analytes, et entraîner une plus faible efficacité d'extraction et nécessiter un temps plus long pour atteindre l'équilibre [218]. Par ailleurs, la combinaison finale entre le solvant organique et le matériel utilisée pour la membrane permet d'assurer une meilleure optimisation du processus d'extraction. En effet, la combinaison du matériau PVDF et du 1-octanol a révélé être meilleure en terme d'efficacité d'extraction pour les pesticides organochlorés par rapport au PP utilisé en combinaison avec divers solvants organiques [187].

➤ Ajustement de pH

Le processus d'extraction dépend du pH quand les analytes cibles sont de nature acide ou basique. En effet, il faut fixer un pH pour avoir les analytes cible dans leur état moléculaire (non-ionisés) dans la phase donneuse, et ainsi faciliter leur transfert à travers la SLM puis vers la phase acceptrice aqueuse. Cette dernière, à l'inverse doit être à un pH assurant l'ionisation des composés cibles pour empêcher leur réextraction dans le solvant organique et permettre leur concentration dans la phase acceptrice.

De plus, il a été démontré que l'efficacité du transfert de masse est très influencée par les pH des deux phases aqueuses [221]. En effet, pour permettre un piégeage presque complet des analytes, le pH de la solution acceptrice doit être à au moins 3,3 unités du pKa de l'analyte d'intérêt (au-dessus pour les composés acides et en dessous pour les composés basiques), le pH de la phase acceptrice doit être inférieur de 3,3 unités au pKa de l'analyte. Et dans les cas où on vise l'extraction de plusieurs composés similaires avec des valeurs de pKa différentes, l'analyte avec la valeur de pKa la plus élevée détermine le pH de la solution acceptrice pour les composés acides et pour ce qui est des analytes basiques, c'est la valeur du pKa la plus basse qui est à considérer [222].

Afin d'ajuster les pH en PALME, plusieurs acides et bases ont été utilisés tel que l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide formique (HCOOH), l'acide trifluoro-acétique (TFA), l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou l'ammoniaque (NH₄OH). Il a été aussi signalé qu'un processus d'extraction par gradient de pH peut être impacté par la co-extraction de composants de matrice dans la phase acceptrice modifiant ainsi son pH et conduisant à des faibles extractions. Ainsi, il a été recommandé d'utiliser une capacité de tampon assez élevée pour compenser ce changement potentiel de pH [223].

➤ Agitation

Comme pour toute méthode basée sur l'équilibre de partage, la vitesse d'agitation est un paramètre clé pour améliorer la cinétique d'extraction. En effet, une agitation mécanique est nécessaire pour réduire les temps d'extraction en ajoutant un transport par convection à la diffusion pure des analytes cibles. Cependant, ce paramètre doit être considéré avec attention car une vitesse d'agitation élevée peut générer des bulles d'air sur toute la surface de la membrane, conduisant ainsi à l'évaporation du solvant organique et limitant la surface de contact entre la solution de l'échantillon et la SLM.

Contrairement à sa technique parente (HF-LPME) où l'agitation n'affecte que la phase donneuse grâce à une agitation magnétique, le système d'agitation (plaque vibrante) en PALME permet l'agitation des deux phases aqueuses donneuse et acceptrice

De plus, le système d'agitation en PALME est presque standardisé, une seule valeur de vitesse d'agitation exprimée en rotation par minute (900 rpm) a été optimisée lors du premier travail sur la PALME [190]. Cette valeur a été reprise ensuite dans tous les travaux utilisant la PALME.

➤ **Durée de l'extraction**

Pour cette méthode basée sur un partage entre les différentes phases liquides, le temps d'extraction optimal est directement lié au temps d'équilibre. En effet, cela peut prendre de quelques minutes [190] à quelques heures [214]. Cependant, il n'est pas toujours possible d'exposer les membranes liquides de la plaque acceptrice aux échantillons pour des longues périodes par crainte des fuites de solvant organique par solubilisation progressive ou par évaporation. De plus, pour que la méthode de traitement de l'échantillon soit performante et utilisable en routine dans les laboratoires il faut impérativement qu'elle soit relativement rapide.

En PALME, les temps d'extractions varient donc entre 30 et 120 minutes en fonction de la nature des analytes à extraire. L'équipe de Pedersen-Bjergaard a opté pour 30 minutes d'extraction pour 4 médicaments, à savoir : la péthidine, la méthadone, l'halopéridol et la nortriptyline. Sachant que seulement 15 minutes auraient été suffisantes pour l'extraction exhaustive des trois premiers composés, et que c'est seulement à cause de la nortriptyline qui nécessitait un temps d'équilibre plus long que le temps d'extraction a été ajusté à 30 min.

c) Avantages de la PALME :

La PALME a été présentée comme étant une technique disposant de plusieurs avantages comme : (a) la facilité de mise en œuvre du protocole de la PALME (voir annexe 2) ; (b) la possibilité de son automatisation pour permettre le traitement d'un grand nombre d'échantillons de manière répétable et reproductible ; (c) la facilité de son implantation en routine dans les laboratoires grâce à des robots dédiés ; (d) une consommation raisonnable de solvants organiques comparée à la LLE traditionnelle faisant d'elle une méthode respectant les principes de la chimie verte ; (e) la capacité de traiter des petits volumes d'échantillons comparée à la LLE traditionnelle ; (f) en dépit des faibles FE obtenus avec la PALME comparée à la HF-LPME, (g) la PALME offre des taux d'extractions importants grâce à son rapport des volumes assez faible comparé à la HF-LPME ; (h) un nettoyage efficace des échantillons notamment biologiques grâce au système SLM. En effet, les macromolécules (comme les

protéines ou les phospholipides) ne peuvent pas traverser les pores de la membrane en polymère à cause de leur taille [217]. De plus, le solvant en SLM et le gradient de pH font en sorte que seule une catégorie bien ciblée de molécules (acide ou basiques) puissent passer à travers la SLM jusqu'à la phase acceptrice. Ceci permet d'avoir des extraits relativement propres et compatibles avec une analyse LC-MS qui est sensible aux effets de matrice et qui peuvent conduire à de la suppression d'ions, ou à l'inverse, à une augmentation du signal lors de n'analyse d'échantillons biologiques. Le pouvoir d'élimination des phospholipides de la PALME a été comparé et trouvé supérieur à celui de la HybridSPE qui est une phase d'oxyde de zirconium interagissant fortement avec les groupement phosphate des [216]. Cet effet de purification est également supérieur à celui d'une étape de précipitation des protéines comme l'illustre la Figure 32 en comparant les chromatogrammes alors obtenus [217].

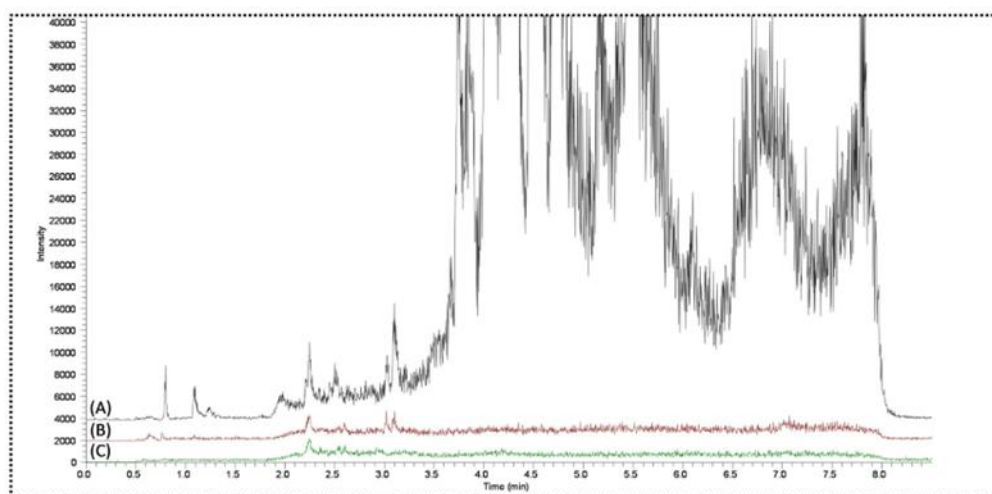


Figure 32 : Chromatogrammes illustrant l'élimination des phospholipides par PALME : (A) Chromatogramme obtenu après précipitation des protéines, (B) Chromatogramme obtenu après traitement de l'échantillon par PALME (C) Chromatogramme obtenu après injection d'un blanc de phase mobile [217].

Tous les travaux effectués par PALME ont été récemment revus par Gjelstad *et al*, [224]. Ils sont tous issues de son équipe. Cette dernière a mis l'accent sur l'importance de la technique en la comparant à plusieurs autres techniques de traitement de l'échantillon déjà évoqués dans ce manuscrit et couramment utilisé dans la littérature tel que présenté dans le tableau 7 [224]. En effet, la PALME est considérée comme une technique bon marché comparée à la SPE ou la SLE. Par ailleurs, la PALME offre des extraits compatibles à une analyse LC-MS à l'inverse de certains techniques comme la LLE qui nécessite des étapes d'évaporation et de reconstitution de l'échantillon. De plus, la technologie 96-puits adaptée à la PALME et son potentiel d'automatisation devrait conduire à une technique de traitement de l'échantillon à haut débit et ce, contrairement à sa technique parente, la

HF-LPME. D'autre part, le PALME conduit à des FE moyens, plus faible qu'en HF-LPME, mais pour des temps de traitement par échantillons fortement réduits.

Tableau 7 : Comparaison entre la PALME avec les méthodes courantes de traitement de l'échantillon, adapté de [224].

| | LLE | SLE* | SPE | HF-LPME | PALME |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------|
| Equipement commercial | Non | Oui | Oui | Non | Oui** |
| Coûts par échantillon | <1€ | >1€ | >1€ | <1€ | <1€ |
| LC-MS Compatibilité | Evaporation et reconstitution | Evaporation et reconstitution | Compatible | Compatible | Compatible |
| Automatisation | Faible potentiel | disponible | disponible | Potentiel moyen | Potentiel très élevé |
| Technologie 96-puits | Non | Oui | Oui | Non | Oui |
| Consommation de solvant par échantillon | >250 µl | >250 µl | >250 µl | <25 µl | <25 µl |
| Facteurs d'enrichissement | >10 | 2-10 | >10 | >10 | 2-7 |
| Temps d'extraction par échantillon | >15 min | <5 min | <5 min | >15 min | <5 min |

*SLE: Supported Liquid Extraction;

** Existence des plaques dans le commerce dédié à des tests parallèles de perméabilité de la membrane artificielle (PAMPA) dont l'objectif est de cribler des composés de médicaments vis-à-vis leur potentiel d'absorption orale (outil de prédiction de la perméabilité aux médicaments in vivo bien adaptés comme outil de classement pour l'évaluation de ces composés par rapport à des mécanismes de transport passifs).

La revue bibliographique sur les méthodes PALME existantes dans la littérature tel que présenté sur le Tableau 8 fait état de publication de 7 articles par le même groupe inventeur de cette technique. Elle a été uniquement appliquée sur des matrices biologiques de sang et de plasma. Le dispositif PALME utilisé offrait un FE maximum de 5.

Tous les articles présentés jusqu'au là évoquent l'application de cette technique pour l'extraction de produits non polaires à l'exception d'un seul travail où des produits basiques polaires ont été extraits avec une SLM contenant un agent de paires d'ions. L'ajout de ce dernier était nécessaire pour faciliter le transfert de ce type de composés dont le $\log P < 1.4$.

Tableau 8 : Synthèse de tous les travaux portant sur la technique PALME

| Nature des analytes | Analytes | Log P | pKa | Solution donneuse | Solution acceptrice | Vitesse d'agitation | Solvant | Temps | Type de membrane | R % | Outil d'analyse | Ref |
|--|--|---------|--------|--|------------------------|---------------------|--|---------|------------------|--|-----------------|-------------------------|
| Composés de médicament de nature basique non-polaire | Pethidine, Nortriptyline, Méthadone, Haloperidol | 2.7-4.5 | 8.6-10 | 200 µl d'eau pure ou de plasma + 200 µl de NaOH (20 mM) | 50 µL de HCOOH (20 mM) | 900 rpm | 2 µl de dihexyl ether | 30 min | PP | 55-89% en eau pure 34-74% en plasma | LC-MS/MS | [190] [209] [210] |
| Composés de psychotropes de nature basique non-polaire | Venlafaxine, O-desmethyl-venlafaxine, Citalopram, Norfluoxetine, Fluvoxamine, Fluoxetine, Sertraline, Paroxetine | >2.3 | >8.9 | 125 µl de plasma + 10 µl SI + 115 µl de NaOH (40 mM) | 50 µL de HCOOH (20 mM) | 900 rpm | 5 µl d'acétate de dodécyle +1% de TOA (m/m) | 120 min | PVDF | 72-111% | UHPLC-MS/MS | [214] |
| Nouveaux psychotropes de nature basique non-polaire | MDAI, Methylone, PFA, mCPP, 6-APB, Pentedrone, Methoxetamine, MDPV, Ethylphenidate, 2C-E, Bromo-dragonfly, AH-7921 | 1.1-4 | / | 125 µl de plasma + 115 µl de NaOH (40 mM) + 10 µl de SI 100 µl de sang entier + 50 µl d'eau ultra pure + 75 µl NaOH (80 mM) + | 50 µl de HCOOH (20 mM) | 900 rpm | 5 µl d'acétate de dodécyle + 1% de TOA (m/m) | 120 min | PVDF | 25-117% en plasma 11-86% en sang | UHPLC-MS/MS | [215] |

| | | | | | | | | | | | | |
|--|--|------------|----------|--|--|---------|--|---|------|--|-------------|-------|
| | | | | 25 µl de SI. | | | | | | | | |
| Composés de médicament de nature basique polaire | Hydralazine, Ephedrine, Metaraminol, Salbutamol, Cimetidine | -0.3 à 1.4 | 6.4-10.3 | 250 µl d'eau pure ou de plasma + tampon phosphate (50 mM) (1:2, v/v) | 50 µl de TFA (150 mM) | 900 rpm | 2.5 µl de 2-nonanone contenant 15% DEHP (m/m) | 30 min pour l'eau pure et 45 min pour le plasma | PP | 18-93% en eau pure 50-89% en plasma | LC-MS | [217] |
| Composés de médicament de nature acides non polaires | Ketoprofen, Fenoprofen, Diclofenac, Flurbiprofen, Ibuprofen, Gemfibrozil | 3.6-4.4 | 3.9-4.8 | 250 µl de HCl (10 mM) 125 µl de plasma + 125 µl de HCl | 50 µl de NH ₄ OH (25 mM) | 900 rpm | 2 µl de dihexyl ether | 60 min | PP | 80-100% | HPLC-UV | [212] |
| Composés de médicament de nature non polaires (acides et basiques) | Fluoxétine, Fluvoxamine, Quetiapine, Fluoxétine-d5 | 2.9-4.2 | 7-10 | 125 µl de plasma + 125 µl de NaOH (40 mM) ou HCl (250 mM) selon le type d'analytes + 10 µl de SI | 50 µl de HCOOH (20 mM) ou de NH ₄ OH (25 mM) selon le type d'analytes | 900 rpm | 4 µl acétate de dodécyle ou hexadécane 4 µl de 2,2-diméthyl-1-propyl benzène ou l'isopentyl benzène | 120 min | PP | 91-97% | LC-MS/MS | [216] |
| Composés basiques et acides, non polaires | Amitriptyline, Quetiapine, Ketoprofen, Fenoprofen, Flurbiprofen, Ibuprofen | 2.8-4.9 | 4-9.4 | Tâches de sang sèches (DBS) + 250 µl de NaOH (10 mM) ou de | 50 µl de HCOOH (20 mM) Ou 50 µl de NH ₄ OH (25 mM) | 900 rpm | 4 µl d'acétate de dodécyle + 1% de TOA (m/m) ou de dihexyl ether | 60 min | PVDF | 63-85% | UHPLC-MS/MS | [213] |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|--------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | 250 µl de HCOOH (20 mM) selon le type d'analytes | selon le type d'analytes | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|--------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|

R% : rendement d'extraction

SI : standard interne

PP : Polypropylène poreux 100 µm (Accurel PP IE R P Membrane)

PVDF : Polyvinylidene fluoride 0.45 µm

FE : Facteur d'enrichissement

TOA : Trioctylamine (son utilisation permet de substituer la membrane de PP par une membrane PVDF)

DEHP : 2-di(ethylhexyl) phosphate (son utilisation permet un transfert des analytes sous forme de paires d'ions)

TFA : Acide trifluoro acétique (utilisé au lieu du HCOOH, car il permet une meilleure libération des analytes sous leur forme de paires d'ions au SLM)

N.B : Certaines données liées au log P et pKa qui ne sont pas fournies par les auteurs ont été prises du site web <https://www.drugbank.ca>

II.2.3.9. La microextraction liquide par électromigration assistée par membrane parallèle artificielle (Pa-EME) :

De la même façon que la HF-EME a été inspirée de la HF-LPME, une technique de microextraction liquide par électromigration assistée par membrane parallèle artificielle (Parallel électromembrane extraction, Pa-EME) développée par le même groupe de Pedersen-Bjergaard [201] a été inspirée de la PALME. Elle est illustrée en Figure 33. Cette technique a été introduite en 2014 pour l'extraction d'espèces chargées à partir de milieux aqueux [225].

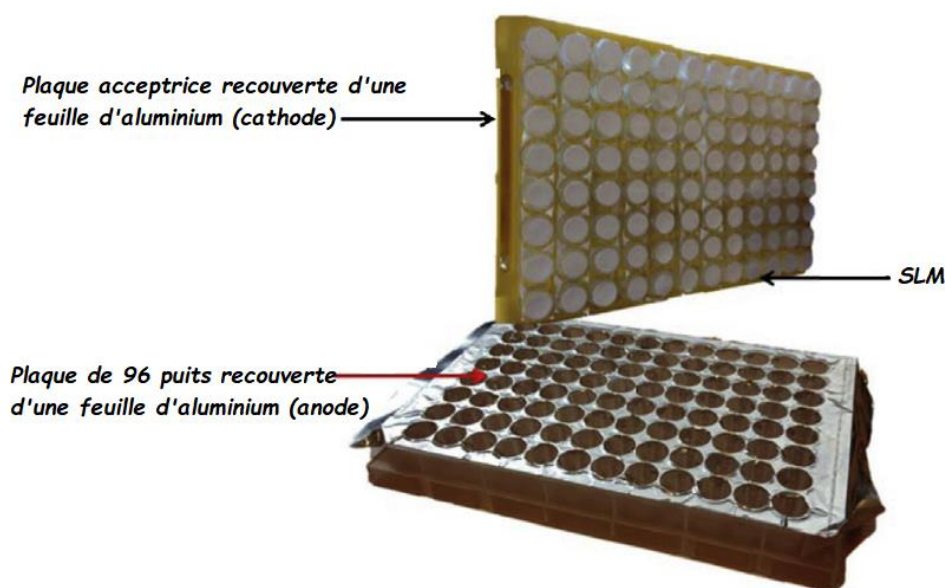


Figure 33 : Principe de transfert des analytes en Pa-EME a) anions et b) cations, adapté de [226].

Principalement et sous l'influence du champ électrique, les analytes chargés dans l'échantillon migrent vers l'électrode de charge opposée située dans le compartiment accepteur, à travers une membrane liquide artificielle (SLM) et finalement ils sont piégés dans la phase acceptrice en raison de leur état d'ionisation et de la direction du champ électrique. Comme le montre la Figure 34-a, pour la Pa-EME de composés anioniques, l'anode doit être placée à l'intérieur de la phase acceptrice ; tandis que à l'inverse, pour le Pa-EME des composés cationiques, la cathode doit être placée à l'intérieur de la phase acceptrice (Figure 34-b). Comme en HF-EME, le transfert de masse est relativement rapide en raison de l'introduction du champ électrique, et l'effet de purification des échantillons est obtenu grâce à la fois à la nature discriminante de la membrane et du champ électrique. Le Pa-EME est une technique sélective, simple, rapide et « verte » compte tenu de la faible quantité de solvant utilisée (uniquement pour imbiber la membrane).

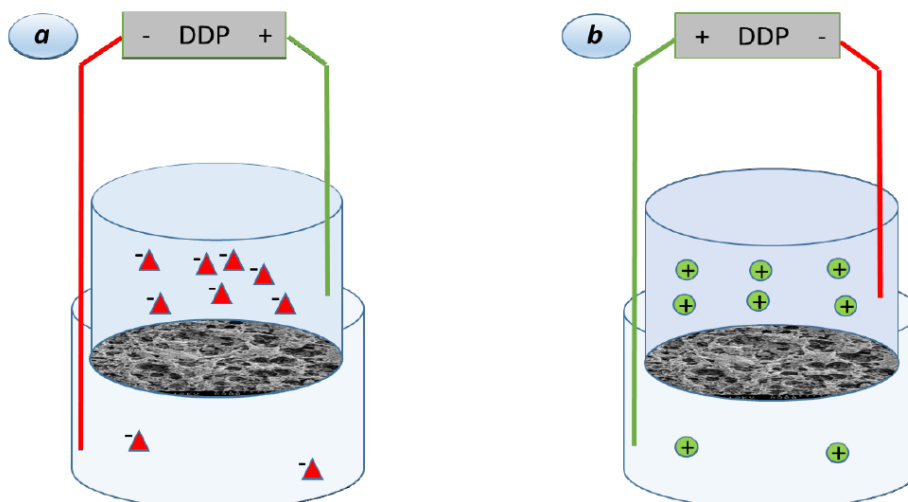


Figure 34 : Principe de transfert des analytes en Pa-EME a) anions et b) cations

L'introduction de la Pa-EME a permis de pallier certains inconvénients de la HF-EME, tels que l'effet d'électrolyse dû au faible volume du compartiment accepteur (environ 10 à 20 μL) et la génération de bulles d'air dans à l'intérieur de la fibre creuse en raison de son petit diamètre. De plus, cette technique permet d'éviter la manipulation des fibres creuses qui s'avère souvent fastidieuse pour le remplissage et l'insertion de l'électrode qui nécessite ainsi de la précision et de la pratique pour être effectué de façon répétable [227].

En dépit de ces avantages, la technique reste peu exploitée à cause de la difficulté à construire le dispositif Pa-EME. De plus, l'agitation de ces systèmes posent des problèmes en raison de la faible jonction entre les plaques acceptrice et donneuses [226][225]. Dans une étude récente, un nouveau dispositif Pa-EME a été produit sur la base d'une production d'une plaque à 96 puits conductrice réutilisable au niveau du laboratoire [227]. Cependant, on est encore loin de la commercialisation de la technique. En plus de ces limitations, et tel qu'évoqué auparavant, il y'a une grande analogie entre la HF-LPME et la PALME et de même pour la HF-EME et la Pa-EME. Ainsi, et lors de cette thèse, on a jugé prometteur de tester la PALME pour l'extraction des AMPA, puisque des systèmes HF-LPME [86] [87] ont déjà prouvés leurs efficacités contrairement à l'application de la HF-EME qui n'a pas été jugée performante pour l'extraction de ce type d'analytes [206].

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

**Développement d'une méthode de microextraction
liquide-liquide assistée par membrane et parallélisée
de produits de dégradation d'armes chimiques dans
des matrices environnementales**

La revue bibliographique sur les méthodes d'extraction et de quantification des AMPA présentée dans le chapitre précédent a permis de mettre en évidence que la microextraction assistée par fibre creuse (HF-LPME) est une technique puissante pour leur extraction des matrices environnementales [87]. Cependant, cette dernière souffre de la non disponibilité d'un équipement commercial standardisé. L'équipement utilisé pour appliquer cette technique est en effet un dispositif préparé au laboratoire, qui ne permet son application qu'à un seul échantillon à la fois et sa manipulation peut se révéler délicate au vu des dimensions de la fibre. Celle-ci nécessite donc un certain savoir-faire et de l'entraînement. Le nombre croissant d'échantillons que les laboratoires d'analyse et de contrôle doivent traiter en parallèle quotidiennement constitue une problématique d'actualité. Pour pallier ces lacunes, l'inventeur de la HF-LPME a voulu faire évoluer cette méthode principalement utilisée dans la recherche académique pour qu'elle puisse intégrer les laboratoires de routine pour de nombreuses applications [208]. Il a donc proposé un équipement standard, facile à utiliser et surtout automatisable permettant le traitement d'échantillon à haut débit, la microextraction liquide-liquide assistée par membrane et parallélisée (PALME) [190].

Lors de ce cette thèse, l'objectif était de développer des méthodes de traitement de l'échantillon à haut débit adaptés aux AMPA et répondant aux principes fondamentaux de la chimie verte, facile à mettre en œuvre et qui permettent le traitement de centaines d'échantillons par jour de manière fiable et reproductible. Afin de s'implanter largement dans les laboratoires d'analyses de routine, cette méthode devait également être une alternative pratique et peu onéreuse par rapport à d'autres méthodes plus complexes. Au vu de ses avantages décrits de façon détaillée dans la partie précédente, la PALME a été choisie comme technique de traitement de l'échantillon. Par ailleurs, cette étude constituera aussi l'occasion de vérifier la facilité de l'implantation de cette méthode dans un laboratoire qui ne l'avait jamais utilisé auparavant [228].

Cette méthode n'avait, jusqu'à présent, été appliquée que quasi exclusivement pour l'extraction de composés apolaires basiques et/ou acides [224]. En effet, de par son principe, la LPME, de manière générale, est fortement recommandée pour l'extraction de composés apolaires ou légèrement polaires ($\log P > 1.5-2$) [229][228]. Il existe un seul travail qui évoque l'application de la PALME pour l'extraction de composés polaires basiques [217]. D'ailleurs, pour pouvoir l'appliquer sur cette classe de produits, les auteurs ont dû faire appel à un agent porteur « 2-di(éthylhexyl) phosphate (DEHP) ». Ainsi, l'application de cette technique de traitement de l'échantillon sur les AMPAs, composé hautement polaire et acides ($\log P$ compris entre -0.8 et 0.8 et pK_a compris entre 1.96 et 2.06) constitue, en soi, un défi analytique. Par ailleurs, l'ensemble des travaux de recherche présentés dans la littérature ont été effectués sur des matrices biologiques. Et donc, il est apparu intéressant d'évaluer

son potentiel sur les matrices environnementales. L'eau et le sol sont en effet des matrices environnementales qui peuvent être contaminées par la propagation délibérée ou non d'agents chimiques de guerre. L'analyse des AMPA dans ces matrices fait souvent l'objet de tests de compétence proposés par l'OIAC [30], car elles se sont d'ores et déjà révélées d'une importance cruciale pour confirmer l'utilisation d'agents de guerre chimique lors de conflits [230],[231].

Afin de commencer les expériences d'optimisation de la PALME, il a fallu d'abord disposer d'une méthode LC-MS fiable pour la quantification des AMPAs.

III.1. Essais préliminaires de mise au point d'une méthode de quantification des composés ciblés par LC-MS/MS

Afin de disposer d'un outil adapté pour évaluer les performances de la méthode de traitement de l'échantillon envisagée, une méthode d'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC/ESI/Q-TOF) a été initialement développée. Le PMPA ($\log P = 0.8$), a été choisis comme composé modèle pour l'optimisation initiale de la PALME. Son choix a été motivé par sa disponibilité dans le commerce contrairement au CMPA, iBMPA et l'iPrMPA qui sont synthétisés et fournis par la Direction Générale d'Armement française (DGA) et par sa bonne réponse en spectrométrie de masse comparée à l'EMPA (disponible aussi dans le commerce).

Afin de mettre au point une telle méthode, une optimisation des conditions d'ionisation, de transfert des ions, de fragmentation et de détection par spectrométrie de masse du PMPA dans l'eau pure a été réalisée grâce à l'infusion directe dans le spectromètre de masse d'une solution étalon. La détection a ensuite été effectuée en mode MRM en suivant la transition (123.0→95.0). En parallèle, sur la base des travaux de thèse de C. Desoubries [206], une colonne à base de carbone graphite poreux (PGC), Hypercarb™ (150 x 2.1 mm, 5 μm, ThermoScientific), a été choisie. En effet, cette phase stationnaire est particulièrement adaptée à la rétention des composés très polaires et supporte l'injection d'échantillons à un pH fortement basique que nous risquons de devoir analyser en PALME si on s'inspire des conditions résultant des analyses en HF-LPME. En effet, les extraits obtenus à la fin de l'extraction devraient avoir un pH avoisinant 13 ou 14 [87],[86]. Cependant, lors de sa mise en œuvre, cette colonne a montré ses limites lors d'injections successives d'échantillons de pH 14, les temps de rétention diminuant progressivement au cours d'injections successives et le signal en masse perdant en intensité.

Suite à ces observations, la phase de PGC a été abandonnée au profit d'une phase stationnaire plus conventionnelle de silice greffée C18 qui a été retenue parce qu'elle permettait une bonne

séparation des analytes ciblés. Il s'agit de la colonne Atlantis dC18 (150 x 2.1 mm, 5 µm, waters). Cependant les extraits issus de la PALME obtenus ultérieurement devront être neutralisés avant injection car la phase stationnaire C18 ne supporte pas les conditions très alcalines. Bien qu'une méthode de séparation des AMPA peut être développée sur une phase en PGC, on a préféré le recours à une colonne C18 qui a été largement décrite et utilisée dans la littérature.

Entre le choix de développer une méthode de séparation des AMPA sur une phase de PGC ou en C18, notre choix s'est porté sur cette dernière.

III.2. Réflexion sur les paramètres clés à étudier lors du développement de la méthode PALME

Lors des premières expériences d'optimisation de la PALME, un système de plaques 96-puits, avec une plaque donneuse de 0,5 ml et une plaque filtre standard servant de plaque acceptrice) tel que décrit dans la littérature, a été utilisé pour étudier l'effet des paramètres opérationnels connus pour leur impact sur le processus d'extraction en PALME. Il s'agit des pH des phases donneuse et acceptrice, le temps d'extraction et la vitesse d'agitation [190]. Cependant, il a été constaté que certains paramètres opérationnels qui semblent avoir un impact important sur l'extraction des analytes dans les techniques membranaires n'ont pas fait l'objet d'étude en PALME jusqu'à présent, comme la température d'extraction et la force ionique. L'impact de ces deux paramètres ayant été présenté à plusieurs occasions lors de l'extraction de plusieurs types d'analytes en utilisant la méthode HF-LPME, il nous est apparu intéressant de les étudier.

Par ailleurs, certaines études menées en HF-LPME ont mis l'accent sur l'importance du choix du matériau de la membrane [186][187]. Ce choix combiné au bon choix du solvant permet en effet d'améliorer les performances de cette méthode. Cependant, de nombreuses études impliquant la PALME ont été réalisées en changeant la membrane PVDF par une membrane PP pour éviter le problème d'interactions parasites des analytes étudiés avec la membrane filtrante PVDF mais sans donner plus d'informations ou même une comparaison de l'impact du changement de ces membranes [190],[217], [216],[212]. En vue de ces informations, il semblait aussi intéressant d'investiguer l'impact du choix du matériau de la membrane sur le processus d'extraction en PALME.

Enfin la PALME présentant de nombreux points communs avec la HF-LPME, une étude comparative entre la méthode HF-LPME développée par Desoubries *et al*, [87] et la méthode qui sera développée en PALME pour l'extraction des AMPAs permettra de mettre plus de lumière sur la similitude des deux techniques, notamment en ce qui concerne les conditions expérimentales.

L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans *Analytica Chimica Acta* et présentée ci-après en partie V-3.

III.3. Parallel artificial liquid membrane extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental samples

Cette partie se présente sous la forme d'un article paru en ligne, le 09 novembre 2021 [232]

Analytica Chimica Acta 1190 (2022) 339261



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



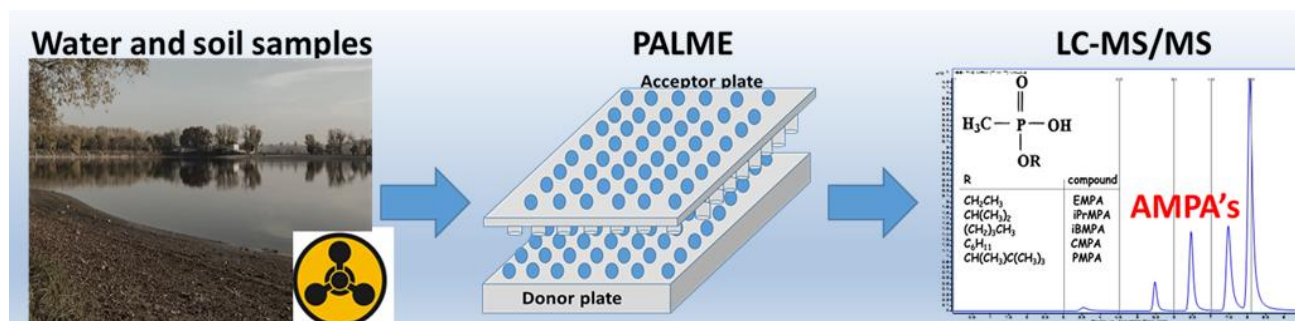
Parallel artificial liquid membrane extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental samples



Khirreddine Bouchouareb^a, Audrey Combes^a, Valérie Pichon^{a, b, *}

^a Department of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization, Chemistry, Biology and Innovation (CBI), ESPCI Paris, PSL University, CNRS, Paris, France

^b Sorbonne Université, Campus UPMC, Paris, France



Abstract:

An emerging miniaturized high-throughput microextraction technique named “Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)” was, for the first time, investigated for the extraction of polar alkyl methylphosphonic acids (AMPAs) that are the degradation products of organophosphorus nerve agents. The effect of the key-parameters of the extraction method (nature of the membrane, of the extraction solvent, of the pH values of both donor and acceptor phases, agitation speed, extraction time, temperature and ionic strength) on the extraction recoveries was

studied in spiked pure water samples. This led to extraction recoveries in the range of 25-102% for the 5 targeted analytes from water with enrichment factors in the range of 4.50-42.75.

The developed PALME-LC-MS/MS method was first evaluated with spiked pure water. LOQs ($S/N \geq 10$) were in the range of 0.009–1.141 ng mL⁻¹, linearity above 0.9973 for all the AMPAs and with RSD values below 11%. This method was then applied on simulated waste water, river water and aqueous soil extracts. The achieved LOQs were in the range of 0.011-1.210, 0.013-1.196 and 0.016-6.810 ng mL⁻¹, respectively. A detailed comparison of the performances of this PALME method with those of a previously developed hollow fiber liquid-phase microextraction methods already applied to AMPAs was done thus allowing to demonstrate the easy transfer of methods from HF-LPME to PALME. Moreover, the high-throughput potential of PALME was revealed since 192 samples were processed in parallel during 120 minutes (37.5 sec/sample).

III.3.1. Introduction

Since World War I, the extensive use of chemical weapons causing great damage led to the establishment of the Chemical Weapons Convention to prohibit the use, production and stockpiling of chemical warfare agents. However, chemical warfare agents are difficult to detect because they degrade in the environment within a few hours to several days [107]. This study focuses on the analysis of five alkyl methylphosphonic acids (AMPAs), which are environmental markers of the main nerve agents [2]. Their analysis remains a challenge due to their highly polar character (log P values between -0.9 and 1.4) and acidic property with pKa values around 2 (see Table.S1 in annex 3 for more details). Their presence at trace level in complex samples implies the need for a powerful and effective sample treatment step in order to extract and concentrate them before chromatographic analysis.

Among analytical techniques that have been used for AMPAs analysis in environmental samples, liquid chromatography in combination with mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) constitute the two most prominent ones [61]. For the GC analysis of AMPAs, a derivatization step is mandatory to convert these non-volatile analytes into GC-amenable compounds. However this chemical modification may introduce artefacts and/or could be a source of errors, especially false positive responses [4]. Thus, LC-MS proved to be an attractive alternative, as the analytes of interest can be directly analyzed in their intact form without the need for additional sample handling and derivatization steps. Moreover, the combination of LC with tandem mass spectrometry (MS/MS) offers the greatest level of specificity and sensitivity for their analysis [58].

Considering the LC separation, the HILIC mode [233],[83], mixed-mode [81] and porous graphitic carbon systems [86] were used but reversed-phase liquid chromatography on C18 silica was

the method of choice for their separation [87],[234],[131]. However, their presence at low concentration in a matrix with a high level of interfering compounds constitutes a real challenge. Therefore, a sample treatment method is crucial to achieve a selective enrichment of the target analytes and to ensure an efficient cleanup of the sample prior to the LC–MS analysis [83].

To replace the conventional extraction techniques like Solid Phase Extraction (SPE) [140],[235],[236],[237],[238]. miniaturized sample preparation known as liquid-phase microextraction (LPME) has emerged. It consist of the use of the porous polypropylene hollow fiber based liquid-phase microextraction (HF-LPME) [191]. Even if low extraction recoveries (lower than 30%) were obtained for polar compounds because of their low affinity for organic solvents, as target compounds are extracted into a very small volume of acceptor phase, a high enrichment factors (EF's) could be obtained [229]. For this reason, experts of the Scientific Advisory Board of the organization for the prohibition of chemical warfare considered that HF-LPME is a very promising technique and can be recommended as an operational procedure for on-site and off-site analysis [239]. Two-phase HF-LPME was applied for the extraction of AMPAs in combination with different derivatization agents such as propyl bromide [195], N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) [194] or 3,5-trifluoromethyl benzene diazomethane [196]. Nevertheless, while removing the constraints linked to the derivation step, higher EFs were obtained with the three-phase HFLPME. Indeed, Tak *et al*, reported EFs of AMPAs in the range of 11-135 in pure water [86]. By introducing heating to the same set-up and adjusting some other operational parameters, Desoubries *et al*, applied it on real environmental and biological samples [87] and the obtained EFs and LOQs in river water were in the range of 15-220 and 0.013–5.3 ng mL⁻¹ respectively. However, this technique is time consuming because it is performed sequentially for each sample (50-60 min per 3-6 mL of sample) and it demands highly trained analysts. Thus trends are for the development of high-throughput sample processing techniques that (i) meet the fundamental principles of green chemistry, (ii) are easy to implement, that (iii) allow the processing of hundreds or even thousands of samples per day in a reliable and reproducible manner and (iv) offer a practical and inexpensive alternative to other complex and laborious traditional techniques [240]. The group of S. Pedersen-Bjergaard has thus adapted in 2013 the HF-LPME concept in 96-well standardized device named parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) [190]. Basically, the target compounds are extracted from an aqueous sample through a thin film of organic solvent, which is loaded as a supported liquid membrane (SLM) into the pores of a flat membrane, and end up in a solution located in the wells of the acceptor plate. Like HF-LPME, PALME is based on a passive and one-way extraction principle but with a different geometry as illustrated in (Figure 51-A in annex 3). The PALME has been used for the treatment of biological samples like plasma [217] or whole blood [211] and recently for a food matrix (wine) [241]. Its application to

nonpolar compounds was performed at many occasions: whether for basic [190],[217],[211],[214],[215],[216],[213],[242] or acidic [241],[216],[213],[212] products. Such as HF-LPME, PALME technique is generally recommended for the extraction of moderately to non-polar compounds ($\log P > 1.5-2$) [229][228]. When the analytes are polar, their extraction becomes problematic without resorting to carriers to facilitate their transfer across the SLM to the acceptor phase. Therefore, the formation of a temporary ion-pair complex between the hydrophilic analyte and 2-di(ethylhexyl) phosphate, that was added in the SLM to form ion-pairs, was proposed for the extraction of polar basic drugs [217]. Another approach consists on the optimization of the SLM using a combinations of different solvents [229].

The purpose of this work was thus to develop a simple, robust and practical high-throughput LPME method helping responding mobile and off-site laboratories to process the large number of samples that could be associated to large scale nerve agent event. Therefore, a PALME method was developed for the extraction of five AMPAs from environmental samples. The studied analytes were pinacolyl methylphosphonic acid (PMPA), isopropyl methylphosphonic acid (iPrMPA), cyclohexyl methylphosphonic acid (CMPA), ethyl methylphosphonic acid (EMPA), isobutyl methylphosphonic acid, (iBMPPA), which are primary hydrolysis products of the nerve agents soman, sarin, cyclohexyl-sarin, VX, and Russian-VX respectively. The effect of various extraction parameters commonly studied in PALME like pH of the donor and acceptor phases, agitation speed and time of extraction on recoveries and on enrichment factors was studied. The selection of new type of donor plates (deep well) with a larger volume (2.2 mL) than the ones commonly used in PALME (0.5 mL), the membrane material and the integration for the first time of new operational parameters like salt concentration in the sample and control of the temperature of the extraction were also examined. The best extraction conditions were applied to the extraction of AMPAs from environmental samples (surface waters and aqueous soil extracts) to evaluate the performance of this method in terms of sensitivity, reproducibility but also of matrix effects on recoveries.

III.3.3. Experimental

III.3.2.1. Chemicals

Soman acid (pinacolyl methylphosphonic acid, PMPA, 97%), VX acid (ethyl methylphosphonic acid, EMPA, 98%), sodium chloride (NaCl), octyl ether, dihexyl ether, hexadecane, dodecanol and 1-octanol were from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Sarin acid (isopropyl methylphosphonic acid, iPrMPPA, 99%), cyclohexyl-sarin acid (cyclohexyl methylphosphonic acid, CMPA, 96%), and Russian VX acid (isobutyl methylphosphonic acid, iBMPPA, 99%) were synthesized in DGA CBRN Defense (Vert-

le-Petit, France). Purified water was obtained from an Alpha-Q purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France, 18.2 MΩ). Acetonitrile (ACN) was from Carlo-Erba (Val-de-Reuil, France). Hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and they were employed to adjust the pH in the aqueous samples and acceptor solutions, respectively. All reagents and solvents used were of analytical grade.

III.3.2.2. Standard solutions and samples

Stock standard solutions of each AMPA were prepared in ACN at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and stored at +4 °C until further use. The stock solutions were used for spiking pure water, river water (Seine river, France), simulated waste water (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CaCl_2 , 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MgSO_4 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of PEG400 in pure water) and aqueous soil extracts to obtain a concentration of 100 ng mL^{-1} . All these solutions were used as sample solutions after adjustment of their pH between 0 and 3 with concentrated HCl. An appropriate amount of NaCl, from 0 to 30% (w/v) depending on the experiments, was added. The pH of the acceptor solutions was adjusted between 11 and 14 using sodium hydroxide (NaOH).

To evaluate the performance of the PALME method in pure water, solutions at 5 concentration levels (0.5, 5, 10, 50 and 100 ng mL^{-1}) of the targeted AMPAs except for EMPA (5, 10, 50 and 100 ng mL^{-1}) were prepared.

The soil sample was collected from Parc de Sceaux (Hauts-de-Seine, France) at 0-5 cm depth. No sieving or any other type of physical treatment was applied on it. The aqueous soil extracts were obtained according to two similar sample preparation methods intended for the exhaustive extraction of iPrMPA, PMPA [243], methylphosphonic acid (MPA), ethylphosphonic acid (EPA) and propylphosphonic acid (PPA) [244]. Their extraction method is mainly based on sonication of soil with water and centrifugation steps: a 10 min sonication step followed by a centrifugation at 700G for 10 min was depicted in one case [243] and a 5 min sonication step followed by a centrifugation step at 10 000 rpm (time not mentioned) was depicted in the second one [244]. The main notable difference between these methods lies in the volume of water used for the extraction compared to the amount of the extracted soil. The first method uses a ratio of 1:1 (V/W) while this was fixed at 5:1 (V/W) for the second one. The two types of the prepared aqueous extracts (sonication for 10 min, 700G for 10min) and (sonication for 5min, 4000G for 10min) were spiked with the five targeted AMPAs at a concentration of 100 ng mL^{-1} . These extracts were not filtered by syringe filter since the PALME technique is based on the use of a membrane.

III.3.2.3. LC-MS/MS analysis

The AMPAs were analyzed using an LC-MS/MS Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to an Ultivo triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) controlled by Mass Hunter software (Version 10.0). The separation of AMPAs was accomplished with an Atlantis dC18 column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) by using a gradient from 100% H₂O acidified with 0.1% formic acid (A) to 90% ACN acidified with 0.1% formic acid (B) during 10 min at a flow-rate of 200 μl min⁻¹. Then, this mobile phase composition was kept constant for 1 min before returning to equilibrium. The injection volume was set at 5 μl.

The ionization was carried out with an electrospray interface (ESI) in a negative ion mode. Acquisition was performed in a multiple reaction monitoring (MRM) mode. The parameters of the ESI source were as follows: drying gas (N₂) flow rate, 8.0 L min⁻¹; drying gas temperature, 350 °C; nebulizing gas pressure, 30 psi. The MRM transitions and corresponding parameters are shown in annex 3 (Table. S2).

III.3.2.4. Equipment and extraction set-up

PALME was performed using a 96-well plate of polypropylene (PP) with 0.5 mL wells from Nunc (Roskilde, Denmark) or 96-well deep-well collection plates (Millipore, Germany) with 2.2 mL wells as donor plate depending the experiments, and a MAIPNTR10 96-well MultiScreen-IP Filter Plate with 0.45 μm porous, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Ireland) as an acceptor plate with a maximum working volume of 250 μL. To evaluate the impact of the membrane material, a PP membrane (Accurel PP 1E R/P, Membrana, Wuppertal, Germany) was cut into circular pieces, and they were attached between the donor and acceptor plates. The internal diameter of each well was 6 mm. A lid was used to avoid potential losses of the acceptor solution by evaporation during extraction. No preconditioning of the membranes was required.

The extraction procedure was performed as follows. First, the acidified samples solutions were pipetted into the 96-well donor plate (0.5 mL wells or 2.2 mL wells depending on the experiments). Then, 4 μl of various organic solvents were deposited into each porous membrane in the acceptor plate to form the artificial liquid membrane. Finally, a volume of 50 μl of alkaline acceptor phase (NaOH) was introduced into the 96-well acceptor plate. The latter was sealed with Thermowell™ sealing tape. Finally, the two plates were fixed together by tape. The set-up is illustrated in (Figure 51-B in annex 3).

The whole assembly was agitated and heated on a microplate shaker with 2-place platform

(PHMP Grant-Bio, Riga, Latvia) for a given time. After PALME, the acceptor solutions were collected using a micropipette. 40 μl of the recovered solutions were then neutralized by the same volume of HCl solution (1:1, v/v) to be compatible with the developed LC–MS/MS analysis. The recoveries R (%) and EFs were estimated according to the following equation:

$$R = \left(\frac{n_{a,final}}{n_{d,initial}} \right) * 100\% = \frac{C_{a,final}}{C_{d,initial}} * \frac{V_a}{V_d} * 100\% \text{ and } EF = R * \frac{V_d}{V_a}$$

Where $n_{d,initial}$ is the initial amount of analyte in the donor phase and $n_{a,final}$ is the final amount of the analyte present in the acceptor phase estimated thanks to the calibration curve established in pure media. $C_{d,i}$ and $C_{a,f}$ are the concentrations of analyte present, respectively, in the donor and acceptor phases. V_d and V_a represent the volumes of donor and acceptor solutions, respectively.

The limits of quantification (LOQs) after sample treatment were calculated for a signal-to-noise ratio (S/N) of 10 using results obtained by applying PALME-LC–MS/MS to the five samples (PW: pure water; RW: river water; SWW: simulated waste water, ASE1: aqueous soil extract 1:1 (V/W) and ASE2: aqueous soil extract 5:1 (V/W)) spiked at low concentrations ($[\text{PMPA}]_{\text{PW, RW and SWW}} = 0.05 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[\text{PMPA}]_{\text{ASE1 and ASE2}} = 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$; $[\text{CMPA}]_{\text{PW, RW and SWW}} = 0.05 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[\text{CMPA}]_{\text{ASE1 and ASE2}} = 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$; $[\text{iBMPA}]_{\text{PW, RW and SWW}} = 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[\text{iBMPA}]_{\text{ASE1 and ASE2}} = 0.2 \text{ ng mL}^{-1}$; $[\text{iPrMPA}]_{\text{PW, RW and SWW}} = 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[\text{iPrMPA}]_{\text{ASE1 and ASE2}} = 1 \text{ ng mL}^{-1}$; $[\text{EMPA}]_{\text{PW, RW and SWW}} = 5 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[\text{EMPA}]_{\text{ASE2}} = 10 \text{ ng mL}^{-1}$).

III.3.3. Results and discussion

III.3.3.1. Optimization of PALME parameters

The first series of experiments consisted of studying the key-parameters affecting the extraction efficiency such as the nature of the extraction solvent loaded in the membrane, the chemical composition of this membrane, the pH values of the donor and acceptor phases, the sample ionic strength, the agitation speed, the temperature and the extraction time. Moreover, to reach high EF's, the volume donor phase, *i.e.* of sample, was also optimized by selecting a donor plate endowed with deeper wells than conventional plate used in the previous works. In order to limit the consumption of non-commercially available compounds (iPrMPA, CMPA and iBMPA), and as PMPA was previously used for the optimization of HF-LPME [87], the effect of most of these parameters on recoveries were studied by spiking pure water with this compound.

Therefore, first extraction tests were carried out using commercially available 96-well plates with PVDF membrane during 30 min at room temperature (25°C) with an agitation speed of 600 rpm

without any salt addition to the samples. The volumes of the acceptor and donor phases were 350 μL and 50 μL , respectively. All these parameters were drawn up according to the first report published on PALME [190] while the pH's values of the donor and acceptor phases, *i.e.* 1 and 13, respectively, were close to those reported for the extraction of AMPAs by HF-LPME in triphasic mode, *i.e.* 1 and 14 respectively [86],[87].

a) Selection of the supported liquid membrane

The selection of a suitable organic solvent to form the SLM is a crucial step for efficient extraction. Thanks to its high affinity with targeted analytes, 1-octanol was already selected for the three-phase HF-LPME of AMPAs [86],[87]. However, it was judged necessary to check its compatibility with the new filter material (PVDF) since it was only applied on a PP material before. In addition to 1-octanol, a selection of four solvents already applied in PALME or in HF-LPME (dihexyl ether, octyl ether, dodecanol and hexadecane) were also examined. Hexadecane and ether-based solvents like dihexyl ether were selected for the PALME extraction of either acidic or basic drugs [190],[216],[213],[212]. Dodecanol was selected for the HF-LPME of pesticides from grape juice instead of octanol and toluene [245].

The extraction recoveries obtained for the five tested solvents are reported in (Figure 52 in annex 3). Extraction recoveries for dodecanol and hexadecane were 16 and 9% respectively while almost no recovery was obtained using the two ether-based solvents. This could be explained by the fact that the selected ethers act only as hydrogen bond acceptors (HBA) while the AMPAs are also HBA. The highest extraction recovery (44%) was provided by 1-octanol. Thus, it was selected as an extraction solvent for all further experiments.

The obtained results show that polarity ($\log P$) alone could not explain the affinity of the solvent to the studied analytes. The experimental parameters of the Kamlet–Taft solvatochromic relationship which measure separately the hydrogen bond donor (α), hydrogen bond acceptor (HBA: β), and dipolarity/polarizability (π^*) properties of solvents as contributing to the overall solvent polarity were used recently to explain this aspect [246]. Since 1-octanol was found to have a relatively high values for α which means it has a high HBD strength and thus will accommodate the HBA groups of AMPA's. In general, 1-octanol has affinity to a huge board of compounds. It was widely used as a solvent in HF-LPME [247] thanks to its ability to act as HBD and as HBA depending the type of the analyte.

b) Selection of the membrane material

A previous study compared fibers made of PP and PVDF and showed that the fiber with the PVDF material was more suitable for the HF-LPME of flunitrazepam in plasma and urine [186]. Furthermore, the combination of the PVDF material and the 1-octanol revealed the best extraction efficiency for organochlorine pesticides compared to the PP material used in combination of various organic solvents [187]. In return, many studies involving PALME were accomplished by changing the PVDF membrane by PP membrane to avoid the problem of the nonspecific binding of the studied analytes to the PVDF filter membrane but without giving no further information or comparison between these membranes [190],[217], [216],[212]. As the HF-LPME systems for the extraction of AMPAs were built using PP fibers [86],[87], we investigated the effect of replacing the PVDF Immobilon®-P membrane in the acceptor plates by the porous PP membrane on the extraction performance. This was done by studying the behavior of most and the less polar analytes (PMPA and EMPA). The differences between the two membranes are given in (Table.S3 in annex 3).

With an extraction time of 30 minutes, the extraction efficiency for both analytes obtained for the PVDF Immobilon®-P were higher than those obtained for PP Accurel PP 1E (R/P), as shown in Figure 35. Indeed, the extraction recoveries obtained for the PVDF membrane were 53 and 6% while they do not exceed 31 and 4% with the PP membrane for PMPA and EMPA respectively. These low extraction recoveries obtained using the PP membrane could be due to (i) kinetics of exchange for PMPA through both membranes or (ii) to the relatively small pore size of this membrane compared to the PVDF membrane and/or to its chemical nature. Indeed, the impregnation of the PVDF membrane by the solvent was instantaneous which was not the case for the PP membrane as previously reported [218]. Therefore, no optimization of the immersion time in 1-octanol of the PVDF membrane needs to be performed in contrast to what had been done previously in HF-LPME [87]. Moreover, the filter plates with PVDF material are commercially available in contrast of PP material. For all these reasons, the PVDF membrane was selected for the next experiments.

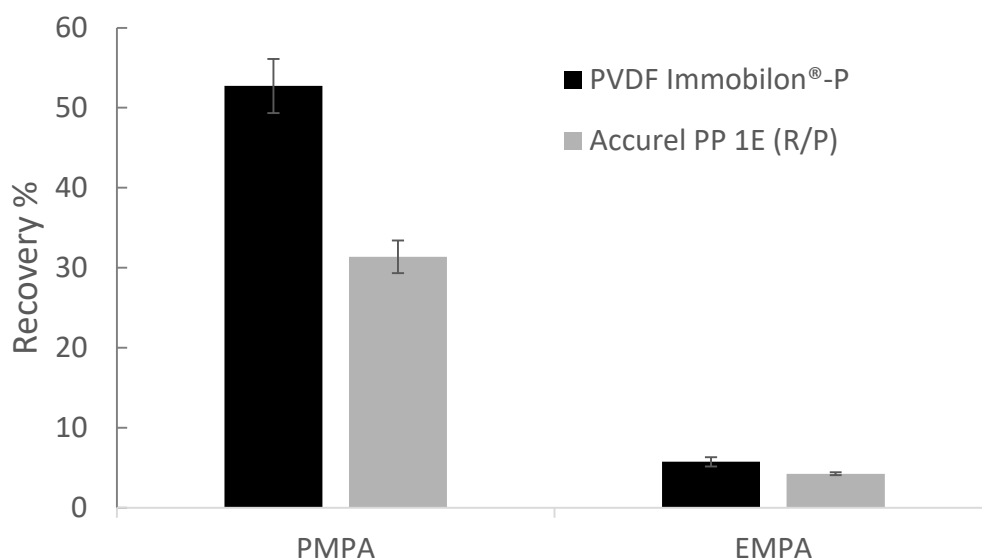


Figure 35 : Effect of the type of the flat membrane on the extraction recovery of 500 ng mL⁻¹ of EMPA and 100 ng mL⁻¹ of PMPA from pure water by PALME (n = 3). Extraction conditions: donor phase: pure water at pH 1, V_d=350 μL, 0 % NaCl (w/v); acceptor phase: pure water at pH 13, V_a = 50 μL; 4 μL of octanol; extraction time: 30 min; T_{ext} = 25 °C; agitation rate: 600 rpm.

c) Effect of the pH of donor and acceptor phase on recoveries

In this three-phase LPME mode, the extraction process is pH dependent. This involves adjusting the pH of the sample to an acidic pH so that the analytes are not ionized, thus facilitating their transfer through the SLM to the aqueous acceptor phase, which must be at a basic pH to prevent their re-extraction into the organic solvent and thus ensure a mono-directional transfer.

The effect of the pH of both donor and acceptor phases on the extraction recovery of PMPA was studied and the results are reported in the Figures 36-A and 36-B. The best extraction recoveries were achieved with pH values of 0 or 1 for the donor phase. Hence, the pH value of the donor phase was set at 1. Regarding the pH of the acceptor phase, it was found that higher concentrations of NaOH in the acceptor phase provided higher recoveries for PMPA. Theoretically, the transfer of analytes to the acceptor phase should be effective at pH values of the acceptor phase that are higher than the pK_a values of the analytes. Thus, a pH value above 5 (pH > pK_a + 2) should be more than sufficient. However, it was mentioned earlier that a large pH difference between the donor and acceptor phases is necessary to ensure the extraction of these highly polar compounds [86],[87]. Therefore, pH values of the acceptor phase between 11 and 14 were tested. The latter was found to give the best recoveries for PMPA. Hence it was selected as the optimum pH value for the acceptor phase for the next experiments. It can be noticed that optimized values of the pH of both donor and acceptor phase are exactly the same as those optimized for the HF-LPME of PMPA in a previous studies [86],[87].

d) Effect of the ionic strength on recoveries

While not studied in previous works on PALME, past HF-LPME studies on the extraction of AMPAs from aqueous samples reported the positive effect of the salt addition on the extraction process (salting out effect) of PMPA [86],[87]. Therefore, the salting out effect was studied by adding NaCl to the donor aqueous phase in the range of 0–30% (w/v). The addition of the salt in the donor phase is thus limited by the solubility of NaCl in water ($\approx 33\%$, at 25 °C). The results reported in Figure 36-C show that the extraction efficiency of the PMPA is increasing when increasing the salt concentration. The addition of 30% NaCl (w/v) led to a twofold increase in PMPA extraction recoveries. Thus, the 30% (w/v) salt concentration was chosen as the optimal concentration. However, as PMPA is the compound for which the highest yield is expected (as it is the least polar) and that the yield is close to 100% by adding 30% NaCl, the study of the other key extraction parameters was continued without adding NaCl to the donor phase in order to simulate a compound that is more difficult to extract and to gain a better understanding of the effect of the other parameters still to be studied on the yield.

e) Effect of the extraction temperature on recoveries

In all previous work on PALME the effect of extraction temperature as a critical parameter has not been taken into account. However high-throughput sample preparation is based on automation with the objective of reducing the susceptibility to errors and variability as much as possible. In fact, the control of the temperature could ensure a better inter-day repeatability of the extraction recoveries. Moreover, the temperature can improve the diffusion coefficients of the analytes and decrease the time required to reach the equilibrium. The effect of the temperature on the PALME efficiency of PMPA was thus investigated by increasing the temperature from 25°C to 60°C. As shown in Figure 36-D, the recoveries first increase with temperature and reach an optimum at 40°C before decreasing slightly. As already observed on different compounds extracted with HF-LPME [248][249][250][251], this decrease could be due to a decrease of the partition coefficient following the increase of the temperature and/or to the beginning of a loss of organic solvent from the SLM by solubilization in aqueous media and evaporation. Consequently, a temperature of 40 °C should be chosen as the optimum extraction temperature. These results confirm those of Desoubries *et al*, [87] who reported an increase and then a decrease in the EF of PMPA as a function of temperature in HF-LPME and determined an optimal extraction temperature of 42°C.

f) Effect of the agitation speed on recoveries

As with any method based on partition equilibrium, the speed of agitation is an important parameter for improving extraction kinetics. However, it is obvious that the value of agitation speed is also depending on the system used for agitation and of the whole experiment set-up.

Unlike in HF-LPME where the stirring affects only the donor phase, the stirring in PALME promotes the mass transfer of the analytes by convection in both sample donor phase and acceptor phase. Moreover, the system of agitation in PALME is almost standardized therefore 900 rpm was optimized once [190] and fixed as an optimum value for the agitation speed in all the previous works with PALME carried out by the inventor team.

In this study, different agitation speeds ranging from 200 to 1200 rpm were tested to determine their effects on the extraction efficiency of PMPA. As shown in Figure 36-E, extraction recoveries increase when increasing the agitation speed from 200 to 600 rpm. For agitation speeds higher than 600 rpm, the recoveries are constant, thus indicating that, the equilibrium is already reached in 30 minutes. 1000 rpm was selected as an optimum agitation speed. This result is very close to the one used for all the previous PALME studies. This can be explained by the standardization of the technique unlike the HF-LPME where different types of agitation platforms, size of vials, volumes of samples, immersion length of the HF, size of magnetic stir bars could affect value of the optimal agitation speed.

g) Effect of the extraction time on recoveries

Like the other microextraction approaches, the mass transfer in PALME is a time dependent process and continuously increased until equilibrium is reached between donor phase, SLM and acceptor phase. It can take from few minutes to several hours to attend an optimal extraction recovery and EF. The results obtained while increasing the extraction time from 30 to 50 min with an agitation speed fixed at 600 rpm showed that the extraction efficiency of the PMPA increased considerably (from 40 to 80%) (Figure 36-F) before reaching a plateau for higher extraction times. Therefore, setting an extraction time of 60 minutes ensures that equilibrium is reached, even more so if a higher stirring speed is set as suggested by the results described in section 3.1.5.

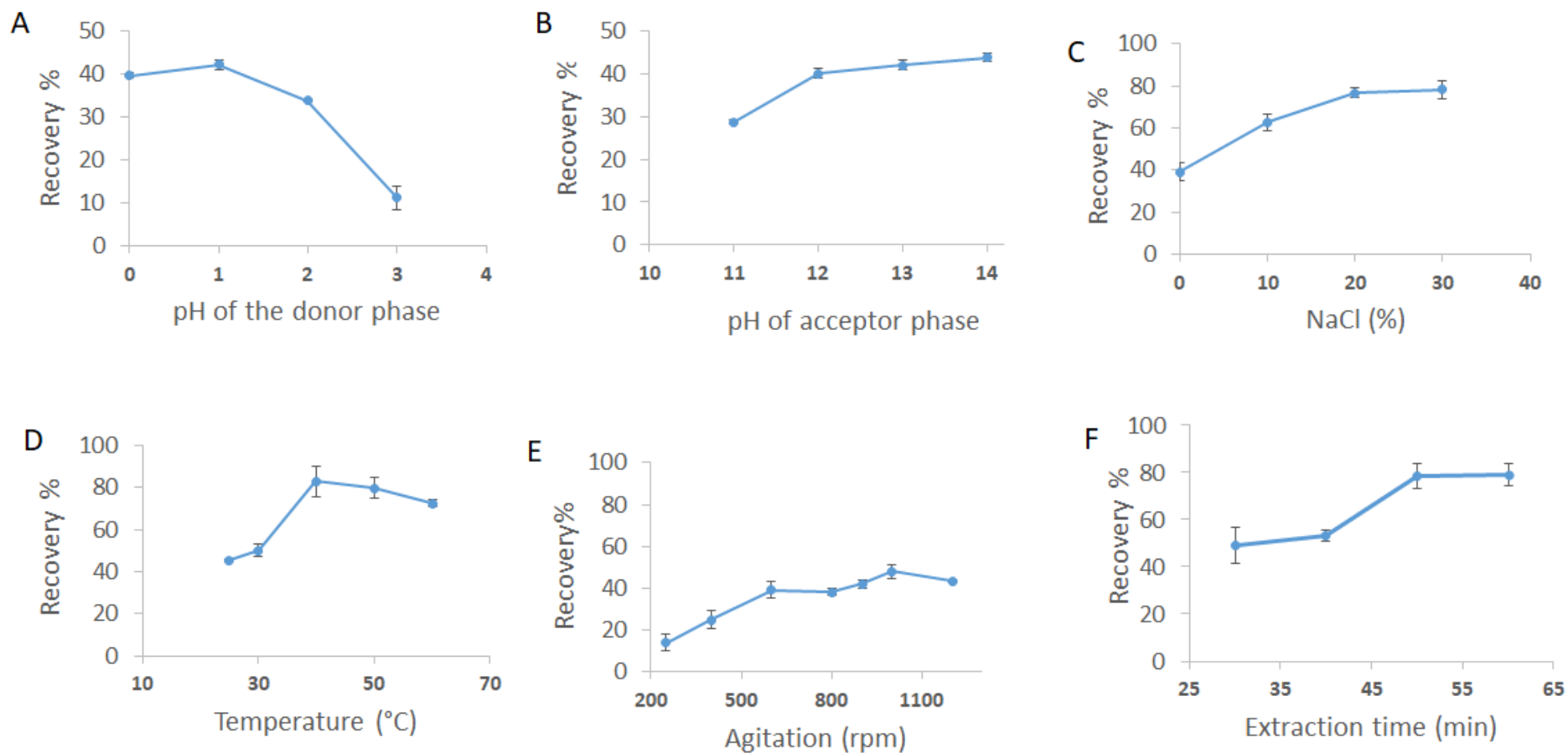


Figure 36 : Effect of the pH of the donor phase (A) and of the acceptor phase (B), of the amount of NaCl in the donor phase (C), of the temperature (D), of agitation speed (E) and of the extraction time (F) on the extraction recoveries of PMPA (100 ng mL^{-1}) from pure water by PALME (average \pm SD, $n=3$). Constant parameters from A to F (except when mentioned): $4 \mu\text{L}$ of 1-octanol in PVDF membrane; Acceptor phase: $V_a = 50 \mu\text{L}$, pH 13 (except B); donor phase: $V_d = 350 \mu\text{L}$; pH 1 (except A), 0 % NaCl (w/v) (except C); $T_{\text{ext}} = 25^\circ\text{C}$ (except D); agitation speed 600 rpm (except E); extraction time 30 min (except F).

h) Application of the defined conditions to the extraction of AMPAs

According to results obtained for the extraction of PMPA, the extraction conditions were set as follows to study the extraction of other AMPAs: use of a PVDF membrane with 4 μ l 1-octanol, pH values of the donor ($V_d = 350 \mu$ l) and of the acceptor phase ($V_a = 50 \mu$ l) were set at 1 and 14 respectively, extraction time of 60 minutes, agitation speed set at 1000 rpm, addition of 30% NaCl in the donor phase, temperature set at 40°C. The results are reported in (Figure 37: pH=1, 60min). Exhaustive extraction was obtained for PMPA and CMPA but as expected the extraction recovery decreases when the analytes become more polar (extraction recoveries of only 17% for EMPA). Therefore, two parameters were reevaluated: the use of more acidic conditions (pH = 0) in the donor phase to limit as much as possible the ionization of the AMPAs and thus to favor their transfer in the SLM and a longer extraction times, the 60-minute extraction time having been evaluated with PMPA for which equilibrium can be reached more quickly than for other compounds. As shown by results reported on Figure 37, the use of more acidic conditions tends to decrease the extraction recoveries. In return, the increase of the extraction time favors the extraction of the most polar analytes, particularly for iPrMPA. In these conditions, extraction recoveries close to 100 % for PMPA, CMPA, and iBMPA and to 80% for iPrMPA were obtained, the extraction recovery of EMPA (the most polar analyte) being close to 25%.

Thus, while previous studies recommend the application of PALME to extract relatively non-polar compounds (log P greater than 2) [228], we showed that it was possible to obtain extraction with yields greater than 75% for compounds with log P between -0.5 and 0.8. However, all the enrichment factors do not exceed 7 as shown in Figure 37, which is the maximum theoretical enrichment factor with this PALME set-up ($V_d=350 \mu$ L, $V_a= 50 \mu$ L). All the previous works with PALME were performed with a system of plates giving a maximum enrichment factor of 5 ($V_d=250 \mu$ L, $V_a= 50 \mu$ L) except in one study when the V_d was set at 400 μ L thus giving rise the possibility to reach an EF of 8 [190]. While this has been deemed sufficient for most pharmaceutical and biomedical application [210], the limitation of PALME regarding the low resulting enrichments factors was recently pointed out by authors working on the label-free detection of ochratoxin in wine [241].

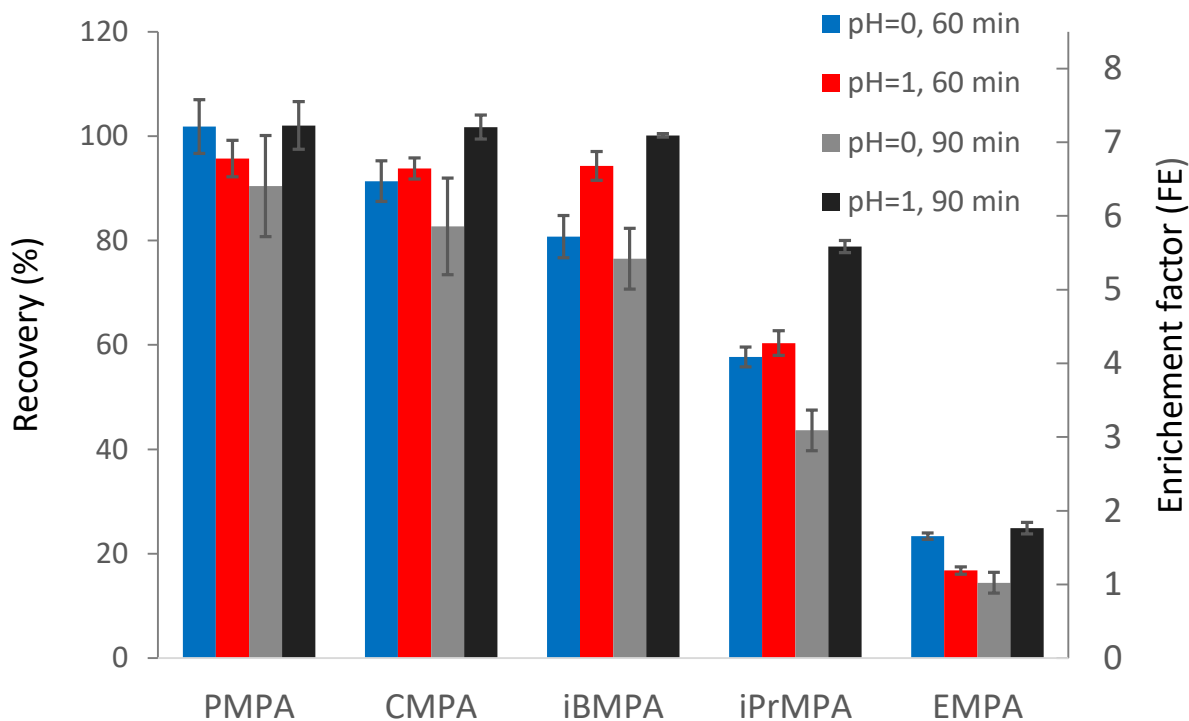


Figure 37 : Effect of the donor pH and the extraction time on the PALME recoveries and the EFs of the five studied analytes (100 ng mL^{-1}) in pure water ($n=3$). Extraction conditions: $4 \mu\text{L}$ of 1-octanol in PVDF flat membrane (SLM); donor phase: $\text{pH} = 1$, $V_d = 350 \mu\text{L}$; 30% NaCl (w/v); acceptor phase: $\text{pH} 14$; $V_a = 50 \mu\text{L}$; 1000 rpm; $T_{\text{ext}} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$. (Initial optimized values for donor pH and extraction time were 1 and 1H00 respectively).

For the trace level determination of AMPAs in environmental samples high enrichment factors are requested [87]. So, in order to increase them, the volume of the donor phase was increased by modifying the original assembly. The initial donor 96-well plate with a well volume of 0.5 mL was replaced by one with a volume of 2.2 mL. The extraction of all the targeted compounds was then performed using this new donor plate (V_d was set at 2.12 mL) and by keeping other extraction conditions except the extraction duration. Indeed, the extraction was carried out during 90 minutes as before but also during 120 minutes to compensate the larger size of the device that results in longer diffusion distance for the target compounds. As shown by results reported on Figure 38, this larger extraction duration was not necessary for the less polar compound, PMPA that reaches equilibrium in less than 90 minutes in both cases. In return, this increase in extraction time favors the extraction recoveries for the three more polar AMPAs (iBMPA, iPrMPA and EMPA). Moreover, these conditions lead to enrichment factors greater than 30 for the three least polar compounds, greater than 10 for iPrMPA and of the order of 5 for EMPA.

The comparison between the best results obtained for of PMPA using PALME to those obtained using HF-LPME [86],[87] is provided in (Table.S4, annex 3). Almost all the fixed parameters were the same in the two techniques such as the nature of solvent, the pH values of the donor and acceptor fixed with HCl (pH=1) and NaOH (pH=14) respectively, temperature, amount of NaCl added in the donor phase and the need of a relatively strong agitation. Altogether, its proof the possibility of a simple transfer and quick development of PALME methods starting from the abundant conditions already described for HF-LPME for numerous applications. An improvement brought by the method developed in this study was the replacement of the PP membrane by the PVDF membrane which permits a quicker impregnation with the selected solvent and a better transfer of the PMPA. Moreover, the high extraction recoveries obtained for three among the five studied compounds provided high-enrichment factors despite to the relatively low ratio between V_d and V_a , as compared to HF-LPME [252]. An enrichment factor close to 43 was obtained for PMPA with a sample volume of 2.12 mL which is comparable to its enrichment factor with HF-LPME (85) obtained with a sample volume of 6 mL (≈ 3 times the sample volume used in PALME) [86]. Finally, it is important to underline the fact that, although the method developed in PALME is longer (120 minutes) than the HF-LPME (50-60 minutes), the possibility to process 96 samples simultaneously considerably reduces the processing time before analysis when a large number of samples are to be analyzed.

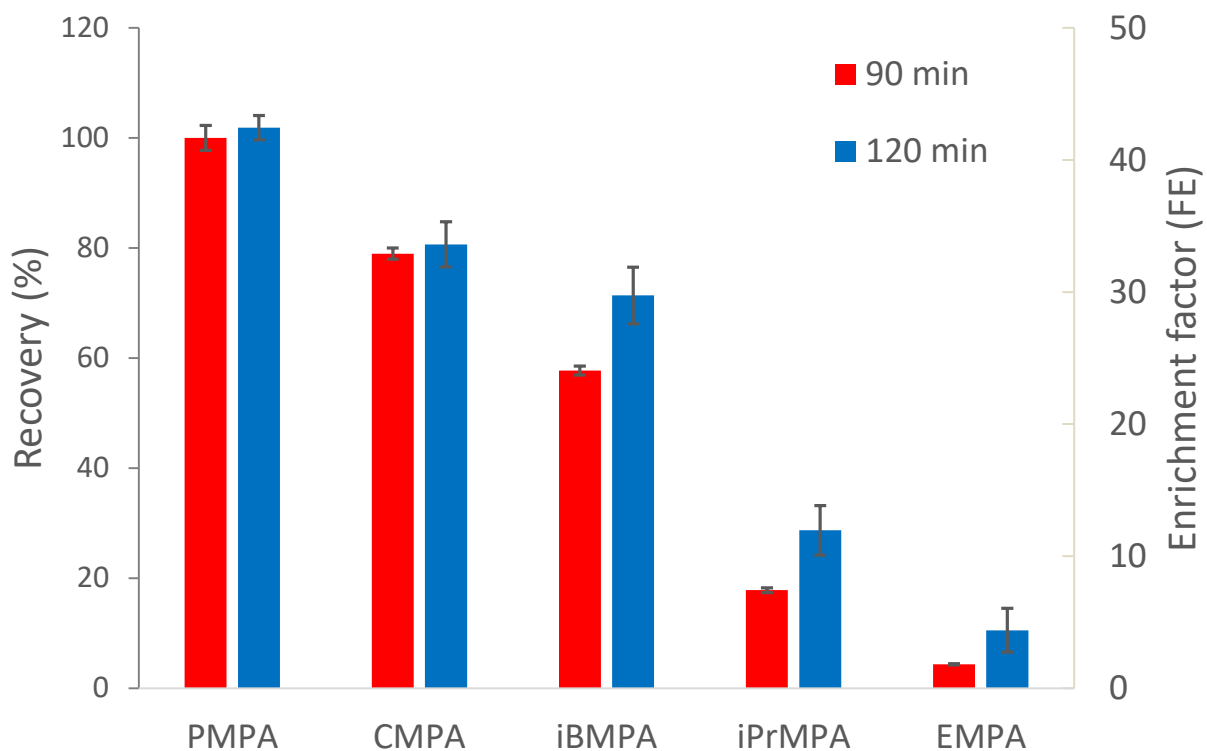


Figure 38 : Effect of the extraction time on the PALME recoveries and on the EFs for the five studied AMPAs (100 ng mL⁻¹) in spiked pure water (n=3). Extraction conditions: 4 µl of 1-octanol in PVDF flat membrane (SLM); donor phase: pH = 1, V_d = 2120 µL; 30% NaCl (w/v); acceptor phase: pH = 14; V_a = 50 µL; 1000 rpm; T_{ext} = 40 °C.

III.3.3.2. Figures of merit of the PALME-LC-MS/MS method

To evaluate the performances of the developed PALME method, the extraction recoveries and the linearity of the method were assessed at 5 concentration levels in the range of 0.5 to 100 ng mL⁻¹ for all the targeted AMPAs (except for EMPA, 5–100 ng mL⁻¹) in pure water. The results are given in Table 9. Excellent linearity was obtained with a R² value in the range of 0.9973 to 0.9998. Repeatability was measured for all target analytes at all the different levels of concentrations. Acceptable RSD values on recoveries (n=15, except for EMPA n=12) in the range of 8.28–10.90 % were obtained thus indicating the good repeatability of the whole method.

Table 9 : Linearity and repeatability of the PALME-LC-MS/MS method for AMPAs in pure water.

| Analyte | PMPA | CMPA | iBMPA | iPrMPA | EMPA |
|--|----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Concentration range (ng mL ⁻¹) | 0.5-100 | 0.5-100 | 0.5-100 | 0.5-100 | 5.0-100 |
| Recovery (%) | 100.83 | 80.35 | 71.25 | 28.28 | 10.61 |
| Enrichment factor | 42.75 | 34.07 | 30.21 | 11.99 | 4.50 |
| RSD (%)* | 10.90 | 10.06 | 9.80 | 9.40 | 8.28 |
| Equation | $y = 42.746x + 37.9$ | $y = 34.069x + 42.089$ | $y = 30.212x + 19.065$ | $y = 11.9870x - 3.5538$ | $y = 4.4969x - 3.8876$ |
| linearity (R ²) | 0.9998 | 0.9993 | 0.9998 | 0.9973 | 0.9991 |
| Limit of quantification (ng mL ⁻¹) | 0.009 | 0.012 | 0.020 | 0.029 | 1.141 |

*: The overall relative standard deviation values of all the concentrations level for each compound (n= 15, except for EMPA n=12) were calculated after the verification of the homogeneity of the RSD values with the Cochran's test (g0.95).

III.3.3.3. Application to environmental samples

For the first time, PALME was applied on three types of environmental samples consisting in a simulated waste water, a river water, and aqueous soil extracts. Figure 39 presents the EFs obtained by applying the optimal extraction conditions previously optimized (extraction during 120 minutes) except for V_d that was reduced to 1950 μ l to ensure a better stability and avoid cross contamination when agitating. For all compounds, the extraction recoveries were rather the same for the different types of water samples (pure, river and simulated waste water), thus allowing to maintain satisfactory EFs for these three types of water.

In addition to the application of the PALME method to water samples, it appears interesting to apply it to aqueous soil extracts as soil samples proved to be of critical importance in confirming the use of chemical warfare agents in real conflicts [230],[231]. The efficiency of the methods applied to the extraction of AMPAs is soil-type dependent as already reported [50],[243],[253],[254]. As the development of an extraction method from soil was not the objective of this study, a soil sample was subjected to two different extraction methods previously reported for the extraction of some AMPAs [243], [244] (and detailed in section 2.2) to obtain an aqueous soil extract that was further spiked with AMPAs to evaluate the potential of PALME on this type of sample. These two methods differ mainly in the ratio of the volume of water to the amount of soil treated.

The extraction recoveries with PALME of the less polar AMPAs from extract aqueous soil samples were mostly the same as from pure water. However, an important decrease of the recoveries of the very

polar compounds was observed. Only 0.21% and 2.56% were obtained for the extraction of EMPA and iPrMPA respectively from the first type of aqueous soil extract. These recoveries are improved (to 2.70% and 10.97% for EMPA and iPrMPA respectively) when applying PALME on the second type of aqueous extract soil. This result was predictable since the matrix effect was reduced when using a ratio of 5 mL of water to 1g of soil compared to the 1:1 (V/W) ratio. Soils are known to be very rich in humic acids and the dilution of the samples reduces the matrix effect they cause. Many extraction methods of soils reported in the literature are performed with a ratio of volume of water per mass of soil superior to 1. Some studies reported the determination of AMPAs in aqueous extracts of soil prepared with higher ratios (up to 7) [255]. However, despite the fact that high extraction recoveries can be expected with these conditions, the sensitivity of the final methods is affected because of this high dilution rate. Hence, a compromise between recoveries and sensitivity must be found.

The application of PALME to the most diluted soil extract leads to higher extraction yields than for the less diluted one but it is obvious that the EFs obtained on the less diluted extract are higher and make the method more efficient despite the lower yields except for EMPA. The obtained EFs with the first type of aqueous extract soil are 36.76, 30.31, 18.52, 1.04 and 0.08 for PMPA, CMPA, iBMPA, iPrMPA and EMPA respectively. The application of PALME to the second type of aqueous extract soil is only interesting for EMPA since an EF of 1.06 is obtained in these conditions.

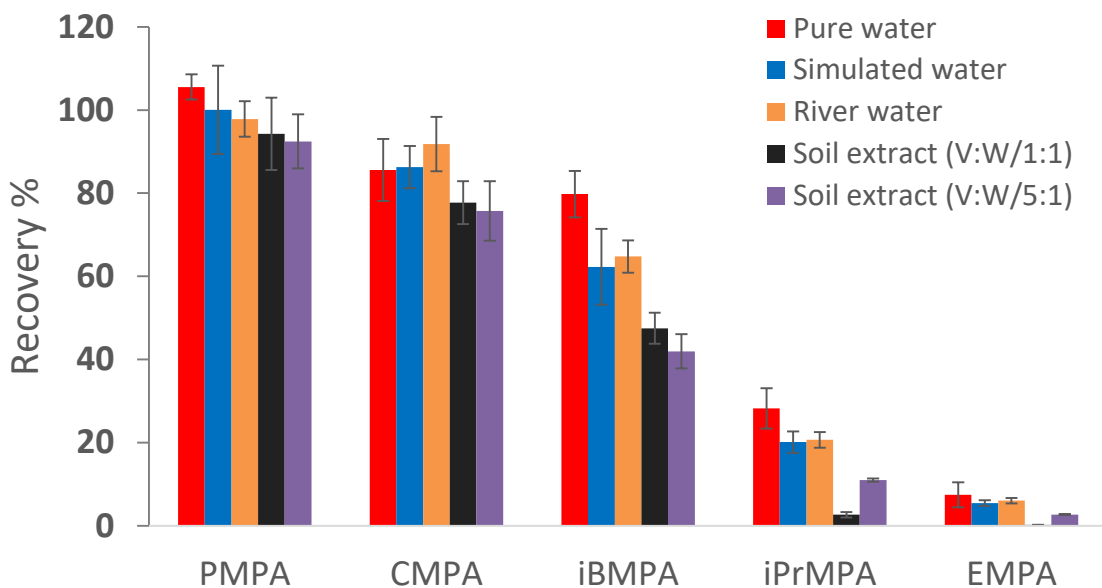


Figure 39: Extraction recoveries obtained with PALME of the five targeted AMPAs (0.1 µg mL⁻¹) in different aqueous matrices (n=3). Constant parameters: 4 µl of 1-octanol in PVDF flat membrane (SLM); donor phase: pH 1, V_d = 1950 µL; 30% NaCl (w/v); acceptor phase: pH 14; V_a = 50 µL; 1000 rpm; Text = 40 °C.

The LOQs estimated for the studied environmental samples are reported in Table 10 except for EMPA for the first aqueous soil extract type which was not applicable for study since EF is lower than 1. These LOQs obtained for the five AMPAs are very low in particular for the less polar compounds. They are similar for river water, simulated waste water as for the pure water. Higher LOQs were obtained for the aqueous soil extracts which is normal given the complexity of these samples.

Table 10 : Limits of quantification (S/N = 10) obtained for each AMPA in pure water, simulated waste water, river water and aqueous soil extracts after PALME and LC–MS/MS analysis. n.a.: not applicable.

| Analyte | Pure water (ng mL ⁻¹) | Simulated Waste Water (ng mL ⁻¹) | River water (ng mL ⁻¹) | Soil 1:1 (V/W) ratio (ng g ⁻¹)* | Soil 5:1 (V/W) ratio (ng g ⁻¹ ** |
|---------|-----------------------------------|--|------------------------------------|---|---|
| PMPA | 0.009 | 0.011 | 0.013 | 0.016 | 0.075 |
| CMPA | 0.012 | 0.012 | 0.009 | 0.017 | 0.090 |
| iBMPA | 0.020 | 0.023 | 0.022 | 0.025 | 0.135 |
| iPrMPA | 0.029 | 0.041 | 0.035 | 0.515 | 0.625 |
| EMPA | 1.141 | 1.210 | 1.196 | n.a | 6.810 |

*1 ng/g is equivalent to 1 ng mL⁻¹ assuming an exhaustive aqueous extraction of AMPAs from soil samples.

**1 ng/g is equivalent to 0.25 ng mL⁻¹ assuming an exhaustive aqueous extraction of AMPAs from soil samples.

The LOQs obtained for almost all the analytes in water ($0.009\text{-}1.210\text{ ng mL}^{-1}$) and soil ($0.016\text{-}0.515\text{ ng g}^{-1}$) were lower than those previously obtained with different methods listed in Table 11, several of which were applied in a pure water [86],[256],[194],[195]. These reported methods were performed with different types of analytical instrument and based on different extraction concepts such as the two phase HF-LPME (including a derivatization step) [194],[195], the three-phase HF-LPME [86],[87] or off-line SPE [255],[254] and on-line SPE [83],[50]. In addition to the high sensitivity of the current method compared to the other reported methods that were not all applied to real samples, PALME has also demonstrated to be a simple and quick method with a relatively low consumption of samples, since it was performed in one step with a short sample throughput time (37.5 sec) on samples of water and soil not exceeding 2mL and 2 g, respectively.

Table 11 : Comparison of the current PALME method with other sample preparation techniques for the determination of AMPAs in water and soil samples

| Sample matrix | Analytes | Technique | Sample volume/amount | Extraction time | Analytical method | LOD*, LOQ** (ng mL ⁻¹) | Ref |
|------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------------|-------|
| Pure Water | EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | Direct injection | 5–20 µl | 0 min | LC-APCI-MS (SIM) | 10–100* | [256] |
| Deionized water | EMPA, iPrMPA, PMPA | HFLPME (two-phase, derivatization) | 3 mL | 45 min | GC/MS (scan) | 0.16, 0.03 and 0.05* | [194] |
| Triple distilled water | iPrMPA, PMPA | HFLPME (two-phase, derivatization) | 1.5 mL | 150 min | GC/MS (SIM) | 100 and 500* | [195] |
| Tap water | EMPA, iPrMPA, iBMPA, CPMA, PMPA | HFLPME (two-phase, derivatization) | 4 mL | 70 min | GC/MS (NCI, SIM) | 0.1-10** | [196] |
| Pure water | iPrMPA, iBMPA, PMPA | HFLPME (three-phase) | 6 mL | 60 min | LC-ESI-MS ⁿ (EIC) | 2.0, 2.0 and 0.1* | [86] |

| | | | | | | | |
|---|---------------------------------------|--|---------|--|-----------------------|------------------------------------|-----------------|
| River water + Simulated Waste Water | EMPA, iPrMPA, iBMPA, PMPA | HFLPME (three- phase) | 3 mL | 50 min | LC-ESI-MS (SIM) | 0.013- 6.3** | [87] |
| Tap water + natural water + simulated waste water | EMPA, iBMPA, PMPA | Off-line SPE (Ba/Ag/H) + On-line SPE (PGC) | 10 mL | > 15 min | LC-ESI-TOF-MS | 3.4-7.2** | [83] |
| Pure water + river water + simulated waste water | EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | PALME | 1.95 mL | 37.5 sec (120 min for 96*2 samples) | LC-ESI-MS/MS (MRM) | 0.009- 1.210** | Actual study |
| Different soil types | iPrMPA, PMPA | Direct injection | 1 g | 0 min | LC-ESI-TOF-MS | / | [243] |
| Aqueous extracts from different types of soil | EMPA, iPrMPA, PMPA | SPE with 3 On-Guard cartridges (Ba/Ag/H) | 1.5 g | n.g | CE/UV | 166-333 ng g ^{-1*} (a) | [255] |
| Different soil types | EMPA, iPrMPA, PMPA | SPE (SCX) + derivatization | 2g | > 1 hour | GC/MS in scan mode | 120-180 ng g ^{-1*} | [254] |

| | | | | | | | |
|---|---------------------------------------|---|--------|--|-----------------------|--|-----------------|
| Soil | EMPA, iBMPA, PMPA | SPE (MIP) | 10 g | > 1 hour | IC/conductimetry | / | [134] |
| Aqueous extracts from different types of soil | EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | Off-line SCX SPE (Ba/Ag/H) + On-line SPE (zirconium) | 1 g | > 15 min | LC-ESI-MS (scan) | 0.15–1.5 ng g ^{-1**} (a) | [50] |
| Aqueous extracts from park soil | iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | PALME | 1.95 g | 37.5 sec (120 min for 96*2 samples) | LC-ESI-MS/MS (MRM) | 0.016- 0.515 ng g ^{-1 **} (a) | Actual study |

n.g: not given

a: Calculated assuming 100% soil extraction recovery of AMPA's into the aqueous phase

35F: 1-(diazomethyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzene; NCI: negative Chemical ionization; SIM: single ion monitoring; EIC: extracted ion mode; MRM: multiple reaction monitoring, PGC: porous graphitic carbon; IC: ion chromatography; SCX: strong cation exchange .

If the power of PALME to filter the phospholipids from human plasma was already demonstrated [216], we succeed to apply this technique on aqueous soil extracts without any pretreatment such as the use of expensive syringe filters. Moreover, the centrifugation step could be abandoned in favor of simple decantation. The chromatograms, obtained after the PALME-LC-MS/MS for a spiked aqueous soil extract (V:V/1:1), are presented in Figure 40 (TIC and MRM signals of each analyte). The resultant acceptor phase obtained after PALME was sufficiently cleaned for a direct injection in LC-MS, thus allowing the quantification of the studied AMPAs at low concentrations.

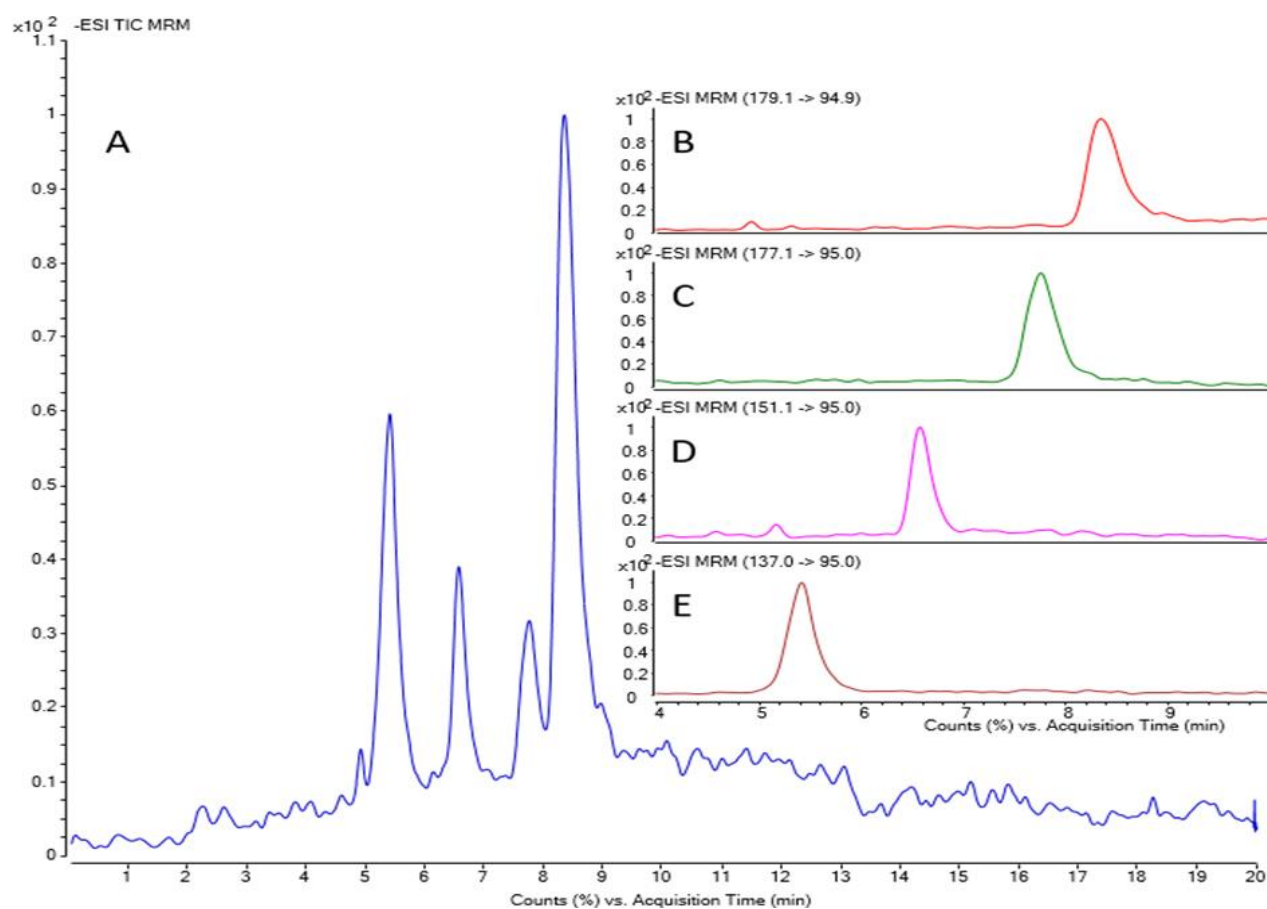


Figure 40 : Chromatogram of the target analytes obtained after from the application of PALME to aqueous soil extracts 1:1 (V/W) spiked at low concentrations ($[PMPA] = 0.05 \text{ ng mL}^{-1}$, $[CMPA] = 0.05 \text{ ng mL}^{-1}$, $[iBMPA] = 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[iPrMPA] = 1 \text{ ng mL}^{-1}$) and analysis by LC-MS/MS in negative ionization mode: (A) TIC of MRM transitions and MRM mode for (B) PMPA ($m/z 179.1 \rightarrow 94.9$), (C) CMPA ($m/z 177.1 \rightarrow 95.0$), (D) iBMPA ($m/z 151.1 \rightarrow 95.0$), (E) iPrMPA ($m/z 137.0 \rightarrow 95.0$). Extraction conditions: see Figure 39.

III.3.4. Conclusion

This study highlights the potential of PALME as a preconcentration technique for the analysis of polar acidic compounds such as AMPAs. We demonstrated that it could be a serious alternative of HF-LPME by overcoming the major drawbacks of the latter. The workflow is simple and the availability of the 96-well plate technology facilitates its automation and thus its implementation in routine laboratories. Furthermore, this work has shown the possibility of easy transfer the extraction conditions of a HF-LPME method to PALME which could open the door to an easy development of many applications with PALME from the extensive HF-LMPE data available in the literature.

Three major limitations described by the PALME inventors have been overcome: (i) EFs that can be higher than 5 (ii) including for polar compounds [210] while using commercially available plates without the need to change the membrane material or use a complex mixture of organic solvents to optimize the chemical composition of the SLM [217].

We also showed the potential of PALME as a cheap green analytical high-throughput sample preparation technique for environmental applications, since only 768 μL (<1mL) of organic solvent was used to treat 192 samples in 120 minutes (equivalent to 37.5 sec/sample) with a cost that does not exceed 0.2 € per sample. In addition, the excellent sample clean-up of the technique was revealed since the acceptor phases obtained after the PALME of the aqueous soil extracts were clean and this without passing them in filter syringes as it is required for many other techniques. Thus, reducing also the workflow for this type of samples. This technique should therefore enable response laboratories to better manage the large number of samples expected in the event of a large-scale nerve agent exposure.

Acknowledgment: The authors thank the French Defense Procurement Agency (DGA) for providing the non-commercially available AMPAs compounds for the study.

CHAPITRE IV

Développement d'une méthode de microextraction liquide-liquide assistée par membrane et parallélisée basée sur une nouvelle classe de solvants émergents verts des produits de dégradation d'armes chimiques dans les urines

Comme illustré par le précédent chapitre, la PALME a été développée pour l'extraction des AMPA à partir d'échantillons environnementaux. Cette méthode s'est avérée simple, robuste, pratique et sensible. Elle a permis un traitement d'échantillon à haut débit qui pourrait aider les laboratoires actifs dans le domaine des analyses des produits liés à la convention d'interdiction des armes chimiques à traiter le nombre important d'échantillons associés à l'utilisation d'agents neurotoxiques à grande échelle. La méthode développée peut être aussi utilisée pour la surveillance environnementale. Cependant, il apparaît également intéressant de l'appliquer à des échantillons biologiques. En effet, lors d'une opération militaire ou d'actes terroristes impliquant l'utilisation des OPNAs, un grand nombre de personnes peut être exposé. Ceci implique la nécessité de disposer de méthodes fiables et simples adapter à l'analyse de fluides biologiques à utiliser sur le site de l'incident pour permettre non seulement la détermination de l'agent d'exposition spécifique utilisé mais aussi d'estimer le taux d'exposition des victimes à ces agents et de prescrire des traitements adaptés aux agents détectés. De plus, la rapidité de ces méthodes pourrait aider le chargé des opérations de secours à faire la distinction entre les personnes exposées et les personnes souffrant d'une attaque de panique sur les lieux de l'incident et réduire ainsi le flux important de personnes réclamant des soins à des structures médicales limitées en terme de capacité de prise en charge.

A ce titre, un type de matrice biologique doit être sélectionné parmi plusieurs et l'urine semble la matrice parfaitement adaptée au contexte. En effet, les OPNA se métabolisent rapidement dans les urines durant les premières heures après l'exposition. Par ailleurs, cette matrice à l'avantage d'être collectée d'une manière non-invasive et elle est aussi la moins complexe à traiter comparée aux autres matrices biologiques (sang, plasma...). De plus, des volumes relativement importants peuvent facilement être obtenus sans trop poser de risques en termes d'hygiène et sécurité pour les opérateurs. Ces quantités d'urine récupérées sont ainsi compatible avec le système PALME proposé précédemment qui permet de traiter jusqu'à 2 ml d'échantillon.

A cet effet, la PALME telle que développée pour l'extraction des AMPA à partir des eaux environnementales a été directement appliquée sur les urines en se basant les conditions préalablement optimisées pour les matrices environnementales qui étaient similaires à celles appliquées en HF-LPME sur les urines [87]. Cependant, après avoir constaté une diminution des taux d'extraction des composés ciblés dans cette nouvelle matrice, une réévaluation de la nature de la membrane liquide a été faite par l'ajout d'un nouvel additif au solvant organique (octanol).

En parallèle, l'intérêt sociétal grandissant pour le développement durable et la chimie verte nous a conduit à développer une étape de traitement en respectant au mieux les 10 principes du « traitement de l'échantillon vert ».

En effet, les solvants organiques traditionnels sont généralement des composés organiques volatils (COV). Leur utilisation constitue une préoccupation majeure, puisqu'un grand nombre d'entre eux sont associés à des effets nocifs, tant pour la santé et la sécurité des opérateurs que pour l'environnement et la santé de la population générale. C'est pourquoi de nombreuses réglementations environnementales incitent de plus en plus à utiliser des solvants de substitution. C'est dans ce contexte que sont apparus divers solvants, qualifiés de verts, écologiques, biodégradables ou durables, et présentés comme une alternative aux solvants organiques usuels. Parmi ces solvants, on peut citer les liquides ioniques (IL) et les solvants eutectiques profonds (DES).

En effet, les liquides ioniques sont connus pour leur stabilité thermique et chimique élevée et leur pression de vapeur négligeable. Par ailleurs, ils peuvent être adaptés à des applications très spécifiques ("solvants de conception") et ce grâce au choix de la structure et du type d'ions de construction qui influence grandement leurs propriétés physicochimiques. Plus d'un milliard de IL peuvent être synthétisés. En parallèle, les « solvants eutectiques profonds » (DES) sont une nouvelle classe de solvants qui partagent avec les IL certaines propriétés mais qui sont suffisamment différents pour être considérés comme une classe de solvant différente. De plus, leur préparation est moins chère et plus facile. Ils sont synthétisés par la combinaison d'un accepteur de liaison H solide (HBA) et d'un donneur de liaison H (HBD), ce qui donne une substance avec un point de fusion inférieur à celui des précurseurs individuels (voir Figure 41).

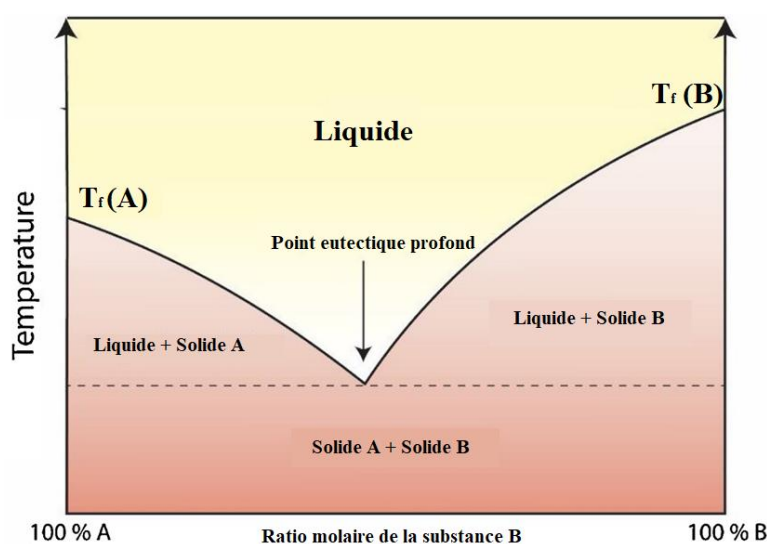


Figure 41 : Représentation illustrative d'un diagramme de phase d'un solvant eutectique profond (DES) à deux composants. Représentation illustrative d'un diagramme de phase d'un solvant eutectique profond (DES) à deux composants.

Les DES sont aussi considérés comme plus respectueux de l'environnement que les IL, et ils peuvent également être biocompatibles. Cet aspect est particulièrement marqué pour les DES naturels (NaDES), qui sont fabriqués à partir de précurseurs naturels tels que les acides aminés, les sucres, les acides organiques ou les dérivés de la choline. Les DES présentent un potentiel évident pour les sciences analytiques, et leurs propriétés liées aux solvants peuvent être exploitées pour le traitement des échantillons surtout après l'apparition des DES hydrophobes (HDES)[257][258]. En effet, les applications des DES et notamment les HDES est un domaine de recherche très actif ces dernières années tel que le montre la Figure 42 avec une montée exponentielle du nombre de travaux liée à cette classe de solvants depuis 2017.

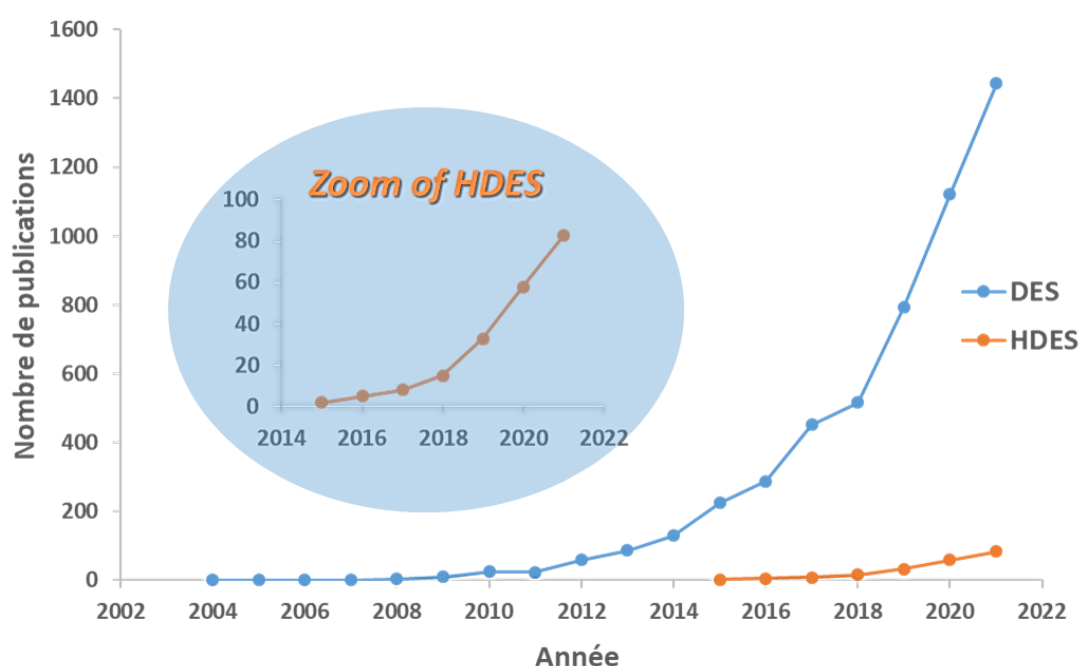


Figure 42 : Nombre d'articles publiés entre 2004 et 2021 sur les solvants eutectiques profonds hydrophobes - basés sur la base de données Scopus (mots-clés recherchés : solvants eutectiques profonds et solvants eutectiques profonds hydrophobes ; consultés le 01.03.2022).

Ces solvants émergents présentent ainsi plusieurs avantages comme : (a) une durabilité environnementale améliorée, (b) une toxicité réduite, (c) une sélectivité plus élevée et (d) une compatibilité avec les instruments analytiques. C'est pourquoi ces solvants ont été étudiés lors de ces travaux dans le but de remplacer l'octanol en PALME. L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans Talanta présentée ci-après.

IV.1. Determination of nerve agent biomarkers in human urine by a natural hydrophobic deep eutectic solvent-parallel artificial liquid membrane extraction technique

Cette partie se présente sous la forme d'un article paru en ligne, le 18 juin 2022 [259]

Talanta 249 (2022) 123704



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

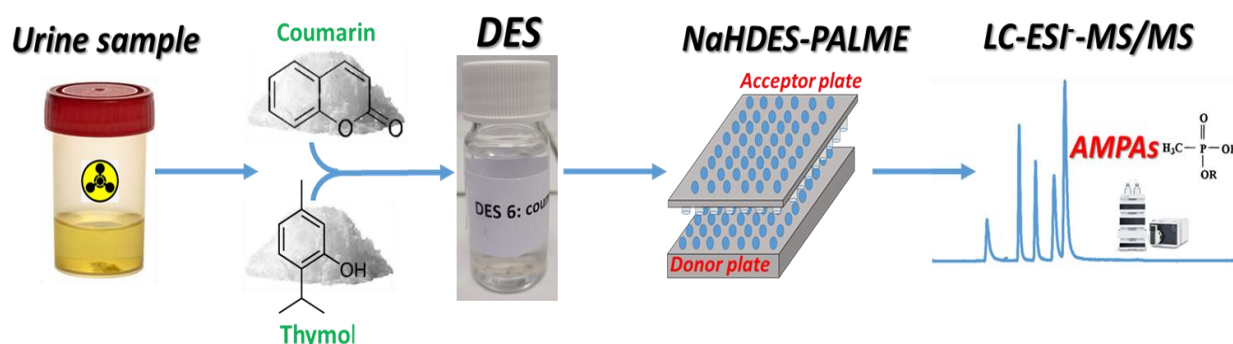


Determination of nerve agent biomarkers in human urine by a natural hydrophobic deep eutectic solvent-parallel artificial liquid membrane extraction technique

Khirreddine Bouchouareb^a, Audrey Combès^a, Valérie Pichon^{a,b,*}

^a Department of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization, Chemistry, Biology and Innovation (CBI) UMR 8231, ESPCI Paris PSL, CNRS, PSL Research University, Paris, France

^b Sorbonne Université, Campus UPMC, Paris, France



Abstract:

Alkyl methyl phosphonic acids (AMPAs) are the major metabolites of organophosphorus nerve agents. A method based on the use of natural hydrophobic deep eutectic solvents as supported liquid membrane in parallel artificial liquid microextraction (PALME) combined with LC-MS/MS analysis was developed and applied to their extraction from urine samples.

PALME is a miniaturized liquid-phase extraction method performed in a multiwell plate format where the aqueous sample and the aqueous acceptor phase are separated by a flat membrane impregnated with an organic solvent. In this study, we investigated the possibility of replacing the harmful conventional organic solvent by an emerging green solvent, a coumarin /thymol-based deep

eutectic solvent, in order to raise the greenness of the sample preparation method.

Linear response was obtained in an interval of 0.5, 5 or 10 to 100 ng/ml depending on the AMPAs with a determination coefficients (R^2 s) ranging from 0.9751 to 0.9989 for their determination in not treated urine samples. Enrichment factors (EFs) up to 12.65 were obtained, and repeatability was within 8.90–16.28 % RSD (n=12). The limit of quantifications (LOQs: $S/N \geq 10$) of the whole analytical procedure were in the range from 0.04 to 5.35 ng/ml. In addition to its good sensitivity, the presented method permitted the treatment of 192 samples in 120 minutes (equivalent to 37.5 s/sample), which places it as one of the most powerful preparation techniques for biomonitoring of civilian or military people exposed to nerve agents in case of public health emergency. Indeed, the developed procedure combined sensitivity, high-throughput, greenness, simplicity and practicality for the determination of five acidic polar AMPAs in urine samples.

IV.1.1. Introduction

Various chemicals have been used as chemical warfare agents (CWAs), however the organophosphorus nerve agents including G-agents and V-agents, such as GB, GD, GF, VX and RVX are among the most toxic of all the chemical weapons. As they have already been employed on the battlefield and in terrorist attacks, they get special attention and become the prime target for verification analysis of CWAs. Indeed, following a deliberate or accidental nerve agent release, hundreds or thousands of people could be contaminated. Prior to their evacuation, biomedical samples must be collected and a screening analysis needs to be performed to identify the victims by confirming their exposure from people experiencing a panic attack. Moreover, the determination of the level of exposure is crucial for the assessment of public health risks and appropriate medical treatment. This highlights the need for rapid, sensitive and accurate identification methods for diagnosing nerve agent exposure on site. Having rapid methods for detecting nerve agents also meets the safety and health protection requirements of military personnel working on site. [260][96].

However, it is usually problematic to identify these substances in their intact form because of their rapid hydrolysis in the human body, forming the alkyl methylphosphonic acids (AMPAs): pinacolyl- (PMPA), isopropyl- (iPrMPA), cyclohexyl- (CMPA), ethyl- (EMPA) and isobutyl- (iBMPA) methylphosphonic acid, which are the agent-specific metabolites of the nerve agents soman, sarin, cyclohexyl-sarin, VX, and Russian- VX respectively (structure and physicochemical properties of these compounds are reported in (Table.S5, annex 4). Generally, contaminated biological samples such as blood, tissues and hair are complicated to analyze and are best analyzed in retrospective studies [234]. In contrast, urine samples have the advantage of being easily collected non-invasively, less hazardous to handle, and offer the analyst a cleaner biological matrix for analysis than plasma or serum, which

contain huge amounts of proteins. In addition, urine is rich in AMPAs in the first 48 hours of post-exposure since they are rapidly excreted in urine because of their high polarity[122][40]. All these elements make urine a matrix of choice for the analysis of AMPAs.

Numerous methods have thus been reported in the literature for the determination of AMPAs in urine. Their separation was often performed after derivatization by gas chromatography (GC) or directly by liquid chromatography (LC) [61]. Either hydrophilic interaction chromatography (HILIC) or reversed phase (RP) liquid chromatography was used in combination of tandem or high resolution mass spectrometry [58].

In order to achieve their rapid determination, the dilute and shoot (DAS) approach was adopted especially when the concentration levels of target analytes are relatively high [96][97]. However, it has led to many chromatographic problems such as a considerable reduction in column lifetime and clogging of the ionization source and the injector of the LC-MS systems [261]. Due to the relative complexity of such matrices, effective sample pretreatment method is vital for trace-level analysis. For this, the traditional liquid-liquid extraction was applied at many occasions but its required a preliminary derivatization step to favor the transfer of AMPAs in the organic solvent[262][263][264]. However, solid phase extraction (SPE) remains the most commonly performed sample preparation for this type of samples [40]. It consists in the use of the reversed phase mechanism by promoting the binding of the neutralized AMPAs to C2, C8, C18, or polymeric sorbents after the acidification of the sample [40]. However, these techniques still have limitations, such as requirement of large amounts of organic solvent and the relatively high price of the SPE cartridges [131][224] and is laborious and time-consuming in manual mode [265]. To address these limitations, other extraction techniques were proposed like the hollow-fiber liquid-phase microextraction (HFLPME) which is a cheaper method besides being a much greener method compared to SPE [266]. This miniaturized liquid-phase extraction method is based on supported liquid membrane (SLM) principle, where the organic solvent is immobilized in the porous wall of a hollow fiber [224]. This technique was successfully applied for the extraction of AMPAs from urine samples in its two- [196] and three-phase version [87]. However, this method suffers from being performed sequentially for each sample and the lack of commercially available equipment hinder their integration in high-throughput bio-analytical analysis for routine laboratories, which is in ever-increasing demand [224].

Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME) was introduced in 2013 as the improvement of the conventional HF-LPME technique, based on a 96-filter plate instead of single-used hollow fibers [190]. The PALME set-up is illustrated in Figure 53 in annex 4. Similar to HF-LPME, PALME is based on a passive and one-way extraction principle but with a different geometry [224]. The two

techniques are based on a supported liquid-membrane which plays a dual role by acting (i) as a chemical barrier (thanks to the organic solvent towards which the analytes must present a minimum of affinity) and (ii) a physical barrier (the small size of the pores of the membrane preventing large molecules and particles for penetrating) [224]. This greatly reduces the risk for matrix effects in LC-MS which has been proven at many occasions for extraction of compounds with various physicochemical properties from plasma [216][215], blood [267] and recently from breast milk [268] and urine [269]. The use of disposable porous polymeric membranes in the filter plates of PALME permits to pre-concentrate analytes and clean-up the sample in one step [217] and excludes the risk of cross-contamination. Furthermore, the PALME method can provide some advantages such as high enrichment factors, low cost, high repeatability and sensitivity, and rapid sample processing [224][232].

In addition to the demand for high throughput methods, the development of more environmentally friendly analytical methodologies is now a necessity. A PALME method was recently evaluated for its environmental friendliness according to the 12 principles of Green Analytical Chemistry and obtained an excellent Eco-Scale score of 78/100–penalty points [267]. This good score mainly results from the miniaturized format of the technique which reduces the volume of hazardous solvents used to a few microliters instead of the several milliliters in LLE [224]. To further improve the environmental friendliness of the analytical methods, the adoption of the 2nd and 3rd principles of green sample preparation which consists of the use of a new class of sustainable, reusable and renewable solvents, such as ionic liquids (ILs) and deep eutectic solvents (DESs) [111] could also be considered.

ILs are unique class of non-molecular solvents that are generally composed of large asymmetric organic cations and various anions. They offer the possibility to define their physicochemical properties by an adequate selection of its constituents. Indeed, compared to conventional solvents, they may have many discernible superiorities such as low volatility, long-term thermal and chemical stability, low flammability, tunable viscosity and good dissolving capacity for different classes of compounds [270]. In addition, they are considered to be environmentally friendly solvents to both operator and environment, and were therefore applied as great substitutes for traditional organic solvents used for extraction and to obtain stable SLMs [271]. Since their integration as solvents in liquid phase microextraction (LPME) by Liu *et al*, in 2003 [272] they were used in many different variants of LPME for extracting compounds with a wide range of polarity from environmental, forensic, food, or biological samples [273]. Thus, ILs have also been used in HF-LPME applications in many occasions [274] and due to their high polarity, they have been shown to have a high affinity for polar compounds, following the principle of “like dissolve like” [275]. However, to the best of our

knowledge, no studies have investigated the use of ILs as SLMs in PALME.

More recently, deep eutectic solvents (DESs) have emerged as promising alternatives to ILs due to similar properties. DESs are obtained by mixing a hydrogen bond acceptor molecule and a hydrogen bond donor molecule, and exhibit a melting point significantly lower than that of each individual components [276]. Like ILs, DESs have found applications in a broad range of microextraction techniques [276][277][278]. However, up to now, only few papers have been published on DES-based HF-LPME applications for the extraction of different classes of compounds [279][280][281][282][283][284]. This could be related to the fact that almost all the reported DESs before 2015 were hydrophilic [278], which excluded their use for the extraction of compounds from aqueous samples. Another sub-class of DESs named natural hydrophobic deep eutectic solvents (NaHDESs) composed of natural molecules was introduced by Florindo *et al*, in 2017 [285]. They were recently used as extraction solvent in hollow fiber-microporous membrane liquid-liquid microextraction coupled to a 96-well plate system for the determination of eleven non-polar acidic and basic emerging contaminants belonging to different families in tap and stream water samples [286].

The main goal of this study was the development of an effective sample preparation method for the determination of AMPAs in urine, in terms of simplicity of operation, rapidity, accuracy and especially high throughput and greenness of the method. In a previous study from our group [232], a PALME method was optimized and efficiently applied for the extraction of AMPAs from environmental waters and diluted aqueous soil extracts. Here, we investigated the possibility of direct application of PALME for the extraction of AMPAs from human urine without any pretreatment. The optimization of the supported liquid membrane (SLM) was studied by testing different membrane materials (polypropylene: PP and polyvinylidene fluoride: PVDF) and by testing an additive in SLM. As a miniaturized extraction technique, PALME was already consider as a green extraction method, however to make it greener, a special attention was given to the replacement of octanol which is the conventional solvent in SLM-based methods of AMPAs [87][232][86] by emerging green solvents. Thus, different emerging green solvents like ion liquids (ILs) and deep eutectic solvents (DES) were screened to replace the harmful organic solvent. For the first time, this type of emerging green solvents was used for the extraction of chemical weapon convention related chemicals. The best conditions of extraction defined in pure media were then applied to untreated urine samples for the determination of AMPAs at the trace level.

IV.1.2. Experimental

IV.1.2.1. Chemicals and reagents

CMPA (96%), iPrMPA (99%), and iBMPA (99%) were synthesized in DGA CBRN Defense (Vert-le-Petit, France). PMPA (97%), EMPA (98%), sodium chloride (NaCl, 99%), coumarin (99%), thymol (98.5%), camphor (96%), DL-menthol (95%), dodecanoic acid (98%), 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide (EMIIIm, 98%), 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF₆], 97%), n-octanol (99%) and trioctylamine (98%) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). High purity water was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France, 18.2 M Ω). Acetonitrile (ACN) was provided by VWR (Fontenay-sous-bois, France). Hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and they were employed to adjust the pH in the water or urine samples and acceptor solutions, respectively. All reagents and solvents used were of analytical grade.

The human urine samples collected from a healthy volunteer were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in disposable polyethylene containers. Before use, the urine was thawed to room temperature. The pH value of the urine sample was adjusted to 1.0 with some microliters (droplets) of neat hydrochloric acid (32%) and measured by a model Seven Easy pH meter (METTLER TOLEDO, USA).

IV.1.2.2. Preparation of natural hydrophobic deep eutectic solvents

Six different DESs were in-house prepared by weighting appropriate amounts of each component in a round-bottom flask. The amounts were adjusted to get the desired molar ratio of components. After weighing, the mixture was constantly stirred at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in oil bath until a homogeneous clear liquid was formed. The composition of the prepared DESs is described in Table 12.

Table 12: List of the synthesized NaHDESs tested as a SLM in this study

| Name | Composition | | Molar ratio |
|-------|---|--------------------------------------|-------------|
| | Component 1 (hydrogen bond acceptor) | Component 2 (hydrogen bond donor) | |
| DES 1 | coumarin | thymol | 1:1 |
| DES 2 | DI-menthol | thymol | 1:1 |
| DES 3 | camphor | thymol | 1:1 |
| DES 4 | camphor | DI-menthol | 1:1 |
| DES 5 | heptanoic acid | thymol | 1:1 |
| DES 6 | coumarin | thymol | 1:2 |

IV.1.2.3. PALME procedure

PALME was accomplished as described in our previous study [232] using a 96-well plate of polypropylene (PP) with 0.5 ml wells from Nunc (Roskilde, Denmark) or 96-well deep-well collection plates (Millipore, Germany) with 2.2 ml wells as donor plate depending the experiments, and a MAIPNTR10 96-well MultiScreen-IP Filter Plate with 0.45 μm porous, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Ireland) as an acceptor plate with a maximum working volume of 250 μL . The internal diameter of each well was 6 mm. The set-up used in the experiments is shown in (Figure 53 in annex 4).

In some experiments, the PVDF membrane was removed from the filter plate to be replaced by a porous polypropylene membrane with a 100 μm thickness and pore size of 0.1 μm (Accurel PP 1E R/P, Membrana, Wuppertal, Germany). A lid was used to avoid potential losses of the acceptor solution by evaporation during extraction.

The extraction procedure was performed as follows. First, the pH of the sample was adjusted to 1 using a few drops of HCl (32%). Then, 30% NaCl (w/v) was added to the acidified sample. Sample aliquots of 350 μL or 1950 μL were pipetted into the 96-well donor plate (0.5 ml wells or 2.2 ml wells depending on the experiments, respectively). The SLMs were formed by pipetting 4 μL of octanol with or without trioctylamine, ILs or DESs into each porous membrane in the acceptor plate. Then, the acceptor wells were filled with 50 μL of NaOH 1M (acceptor solution) by a pipette. The latter was sealed with Thermowell™ sealing tape. Finally, the entire assembly was clamped (squeezed) and fixed by

tape.

The whole assembly was agitated and heated on a microplate shaker with 2-place platform (PHMP Grant-Bio, Riga, Latvia) at 1000 rpm for 120 minutes. After PALME, the acceptor solutions were collected using a micropipette and 40 μl of the recovered solutions were then neutralized by an HCl solution to be compatible with the developed LC–MS/MS analysis. Indeed, the injection of high alkaline solutions in the RPLC column could seriously damage it, this step was thus performed to inject solutions at neutral pH.

IV.1.2.4. LC-MS/MS instrumentation and analytical conditions

The chromatographic separation of AMPAs was performed using an Atlantis dC18 column (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm). The chromatographic system consisted of an LC-MS/MS Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to an Ultivo triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies). Data acquisition and processing were carried out using Mass Hunter software (Version 10.0). 2 μL of samples were injected into the instrument using an autosampler. The mobile phase was composed of a mixture of deionized water (A) and acetonitrile (B) acidified with 0.1% of formic acid, with a flow rate of 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. A gradient composed of 100% A to 90% B during 10 min was used for the AMPAs separation. Then, this mobile phase composition was kept constant for 1 min before returning to the starting conditions to equilibrate the column.

The MS system was operated with an electrospray ionization source (ESI) in the negative ion mode. The parameters of the ESI source were as follows: drying gas (N_2) flow rate, 8.0 L min^{-1} ; drying gas temperature, 350 $^\circ\text{C}$; nebulizing gas pressure, 30 psi. The MRM transitions and the corresponding parameters used for each AMPA are detailed in the Table.S6, annex 4.

The limits of quantification (LOQ) which correspond to the concentration of analyte producing chromatographic peak on the MRM chromatogram with a signal-to-noise (S/N) ratio of 10, after sample treatment, were calculated on the basis of the S/N ratios obtained by applying both PALME-LC–MS/MS or NaHDES-PALME-LC–MS/MS to the urine samples spiked by PMPA, CMPA and iBMPA at 0.5 ng/ml; iPrMPA at 5 ng/ml and EMPA at 10 ng/ml.

IV.1.3. Results and discussion

IV.1.3.1. Preliminary evaluation of PALME on urine samples

In our previous work, a PALME method was developed for the extraction of AMPAs from real water samples and aqueous soil extracts. The optimized extraction conditions consist of the use of a

PVDF membrane with 4 μ l n-octanol, of setting pH values of the donor ($V_d = 1950 \mu$ l) and of the acceptor phase ($V_a = 50 \mu$ l) at 1 and 14 respectively. The extraction time was set at 120 min and at 40 °C, the agitation speed at 1000 rpm and 30% NaCl was added in the donor phase [232]. Those conditions were very close to those fixed in HF-LPME for the extraction of AMPAs, thus highlighting the possibility of a direct transfer of the HF-LPME operational conditions to PALME, without the need of a new optimization study, and vice versa [232]. As Desoubries *et al*, [87] applied the same HF-LPME conditions for the effective extraction of AMPAs from both environmental waters and urine samples, we first decided to apply the previously developed PALME method for environmental waters to acidified urine samples without further optimization.

The urine samples spiked at of 100 ng/ml with each AMPAs were submitted to PALME and the enrichment factors (EFs) obtained, that correspond to the product of the recovery of extraction with the ratio between the sample volume and the acceptor volume, are reported in Figure 43. The EF's increased with the hydrophobicity of the AMPAs (EFs range from 1 for EMPA to 11.7 for PMPA). However, these EFs are remained 2.9 to 4.6 times lower than those obtained in the same conditions of extraction in pure water (EFs ranged from 2.9 to 41.1 respectively) [232]. The matrix effects therefore seem to affect the EFs that nevertheless remain acceptable (≥ 1). The less polar AMPAs were found to be the more impacted by the matrix effect than the most polar AMPAs. The same remark was observed when HF-LMPE was applied for the extraction of AMPAs from urine compared to their extraction from water [87]. A totally opposite remark was observed in our previous work for the extraction of AMPAs from aqueous soils where the less polar compounds were the less impacted by matrix effects [232].

In order to enhance the EFs, the optimization of the SLM was performed by first investigating the membrane material. Indeed, many studies involving PALME were accomplished using PP membrane instead of the more classical PVDF membrane, especially for biological samples [190][216][217][212]. Moreover, the previous reported HF-LPME system for the extraction of AMPAs from urine was built using PP fibers. Therefore, the effect on EFs of replacing the PVDF Immobilon®-P membrane by the Accurel PP 1E (R/P) membrane was studied. The physical characteristics of the two membranes are given in (Table.S7, annex 4).

As shown in Figure 43, for all the targeted analytes, EF's obtained for the PP Accurel PP 1E (R/P) were lower (decrease of 20 to 30%) than those obtained for PVDF Immobilon®-P. These lower EFs using the PP membrane could be due to the physicochemical nature of the membranes and its affinity for octanol. The PVDF filter plates were selected for the next experiments since it leads the highest EFs. They also present the advantage of being commercially available unlike PP filter plates,

making it easier to implement PALME.

To improve the extraction recoveries of relatively polar compounds that are difficult to extract, Vardal *et al*, [215] reported that the addition of 1% trioctylamine in the organic solvent was beneficial to avoid the non-specific binding of the analytes to the PVDF membrane. However the effect of trioctylamine was found to be analyte dependent [215][269]. Based on these works, the addition of 1% trioctylamine to n-octanol was evaluated in this study. As illustrated in Figure 43, this addition doesn't lead to a statistically significant improvement of EFs for all the AMPAs tested (Student's t-test, p value > 0.05). If this method is effective since a cleanup, extraction and preconcentration in one step were performed on 192 samples in parallel. Moreover, the technique is attractive because it consumes little solvent, we have nevertheless sought to replace octanol by a less toxic solvent to move towards a more environmentally friendly method.

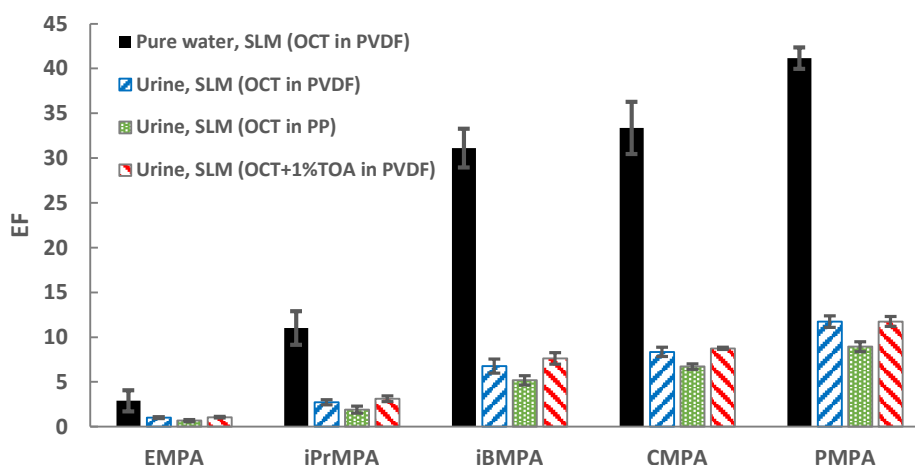


Figure 43 : EFs obtained after PALME of AMPAs from pure water (results obtained previously in [232]) and urine samples spiked at 100 ng/ml (n = 3). Extraction conditions: donor phase: urine at pH 1, Vd = 1950 μ l, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, Va = 50 μ l; 4 μ l of solvent octanol (OCT) with or without trioctylamine (TOA) in PP (or PVDF) membrane; extraction time: 120 min; T_{ext} = 40°C; agitation rate: 1000 rpm.

IV.1.3.2. Selection of the green solvent for the supported liquid membrane

According to the physicochemical proprieties of the targeted analytes, several solvents were considered, including NaHDES and ILs. Choosing ILs to test among more than 10¹⁸ [274] is not an easy task, especially because it doesn't exist rules or methods facilitating this choice. But it remains the possibility of opting for solvents that have already proven their efficiency in extracting compounds with similar physico-chemicals properties. Indeed, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [BMIM][PF6] and 1-ethyl-3-methylimidazoliumbis(trifluoromethylsulfonyl)imide (EMIM) were already used as emerging solvents in hollow fiber-supported ionic liquid based three-phase liquid-liquid-liquid solvent bar microextraction of the acidic phenols from seawater samples [287]. Therefore, they were

both applied as SLM to the extraction of AMPAs and EFs were compared to those obtained using *n*-octanol. Furthermore, a recent study highlighted the use of NaHDES composed of camphor and menthol (1:1) as solvent in a SLM-based microfluidic device for the exhaustive extraction of polar and non-polar acids from urine [288]. The authors demonstrated that this DES can extract compounds in a large range of log P (from 0.5 to 3.6). Moreover, the group of S. Pedersen-Bjergaard recently reported that DES based on binary mixtures of coumarin, thymol, camphor and menthol were highly efficient in electromembrane extraction (EME). Indeed, mixtures of coumarin and thymol provided exhaustive or near-exhaustive extraction of a wide range of compounds including non-polar bases, non-polar acids, and polar bases. The authors claimed the universality of these solvents which are highly aromatic, very strong hydrogen bonding donor, and moderately strong hydrogen bonding acceptor [246]. Moreover, it was recently reported that NaHDES based on thymol and fatty acids (heptanoic, octanoic, nonanoic, and decanoic acids) exhibited good extraction efficiency for four acidic polar antibiotics from surface water using the shaker-assisted liquid-liquid microextraction technique [289]. Therefore, a selection of five NaHDES, whose preparation is described in section 2.2, was performed (DES 1 to DES 5) All the five formed DES were based on thymol and DI-menthol as hydrogen bond donor while coumarin and camphor were hydrogen bond acceptors, except DES 2 which is prepared based on DI-menthol as hydrogen bond acceptor. Indeed, in non-ionic hydrophobic DES (HDES), it is difficult to differentiate between hydrogen bond acceptors and hydrogen bond donors. Generally, DI-menthol is hydrogen bond donor but it's considered as hydrogen bond acceptor while thymol is defined as hydrogen bond donor [278][290].

The EFs obtained using these emerging solvents, the five DESs (DES 1 to DES 5) and the two ILs (EMIM and [BMIM][PF6]), are reported in Figure 44 and were compared with those obtained using *n*-octanol. Since the aim of these experiments was the quick screening of a potential emerging solvent candidate to replace 1-octanol, PALME was applied to spiked pure water sample using a donor plates with 0.5 ml wells instead of 2.2 ml adapted to a donor volume of 350 μ L instead of 1950 μ L to shorten the extraction time that was set at 30 minutes. The use of ILs gives rise to lower EFs for AMPAs than 1-octanol (Figure 44). Indeed, the EF's decreased for about 82 to 98% when using [BMIM][PF6] as SLM. While the use of EMIM gave a limited extraction recovery for the very polar AMPAs. It was therefore decided not to apply them to real samples. In the same way, the EFs obtained for the five tested DES are lower than those obtained with 1-octanol with larger error bars except for DES1 composed of coumarin and thymol (1:1). This DES gives rise to slightly higher EFs compared to octanol for the extraction of the very polar targeted compounds (EMPA and iPrMPA) and EFs close to those obtained with 1-octanol for the less polar ones (PMPA, CMPA and iBMPA).

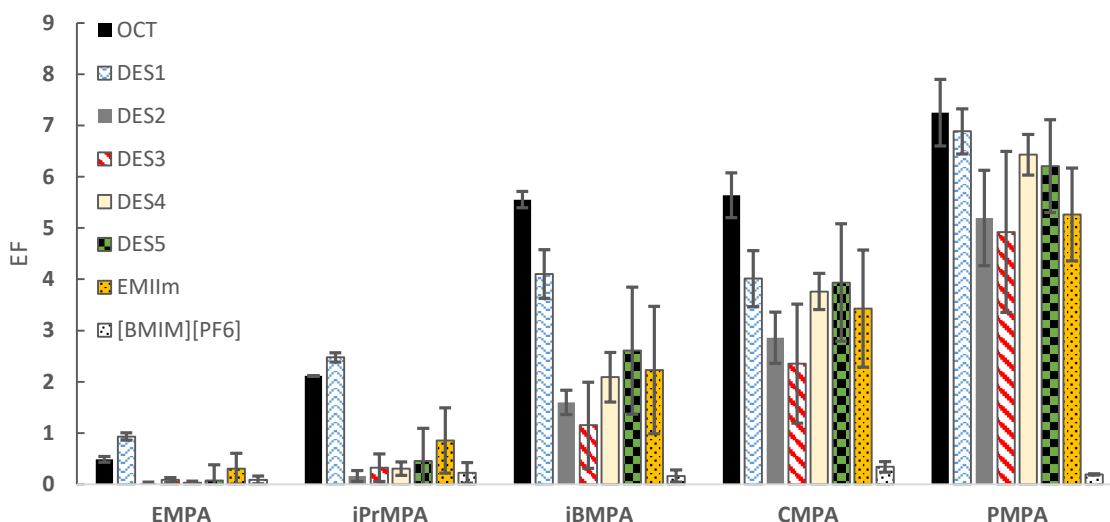


Figure 44 : Effect of the type of solvent on EFs of 100 ng/ml of AMPAs from spiked pure water sample by PALME ($n = 3$). Extraction conditions: donor phase: urine at pH = 1, $V_d = 350 \mu\text{l}$, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, $V_a = 50 \mu\text{l}$; 4 μl of solvent; extraction time: 30 min; $T_{\text{ext}} = 40^\circ\text{C}$; agitation rate: 1000 rpm. Composition of DESs: see Table 12.

According to the results obtained using DES 1, a DES composed of coumarin and thymol with a ratio of 1:2 instead of 1:1, named DES 6, was also evaluated because of the stronger hydrogen bond donor property of thymol compared to thymol that could better matched with the hydrogen bond acceptor groups of AMPAs. Indeed, in our previous study [232], 1-octanol was found to have the highest affinity for AMPAs (polar acidic compounds) compared to several other conventional organic solvents, which was explained by the greater hydrogen bond donor property of 1-octanol which is more suitable for the hydrogen bond acceptor property of AMPAs. Moreover, DESs rich in thymol are proven to be stable [246]. Indeed, by comparing coumarin- and thymol-based DESs prepared with different molar ratios it was shown that a mixture of coumarin and thymol with molar ratio of 1:2 generates less leakage than that obtained with a molar ratio of 1:1. Moreover, the leakage of this NaHDES was of the same level as that observed for 1-octanol in SLM [246].

DES 6 was then applied to the PALME of AMPAs from urine under the conditions already applied in Figure 43 (2.2 ml plate for $V_d = 1950 \mu\text{l}$ and 120 min of extraction time) that guarantee the highest EFs. Those conditions were also applied using 1-octanol and DES 1. The obtained results reported in Figure 45 clearly point out that the two tested NaHDES are as efficient as n-octanol. Thanks

to its greater stability [246], DES 6 was preferred to DES 1. Moreover, the application of Student's t-test between the obtained results of DES 6 and 1-octanol showed no significant difference with a setting level at 0.05. This proof the possibility of replacing 1-octanol by DES 6, a greener solvent, while keeping the same analytical performances. Additionally, we checked if using PP membrane instead of the PVDF membrane in combination with the new selected green solvent could enhance the EFs. However, the obtained results reported in Figure 54 show that the PVDF material is more suitable to form the SLM with DES 6 for the extraction of AMPAs than PP.

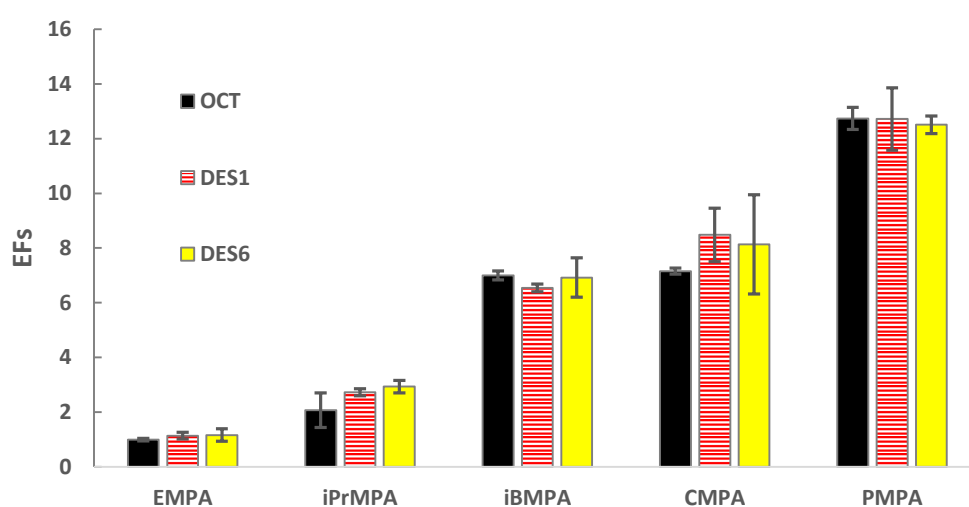


Figure 45 : Effect of the type of solvent on EFs obtained when applying PALME to urine sample spiked at 100 ng/ml with each AMPA (n = 3). Donor phase: urine at pH 1, Vd = 1950 μ l, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, Va = 50 μ l; 4 μ l of solvent; extraction time: 30 min; T_{ext} = 40°C; agitation rate: 1000 rpm.

IV.1.3.3. Analytical figures of merit of the PALME-LC-MS/MS method

The calibration curves for the targeted analytes were constructed by using urine samples spiked with the AMPAs at 5 concentration levels (ranging from 0.5 to 100 ng/ml for PMPA, CMPA and iBMPA, from 5 to 100 ng/ml for iPrMPA) or at 4 concentrations levels for EMPA (ranging from 10 to 100 ng/ml). These urine samples were subjected to the optimized DES-PALME procedure in triplicate (n=3) combined with LC-MS/MS analysis. The method was characterized on the basis of the obtained EFs, repeatability, linearity and limit of quantification (LOQ). The resulting analytical figures of merit are summarized in Table 13.

As seen on the Table 13, a good linearity was obtained for all the compounds with a R² value in the studied range of 0.9770 to 0.9991 for the respective studied concentration ranges. Repeatability was measured for all targeted analytes at the different levels of concentrations. Acceptable RSD values

on EFs were obtained ranging from 10.3 to 16.3 % (n=15, except for EMPA n=12), thus indicating the good repeatability of the whole analytical procedure applied to this complex and non-treated biological fluid.

The LOQs of the DES-PALME-LC-MS/MS were in the range from 0.04 to 5.35 ng/ml according to the compound while similar LOQs were obtained by the conventional PALME-LC-MS/MS based on octanol as organic solvent in the SLM as shown in Table 13. They were ranging from 0.03 to 3.42 ng/ml. This confirms the successful replacement of the hazardous solvent by a natural biodegradable green solvent in our sample preparation procedure.

Table 13 : figures of merit of the DES-PALME-LC-MS/MS method applied to urine samples

| Analyte | Concentration range studied in this work (ng/ml) | Enrichment factor | RSD* (%) | linearity (R ²) | LOQ (ng/ml) | LOQ** (ng/ml) |
|---------|--|-------------------|----------|-----------------------------|-------------|---------------|
| EMPA | 10-100 ng/ml | 1.1 | 16 | 0.9770 | 5.35 | 3.42 |
| iPrMPA | 5-100 ng/ml | 2.8 | 10 | 0.9772 | 0.91 | 0.37 |
| iBMPA | 0.5-100 ng/ml | 6.8 | 10 | 0.9954 | 0.06 | 0.07 |
| CMPA | 0.5-100 ng/ml | 8.3 | 15 | 0.9944 | 0.05 | 0.05 |
| PMPA | 0.5-100 ng/ml | 12.6 | 12 | 0.9991 | 0.04 | 0.03 |

*: overall RSD values of all the concentrations level for each compound (n= 15, except for EMPA n=12) calculated after the verification of the homogeneity of the RSD values with the Cochran's test (g 0.95).

** : calculated after the application of PALME using 1-octanol

Figure 46 shows the chromatograms (TIC and MRM signals of each analyte) obtained after DES-PALME-LC-MS/MS applied to a spiked urine sample. The resultant acceptor phase obtained after PALME was sufficiently cleaned for a direct injection in LC-MS. Indeed, it is important to note that the DES-PALME method was directly applied to urine samples without any pretreatment such as centrifugation, dilution or the use of expensive syringe filters which simplifies and significantly reduces the time and cost of the overall analytical process.

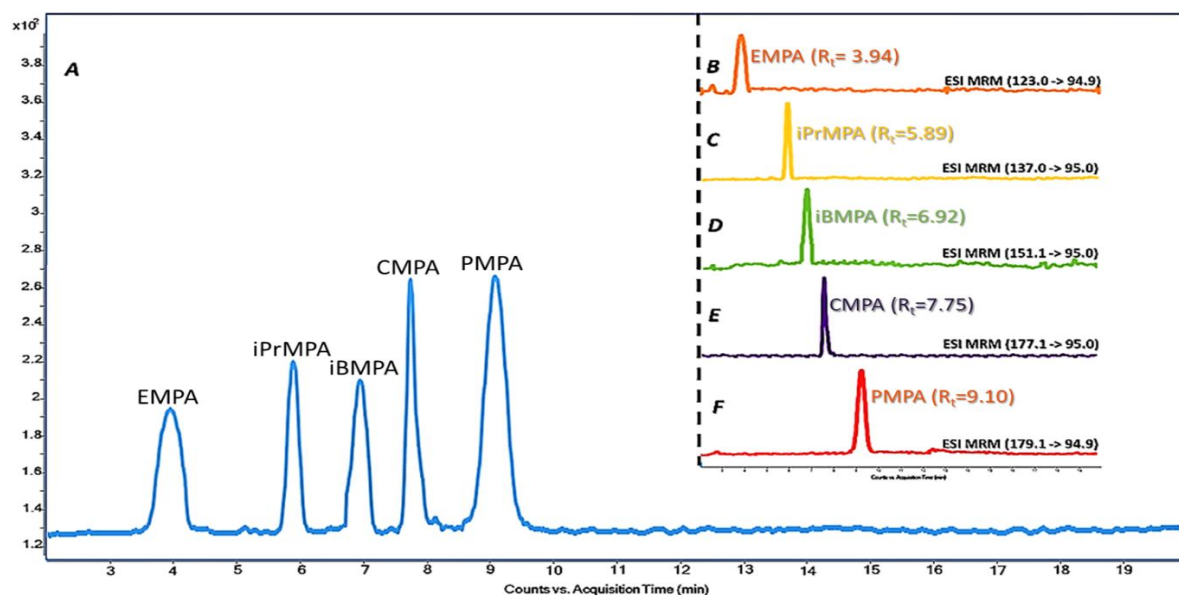


Figure 46 : Chromatogram of the target analytes resulting from the application of DES-PALME to a urine sample spiked at low concentrations ([PMPA, CMPA, iBMBA] = 0.5 ng/ml, [iPrMBA] = 5 ng/ml and [EMPA] = 10 ng/ml) and analysis by LC–MS/MS in negative ionization mode: (A) TIC of MRM transitions and MRM mode for (B) PMPA (m/z 179.1 \rightarrow 94.9), (C) CMPA (m/z 177.1 \rightarrow 95.0), (D) iBMBA (m/z 151.1 \rightarrow 95.0), (E) iPrMBA (m/z 137.0 \rightarrow 95.0).

All the obtained LOQs were greatly below (from 8 to 1000 times lower according to AMPAs) the detection limit required for the determination of nerve agent hydrolysis products in urine samples in case of exposure to nerve agents (more than 40 ng/ml) [291]. In addition, the method developed could be used in confidence-building exercises for the analysis of biomedical samples organized by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) for which participating laboratories are required to detect metabolites of chemical warfare agents in biomedical samples in the range of 0.5 to 100 ng/ml depending the nature of target compound and the complexity of the sample being analyzed. Urine samples spiked with EMPA and PMPA at 25 ng/ml were the subject of the 2nd biomedical exercise in 2012 [36].

IV.1.3.4. Evaluation of the sample method greenness according to the 10 principles of Green Sample Preparation

The evaluation of the greenness of sample preparation methods is now possible thanks to the recently introduced metric tool termed Analytical Greenness Metric for Sample Preparation (AGREEprep) [292]. Basically, different parameters like the nature and used volumes of solvent, the consumption of hazardous reagents, the nature of the waste generated, the energy consumption, the size of sample and the throughput are taking into account according to the 10 green sample preparation principles [111]. These factors are impacting the overall greenness score of the method differently, depending the recommended assigned weight [292], and lead to a final score which is

ranging from 0 to 1 (1 representing an “ideal green system”). The AGREEprep software v. 0.9 was used to assess the overall greenness of the developed NaHDES-PALME-LC-MS/MS method. The generated colorful round pictogram is reported in Figure 47 and the details on the input used to score each sub-category are provided in (Table.S8, annex 4).

The obtained final assessment score of the developed method was thus 0.75 from 1, which represents excellent green sample preparation method [292]. The color distributions in the pictogram were introduced to allow the visualization of the green performance of each parameter, hence the identification of the weak points in the method and the aspects to improve. According to the pictogram in Figure 47, two criteria were identified having the worst performance (colored in orange). It concerns the criterion #7 in connection with the reduction of the number of steps and the automation. This criterion could be easily improved since PALME is an automatable sample preparation technique. Even if it was performed manually in this work, it could easily be fully automated [224]. The other concerned criterion, #9, is related to the choice of the most environmentally friendly analytical tool to use after the step of sample treatment. The injection of the clean extracts obtained after PALME in a CE systems could be envisaged [238][293] in replacement of the energy-consuming LC-MS systems used in this study [87][232]. However, this improvement will impact negatively the sensitivity of the method which raises questions about the relevance of this modification.

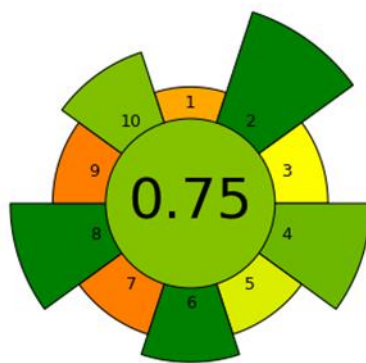


Figure 47 : Greenness assessment: AGREEprep pictograms for NaHDES-PALME-LC-MS/MS generated using the software v. 0.9 available from [294].

IV.1.3.5. Comparison of the developed method with previous extraction methods

The performance of the established method was compared with different methods developed for the quantification of AMPAs in human urine, as summarized in Table 14. In general, all the proposed extraction methods in combination with gas chromatography (GC-MS) are less sensitive than the ones proposed in combination with liquid chromatography (LC-MS) [97]. This observation has already been reported by Koryagina *et al*, who has tested and compared several existing methods in the

literature[97].

The LC-MS technique was successfully used in combination of two similar DAS methods applied with different dilution factors of 2 [96] and 3 [97]. Despite the ease of the technique, the authors acknowledge the limitation of their methods to process a large number of samples without negatively affecting the operation of the instrument. For more clean-up, accuracy and sensitivity, an SPE approach was recommended. The latter was widely applied on off-line mode, manually and sequentially on each urine sample by means of different SPE phases [122][131][291][295] and to dress the lack of the method throughput, 96-well SPE systems were used and automatized [140][141][82]. However, all these reported methods are solvent-consuming and generates a lot of quantities of chemical waste. In one study, more than 25 ml of acetonitrile was used for the extraction of AMPAs from one sample [82] and almost 7 ml of methanol was used in another study [125], both solvents being considered as ungreen and non-eco-friendly with high environmental impact. Moreover, this type of sample preparation is known to be expensive depending the type and the number of cartridges used per sample [224]. A comparison between our PALME method and the high sensitive and recently developed method for the extraction of AMPAs from urine [131] revealed the economic aspect of PALME compared to the SPE method (50 times more expensive). In addition to these aspects, the proposed PALME method has the advantage to be very fast with a short sample throughput time of 37.5s. PALME has also showed a comparable sensitivity to its parent technique (HF-LPME) despite the decrease by a factor 2 of the sample volume (1.95 ml instead of 4 ml used in two and three phase HF-LPME) [196][87].

Overall, many reported methods necessitate long and complex work-flows. Thus, they cannot be applied in an emergency on-site context since it often involves many manual steps of solvent exchanging, evaporation, reconstitution and/or derivatization combined with use of many equipment for filtration, sonication, heating, vortexing and centrifugation. In contrast to the previously reported techniques, the developed NaHDES-PALME technique is a simple sample preparation procedure including a one-step clean-up, extraction and enrichment stage ensuring the treatment of high number of samples by providing a direct LC-MS compatible and clean extracts without using of hazardous organic solvents and expensive equipment. Moreover, due to the 96-well plate technology, the parallel treatment of the samples is done quickly, which makes this technique fast, which is important for performing mass clinical and forensic analyses.

Table 14 : Comparison of the NaHDES-PALME method with other sample preparation techniques for the determination of AMPAs in urine.

| Analytes | Technique | Sample volume | Amount of solvents and reagents/sample | Extraction time/sample | Analytical method | LOD*, LOQ** (ng/ml) | Ref |
|---------------------------------|---|---------------|--|---------------------------|----------------------------------|---------------------|-------|
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, PMPA | DAS (1:1) | 500 µl | / | Few seconds | RPLC-ESI ⁻ -MS/MS | 0.5* | [96] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, PMPA | Centrifugation , filtration and DAS (1:3) | 1 ml | / | >10 min | LC-ESI ⁻ -MS/MS | 0.1-1.0* | [97] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | Derivatization | 25 µl | 390 µl of THF + 5 µl of acetic acid + 85 µl of 35 F reagent | 15 min | GC-NCI-MS/MS | 0.5-1* | [78] |
| EMPA, iPrMPA, PMPA | LLE + derivatization | 1 ml | 1 ml of hexane +1 ml of diethyl ether + 699 µl of ACN+ 1 µl of BMN + 300 µl of DMF | > 3-18 h | GC-FI-TOF-MS | 0.14-0.25* | [263] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | LLE + evaporation + derivatization | 1 ml | 7.65 ml of ether + 1.45 ml of ACN + 50 µl of diazomethane in ether + 200 µl of toluene | 40 samples per workday | GC-MS-MS | 0.3-0.9* | [262] |
| EMPA, iPrMPA, PMPA | SALLE + derivatization | 1 ml | 0.1 ml of trimethylamine + 1 ml of hexane + 2 ml of isopropanol + 6 ml of ammonium sulfate+ 0.1 ml of ammonia + 0.05 ml of methanol + 0.15 ml of diazomethane in diethyl ether | > 13 min | GC-FPD GC-MS | 10-100* | [264] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | HFLPME (2-P) + derivatization | 4 ml | 350 µl of heptane + immersion in (0.25 M of 35 F reagent in heptane) | 85 min | GC-NCI-MS | 0.5–10** | [196] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, PMPA | HFLPME (3-P) | 3 ml | Immersion in n-octanol | 50 min | RPLC-ESI ⁻ -MS | 0.06–4.8** | [87] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SPE | 100 µl | 6.35 ml of ACN | 3840 samples /24-h period | HILIC-ESI ⁻ -LC-MS/MS | 0.16-0.62* | [140] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SPE | 100 µl | 6.35 ml of ACN | n.g | HILIC-ESI ⁻ -LC-HRMS | 0.14-0.40* | [141] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SPE | 1 ml | 3 ml of ACN + 1.75 ml of DCM + 0.15 ml of methanol + 10 µl of PFBBR + 216 µl of TFA | > 1 h | GC-NCI-MS/MS | 0.1-0.5* | [122] |

| | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------|---------|--|-------------------------------------|--------------------------|-------------|-----------|
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SPE | 1 ml | 25.11 ml of ACN | 288 samples per day | HILIC-ESI-LC-MS/MS | 0.03 -0.24* | [82] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SPE | 1 ml | 4 ml of methanol + 150 µl of methanolic ammonia + 50 µl of ACN + 50 µl of MTBSTFA | > 1 h | 1D/2D GC-MS | <60* | [291] |
| PMPA iPrMPA, EMPA | SPE | 0.5 ml | 6.85 ml of methanol + 50 µl of ACN + 150 µl of ammonium hydroxide + 50 µl of MTBSTFA | > 1 h | GC-MS (EI) | 60* | [125] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SPE | 4 ml | 1.995 ml of methanol + 5 µl of ammonia | n.g | RPLC-ESI-MS | n.g | [102] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, PMPA | SPE | 1 ml | 14.35 ml of ACN + 1 mg of PMPB + 50 mg of triethylamine | > 43 min | GC-CI-HRMS GC-EI-HRMS | 20-70* | [295] |
| EMPA, iPrMPA, CMPA | SPE + SPE | 3 ml | / | 15 min | RPLC- ESI-MS/MS | 0.01-0.1** | [131] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | Dilution + SPE + SPE | 1 ml | 6 ml of methanol | many minutes | RPLC- ESI-MS/MS | 0.1-1* | [103] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | SALLE + online-SPE | 300 µl | > 4.4 ml of ACN + 300 µl of THF + 0.4 µl of acetic acid | 30 min | HILIC-ESI-LC-MS/MS | 0.04-0.12* | [84] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, PMPA | Evaporation + SPD +LLE. | 200 µl | 2.5 mL of hexane + 80 µl of DCM + 148.5 µl of ACN+ 100 µl of methanol + 25 µl of PFBBR + 1.5 µl trimethylamine | > 2 h | GC-NCI-MS/MS | 0.02* | [296] |
| EMPA, iPrMPA, iBMPA, CMPA, PMPA | DES-PALME | 1.95 ml | 4 µl of green solvent (NaHDES) | 37.5 sec (120 min for 96*2 samples) | RPLC- ESI-MS/MS | 0.04-5.4** | This work |

2-P: 2 phase; **3-P:** 3 phase; **35F:** 1-(diazomethyl)-3,5-bis(trifluoromethyl)benzene; **ACN:** acetonitrile; **BMN:** 2-(bromomethyl)naphthalene; **DCM:** dichloromethane; **DMF:** N,N-dimethylformamide
EI: Electronic impact; **FI:** Femtosecond ionization; **MTBSTFA:** N-Methyl-N-tert-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide; **n.g:** not given; **PMPB:** p-methoxyphenacyl bromide; **PFBBR:** Pentafluorobenzyl Bromide; **SPD:** solid phase derivatization (anhydrous sodium sulfate was used as a solid support material); **THF:** tetrahydrofuran

IV.1.4. Conclusion

In this paper, a new analytical method based on PALME method based on the use of a DES and coupled with LC-MS/MS for the determination of five acidic polar nerve agent degradation products at low ng/ml level in urine samples was presented. This method provided linear and repeatable analytical data. Furthermore, the obtained sensitivity of the technique was shown to follow the OPCW requirements and could be used for medical and forensic purposes. In addition to its performances in terms of sensitivity, this new approach fulfils the 10 principles of green sample preparation. Moreover, the developed method provides a double green aspect since it offers the advantage of low solvent consumption (4 μ l/sample) in addition to the use for the first time of a DES, based on a mixture of coumarin and thymol, as a new solvent type for the extraction of CWC related chemicals. These eco-friendly solvents were demonstrated to be as efficient as octanol, the traditional organic solvent involved in PALME. In addition, this technique has significant features such as high throughput, simplicity and low cost since 192 samples were treated in 120 min (37.5 s/sample) in one microextraction step with a cost that does not exceed 0.2 € per sample.

Compared to the previously reported methods, and considering the numerous advantages of the presented easy-to-use method, the DES-PALME is expected to have a great potential for further application in case of a public health emergency.

Acknowledgment

The authors thank the French Defense Procurement Agency (DGA) for providing the non-commercially available AMPAs compounds for the study.

IV.2. Evaluation des prétraitements des échantillons d'urine avant l'application de la méthode PALME :

Lors des premières expériences visant l'application directe de la PALME pour l'extraction des AMPA à partir d'urines et ce, en utilisant comme solvant l'octanol dans le SLM. Il a été observé une baisse importante des FE de 2.9 à 4.6 fois comparée aux FE obtenus pour des échantillons d'eau pure dopée. Ceci a été expliqué par la complexité de cette matrice biologique. En effet, les rendements de l'extraction étaient faibles (3 à 30 % selon le composé) comparés à l'eau pure où des taux d'extraction exhaustifs de 100 % pouvaient être atteints pour certains composés.

L'étude exposée dans la partie précédente montre que la PALME a été appliquée directement sur les urines sans le moindre prétraitement. Plusieurs prétraitements avant la PALME ont cependant été testés et comparés à son application directe sans prétraitement, et ce, afin d'augmenter le pouvoir d'extraction et de préconcentration. A cet effet, les prétraitements suivants ont été effectués:

- 1- Centrifugation et filtration : Une centrifugation de l'échantillon d'urine pendant 10 minutes avec une force de 4000 G a été réalisée et le surnageant a été récupéré et filtré avec un filtre-seringue PP ayant un diamètre de pore de 0.45 μm . Ensuite, la méthode PALME a été appliquée sur cet extrait ;
- 2- Changement de sel : Le salting-out effectué lors de la PALME a été accompli précédemment par ajout du NaCl jusqu'à saturation (30%). Cependant, une étude menée par une équipe relevant du centre norvégien de recherche sur la défense (FFI) a mentionné que l'ajout des sulfates de sodium (Na_2SO_4) a permis une meilleure extraction des AMPA comparée au NaCl [84]. A cet effet, une PALME a été effectuée avec du Na_2SO_4 comme sel ajouté à l'échantillon ;
- 3- Dilution de l'urine : une dilution avec l'eau pure (V : V, 1 : 1) a été effectuée avant le dopage avec les AMPA et la PALME a été appliquée sur cet échantillon dilué dopé avec une concentration de 100 ng/ml. Les FE ont été calculés en tenant compte de cette dilution.

Les résultats de ces expériences sont présentés sur la Figure 48.

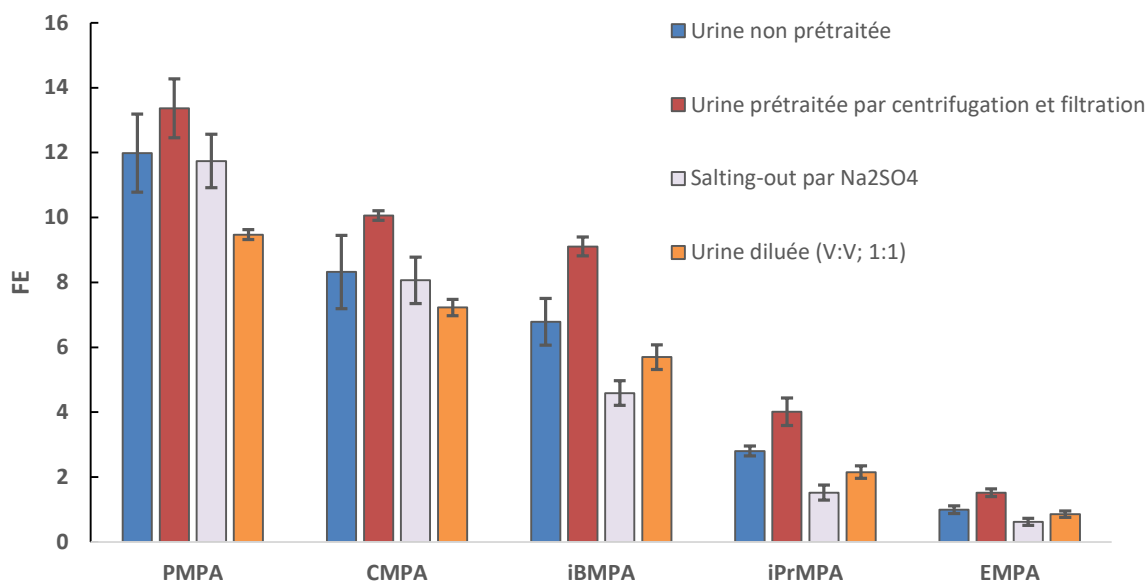


Figure 48 : Facteurs d'enrichissements des AMPAs par PALME sans et après prétraitement à partir des échantillons d'urine dopés à 100 ng/ml (n = 3). Conditions d'extraction : phase donneuse : urine à pH 1, Vd = 1950 µL, 30% NaCl (w/v) ; phase acceptrice : eau pure à pH 14, Va = 50 µL ; 4 µL d'octanol en PVDF ; temps d'extraction : 120 min ; T° = 40°C ; vitesse d'agitation : 1000 rpm.

A partir des résultats obtenus, on peut constater que les FE obtenus après application de la PALME sur un échantillon d'urine dilué avec un rapport (V : V, 1 : 1) sont proches de ceux obtenus par l'application directe de la PALME sur l'urine non-diluée. Cela veut dire que les taux d'extraction ont été presque doublés. Ce qui prouve que l'effet matrice de l'urine a beaucoup impacté l'extraction des AMPAs par PALME. Cependant, l'application directe de la PALME sur les urines non-diluées donne bien meilleurs résultats que pour son application sur des urines diluées.

Concernant, l'ajout du Na₂SO₄ dans l'urine, cela n'a pas amélioré l'extraction des AMPA comparé au NaCl. Ainsi, le NaCl reste le sel de choix pour effectuer le salting-out pour les AMPA.

Par ailleurs, le prétraitement des urines qui consiste à une centrifugation suivie d'une filtration a permis de donner une meilleure performance à la PALME. Les FE de tous les analytes ont en effet été améliorés. Cependant, cette amélioration reste relativement faible. De plus cette étape impactera négativement le protocole simple et rapide de la PALME tel qu'initialement présenté, du moment que chaque échantillon doit faire l'objet de ces étapes fastidieuses et coûteuses. Cela soulève des questions sur la pertinence de cette amélioration.

Ces expériences n'ont pas été reprises avec les DES, parce que ces derniers conduisaient à une méthode présentant les mêmes performances que l'octanol, des résultats semblables étant ainsi attendu en remplaçant l'octanol par les DES.

CONCLUSION GENERALE ET PRESPECTIVES

Les laboratoires désignés par l'organisation d'interdiction des armes chimiques disposent de nombreuses procédures analytiques permettant d'analyser les agents chimiques de guerre, leurs précurseurs de synthèse et leurs produits de dégradation. Cependant, ces techniques souffrent de limitations, qui ne leur permettent pas de répondre pleinement aux enjeux actuels en termes de débit d'analyse mais également de développement durable. L'objectif de cette thèse a donc été de développer une technique de traitement de l'échantillon permettant des analyses à haut débit, plus facile à mettre en œuvre par les opérateurs et qui permettent le traitement de centaines d'échantillons par jour de manière reproductible offrant ainsi une alternative pratique et peu onéreuse aux techniques existantes. Par ailleurs, il apparaît important aujourd'hui de développer des méthodes analytiques intégrant des étapes de traitement de l'échantillon utilisant des solvants « verts » permettant de répondre au principe de la « chimie verte » et du développement durable

Pour répondre à cette double exigence, une méthode de traitement de l'échantillon récemment développée nommée extraction liquide assistée par membrane parallèle artificielle (PALME) a été optimisée pour extraire les AMPA, composés polaires et acides, de matrices aqueuses.

Pour cela, différents paramètres ont été considérés, dont certains pour la première fois, tels que l'effet de la température et de la force ionique sur l'efficacité d'extraction. Après optimisation, une extraction exhaustive des analytes les moins polaires étudiés a été obtenue. Par ailleurs, la comparaison dans l'eau pure dopée de la méthode PALME avec la méthode HF-LPME, préalablement développée au laboratoire en collaboration avec la DGA, a permis de démontrer la possibilité de transposer les paramètres d'extraction optimaux définis en HF-LPME à la PALME. Malgré des rendements d'extraction élevés en PALME favorisés par un meilleur rapport volume de solvant accepteur/volume d'échantillons qu'en HF-LPME, des facteurs d'enrichissements ne dépassant pas 7 ont été obtenus. Ces valeurs ne permettant pas d'atteindre la sensibilité nécessaire pour l'application visée, le dispositif expérimental de la PALME tel que présenté dans la littérature a donc été modifié en optant pour une plaque donneuse présentant un volume donneur 6 fois plus important, ce qui a permis d'obtenir un facteur d'enrichissement supérieur de 42 pour le composé le moins polaire. Ainsi, la PALME associée à une méthode LC-MS s'est avérée être aussi sensible que la méthode HF-LPME préalablement développée (jusqu'à quelques centièmes de ng/ml).

La PALME a ensuite été évaluée sur des échantillons aqueux simulés, contenant des interférents analytiques, en eau de rivière puis en extrait aqueux de sol. Cela a permis de montrer le potentiel de la technique en termes de purification de l'échantillon, puisque les phases acceptrices obtenues après la

PALME des extraits aqueux de sol étaient suffisamment « propres » pour qu'elles soient injectées directement en LC-MS pour analyse. Le fait de ne pas avoir besoin d'une filtration préalable permet d'alléger la procédure de traitement de l'échantillon globale mise en œuvre. De plus, cette technique présente des avantages importants tels que son application possible à haut débit, sa simplicité de mise en œuvre et son faible coût, puisque dans cette étude, 192 échantillons ont été traités en une seule étape de microextraction en 120 min (37,5 s/échantillon) avec un coût qui ne dépasse pas 0,2 € par échantillon.

Enfin, les solvants eutectiques profonds (DES) à base de coumarin et de thymol ont été utilisés pour remplacer le solvant organique « classique » l'octanol pour la formation de SLM utilisée pour l'extraction des AMPA par PALME à partir d'échantillons d'urine. La méthode DES-PALME optimisée a ensuite été comparées à toutes les méthodes existantes dans littérature et visant le même objectif, à savoir la quantification des AMPA dans les urines. Le potentiel de la DES-PALME associées à la LC-MS/MS pour répondre aux exigences de l'OIAC a donc été démontré. Par ailleurs, cette nouvelle méthode répond aux exigences des 10 principes de la chimie verte appliqués au traitement d'échantillons.

Ainsi, les résultats prometteurs obtenus pour l'extraction des AMPA, composés polaires, des matrices aqueuses (environnementales ou biologiques) démontrent que le transfert des conditions opératoires déjà décrites pour la micro-extraction par fibre creuses (HF-LPME) d'autres composés liés à la convention d'interdiction des armes chimiques est envisageable.

Par ailleurs, la PALME telle que connue dans la littérature et reprise dans ce travail est réalisé en mode triphasique. La méthode PALME en mode biphasique n'a pas été présentée jusqu'au là. Pour la réaliser, il suffira juste de remplacer la solution aqueuse de la phase acceptrice par le même solvant organique utilisé pour imprégner les pores de la membrane tel que c'est le cas déjà pour nombreuses méthodes HF-LPME en mode biphasique. La Figure 49 illustre la différence entre les deux modes de fonctionnement de la PALME (triphasique et biphasique). Ainsi, des méthodes PALME en mode biphasique peuvent être facilement développées à partir de des données disponibles en HF-LPME en mode biphasique. Ce mode devrait permettre l'association de la PALME à la chromatographie en phase gazeuse comme outil d'analyse compte tenu du fait que les extraits obtenus seront de nature organique et donc compatible avec la GC.

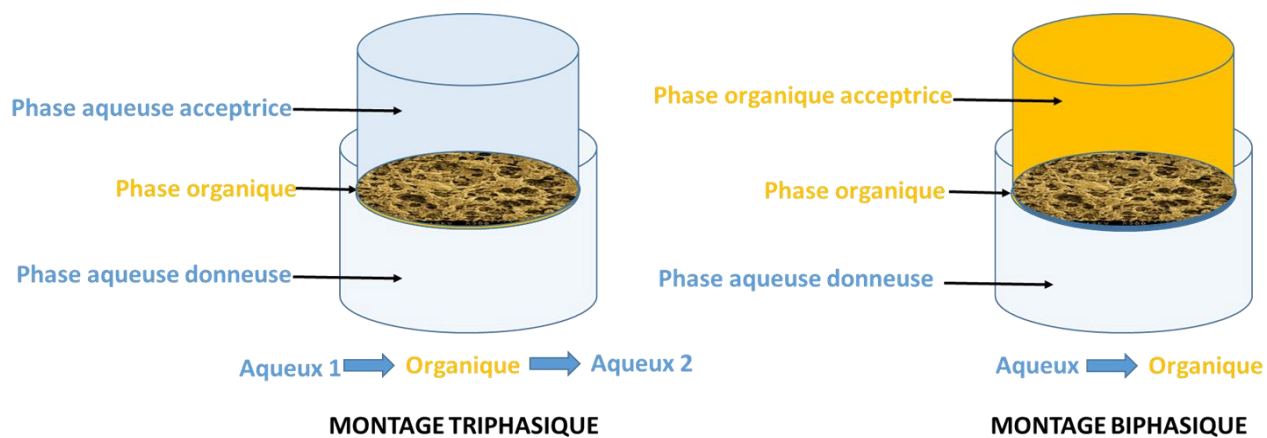


Figure 49 : Illustration des deux modes de transferts biphasique et triphasique en PALME pour un seul échantillon.

Enfin, la microextraction liquide par électromigration assistée par membrane parallèle artificielle (Pa-EME) peut aussi être envisagée pour l'extraction d'autres composés en lien avec la convention d'interdiction des armes chimiques. Surtout que cette technique a connu des grands progrès durant ces 4 dernières années en matière de : (a) technologie du dispositif, des plaques 96-puits conductrices ayant été fabriquées et utilisées avec succès (b) nature de la membrane liquide supportée qui couvre désormais une large gamme de polarité permettant l'extraction des différentes classes d'analytes (c) applications performantes prouvées aux échantillons biologiques complexes.

ANNEXES

Annexe 1 : tableaux des produits chimiques de la Convention

Annexe 1 : tableaux des produits chimiques de la convention

Les tableaux ci-après énumèrent des produits chimiques toxiques et leurs précurseurs. Aux fins de l'application de la présente Convention, ces tableaux désignent des produits chimiques qui font l'objet de mesures de vérification selon les dispositions de l'Annexe sur la vérification. Ces tableaux ne constituent pas une définition des armes chimiques au sens du paragraphe 1, alinéa a), de l'article II.

(Chaque fois qu'il est fait mention de composés dialkylés, suivis d'une liste de groupes alkylés placée entre parenthèses, tout composé dérivable par n'importe quelle combinaison possible des groupes alkylés énumérés entre parenthèses est considéré comme étant inscrit au tableau correspondant tant qu'il n'en est pas expressément rayé. Un produit chimique suivi de "*" dans la partie A du tableau 2 est assorti de seuils de déclaration et de vérification spéciaux, comme il est indiqué dans la septième partie de l'Annexe sur la vérification.)

Tableau 1

A. Produits Chimiques Toxiques.

| | (No CAS) |
|--|--|
| (1) Alkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)phosphonofluoridates de 0-alkyle(e.g. Sarin: méthylphosphonofluoridate de 0-isopropyle Soman: méthylphosphonofluoridate de 0-pinacolyle | (107-44-8) (96-64-0) |
| (2) N,N-dialkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)phosphoramidocyanidates de 0-alkyle(e.g. Tabun: N,N-diméthylphosphoramidocyanidate de 0-éthyle | (77-81-6) |
| (3) Alkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)phosphonothioates de 0-alkyle(H ou e.g. VX: méthylphosphonothioate de 0-éthyle et de S-2-diisopropylaminoéthyle | (50782-69-9) |
| (4) Moutardes au soufre: Sulfure de 2-chloroéthyle et de chlorométhyle Gaz moutarde: sulfure de bis(2-chloroéthyle) Bis(2-chloroéthylthio)méthane Sesquimoutarde: 1,2-Bis(2-chloroéthylthio)éthane 1,3-Bis(2-chloroéthylthio)-n-propane 1,4-Bis(2-chloroéthylthio)-n-butane 1,5-Bis(2-chloroéthylthio)-n-pentane Oxyde de bis(2-chloroéthylthiométhyle) Moutarde-0: oxyde de bis(2-chloroéthylthioéthyle) | (2625-76-5) (505-60-2) (63869-13-6) (3563-36-8) (63905-10-2) (142868-93-7) (142868-94-8) (63918-90-1) (63918-89-8) |
| (5) Lewisites: Lewisite 1: 2-chlorovinylchlorarsine Lewisite 2: bis(2-chlorovinyl)chlorarsine Lewisite 3: tris(2-chlorovinyl)arsine | (541-25-3) (40334-69-8) (40334-70-1) |
| (6) Moutardes à l'azote HN1: bis(2-chloroéthyl)éthylamine HN2: bis(2-chloroéthyl)méthylamine | (538-07-8) (51-75-2) |

| | | |
|------|---|----------------|
| | HN3: tris(2-chloroéthyl)amine | (555-77-1) |
| (7) | Saxitoxine | (35523-89-8) |
| (8) | Ricine | (9009-86-3) |
| | Phosphonamidofluoridates de P-alkyle (H ou $\leq C10$, y compris cycloalkyle) N-(1-(13) (dialkyle ($\leq C10$, y compris cycloalkyle)amino))alkylidène(H ou $\leq C10$, y compris cycloalkyle) et les sels alkylés ou protonés correspondants | |
| ex. | Phosphonamidofluoridate de P-décyle N-(1-(di-n-décylamino)-n-décylidène) | (2387495-99-8) |
| | Phosphonamidofluoridate de méthyl-(1-(diéthylamino)éthylidène) | (2387496-12-8) |
| | Phosphoramidofluoridates de O-alkyle (H ou $\leq C10$, y compris cycloalkyle) N-(1-(14) (dialkyle ($\leq C10$, y compris cycloalkyle)amino))alkylidène(H ou $\leq C10$, y compris cycloalkyle) et les sels alkylés ou protonés correspondants | |
| ex. | Phosphonamidofluoridate de P-décyle N-(1-(di-n-décylamino)-n-décylidène) | (2387496-00-4) |
| | Phosphoramidofluoridate de méthyl (1-(diéthylamino)éthylidène) | (2387496-04-8) |
| | Phosphoramidofluoridate d'éthyl (1-(diéthylamino)éthylidène) | (2387496-06-0) |
| (15) | (Bis(diéthylamino)méthylène)phosphonamidofluoridate de méthyle | (2387496-14-0) |
| (16) | Carbamates (quaternaires et biquaternaires de diméthylcarbamoyloxy-pyridines) | |
| | Quaternaires de diméthylcarbamoyloxy-pyridines :td> | |
| | 1-[N,N-Dialkyl($\leq C10$)-N-(n-(hydroxyl, cyano, acétoxy)alkyl($\leq C10$)) ammonio]-n-[N-(3-diméthyl-carbamoyloxy- α -picolinyl)-N,N-dialkyl($\leq C10$) ammonio]décane dibromide (n=1-8) | |
| ex. | 1-[N,N-Diméthyl-N-(2-hydroxy)éthylammonio]-10-[N-(3-diméthylcarbamoyloxy- α -picolinyl)-N,N-diméthylammonio]décane dibromide | (77104-62-2) |
| | Biquaternaires de diméthylcarbamoyloxy-pyridines : | |
| | 1,n-Bis[N-(3-diméthylcarbamoyloxy- α -picolyl)-N,N-dialkyl($\leq C10$) ammonio]-alkane-(2,(n-1)-dione) dibromide (n=2-12) | |
| ex. | 1,10-Bis[N-(3-diméthylcarbamoyloxy- α -picolyl)-N-éthyl-N-méthylammonio]décane-2,9-dione dibromide | (77104-00-8) |

B. Précurseurs

| | | |
|------|--|--------------|
| | | (No CAS) |
| (9) | Difluorures d'alkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)phosphonyle | |
| e.g. | DF: difluorure de méthylphosphonyle | (676-99-3) |
| (10) | Alkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)phosphonites de O-alkyle(H ou | |
| e.g. | QL: méthylphosphonite de O-éthyle et de O-2-diisopropylaminoéthyle | (57856-11-8) |
| (11) | Chloro Sarin: méthylphosphonochloridate de O-isopropyle | (1445-76-7) |
| (12) | Chloro Soman: méthylphosphonochloridate de O-pinacolyle | (7040-57-5) |

Tableau 2

A. Produits Chimiques Toxiques

| | |
|--|-----------------------|
| (1) Amiton: phosphorothioate de 0,0-diéthyle et de S-[2-(diéthylamino)éthyle] les sels alkylés ou protonés correspondants | (No CAS) (78-53-5) |
| (2) PFIB: 1,1,3,3,3-pentafluoro-2-(trifluorométhyl) propène | (382-21-8) |
| (3) BZ: Benzilate de 3-quinuclidinyle (*) | (6581-06-2) |

B. Précurseurs

| | |
|--|-------------|
| | (No CAS) |
| (4) Produits chimiques, hormis ceux qui sont inscrits au tableau 1, contenant un atome de phosphore auquel est lié un groupe méthyle, éthyle ou propyle (normal ou iso), sans autres atomes de carbone | |
| e.g | |
| Dichlorure de méthylphosphonyle | (676-97-1) |
| Méthylphosphonate de diméthyle | (756-79-6) |
| Sauf: Fonofos: | |
| éthylidithiophosphonate de 0-éthyle et de S-phényle | (944-22-9) |
| (5) Dihalogénures N,N-dialkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr) phosphoramidiques | |
| (6) N,N-dialkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)phosphoramidates de dialkyle(Me, Et, n-Pr ou i-Pr) | |
| (7) Trichlorure d'arsenic | (7784-34-1) |
| (8) Acide 2,2-diphényl-2-hydroxyacétique | (76-93-7) |
| (9) Quinuclidin-3-ol | (1619-34-7) |
| (10) Chlorures de N,N-2-dialkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr) aminoéthyle et les sels protonés correspondants | |
| (11) N,N-2-dialkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)aminoéthanol et les sels protonés correspondants | |
| Sauf: | |
| N,N-Diméthylaminoéthanol | (108-01-0) |
| et les sels protonés correspondants | |
| N,N-Diéthylaminoéthanol | (100-37-8) |
| et les sels protonés correspondants | |
| (12) N,N-2-dialkyl(Me, Et, n-Pr ou i-Pr)aminoéthanthiol et les sels protonés correspondants | |
| (13) Thiodiglycol: sulfure de bis(2-hydroxyéthyle) | (111-48-8) |
| (14) Alcool pinacolique: 3,3-diméthylbutan-2-ol | (464-07-3) |

Tableau 3

A. Produits Chimiques Toxiques

| | |
|---|-----------------------|
| (1) Phosgène: Dichlorure de carbonyle | (No CAS) (75-44-5) |
| (2) Chlorure de cyanogène | (506-77-4) |
| (3) Cyanure d'hydrogène | (74-90-8) |
| (4) Chloropicrine : trichloronitrométhane | (76-06-2) |

B. Précurseurs

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| (5) Oxychlorure de phosphore | (No CAS) (10025-87-3) |
| (6) Trichlorure de phosphore | (7719-12-2) |
| (7) Pentachlorure de phosphore | (10026-13-8) |
| (8) Phosphite de triméthyle | (121-45-9) |
| (9) Phosphite de triéthyle | (122-52-1) |
| (10) Phosphite de diméthyle | (868-85-9) |
| (11) Phosphite de diéthyle | (762-04-9) |
| (12) Monochlorure de soufre | (10025-67-9) |
| (13) Dichlorure de soufre | (10545-99-0) |
| (14) Chlorure de thionyle | (7719-09-7) |
| (15) Ethyldiéthanolamine | (139-87-7) |
| (16) Méthyldiéthanolamine | (105-59-9) |
| (17) Triéthanolamine | (102-71-6) |

Annexe 2 : procédure PALME

La procédure PALME comprend 6 étapes : qui peut se faire avec une micropipette multicanaux, stepper, ou une micropipette à répétitions.

- 1- Les échantillons sont pipetés dans les puits dans la plaque donneuse à 96-puits.
- 2- Les standards internes et les solutions tampons sont pipetés dans les échantillons.
- 3- Chaque SLM est formé par le pipetage du solvant dans le filtre correspondant dans la plaque acceptrice à 96-puits.
- 4- La solution acceptrice est pipetée dans les puits de la plaque acceptrice à 96-puits.
- 5- La plaque donneuse et la plaque acceptrice sont serrés, et cette dernière est scellée avec la feuille d'étanchéité. Et ce système de « Sandwich de plaques » est placé dans l'agitateur. Pendant l'agitation, les analytes ciblés dans leur état non-chargés sont extraits de chaque échantillon.
- 6- Chaque solution acceptrice est transférée pour analyse, principalement par LC-MS.

Cette procédure est présentée sur la Figure 50.

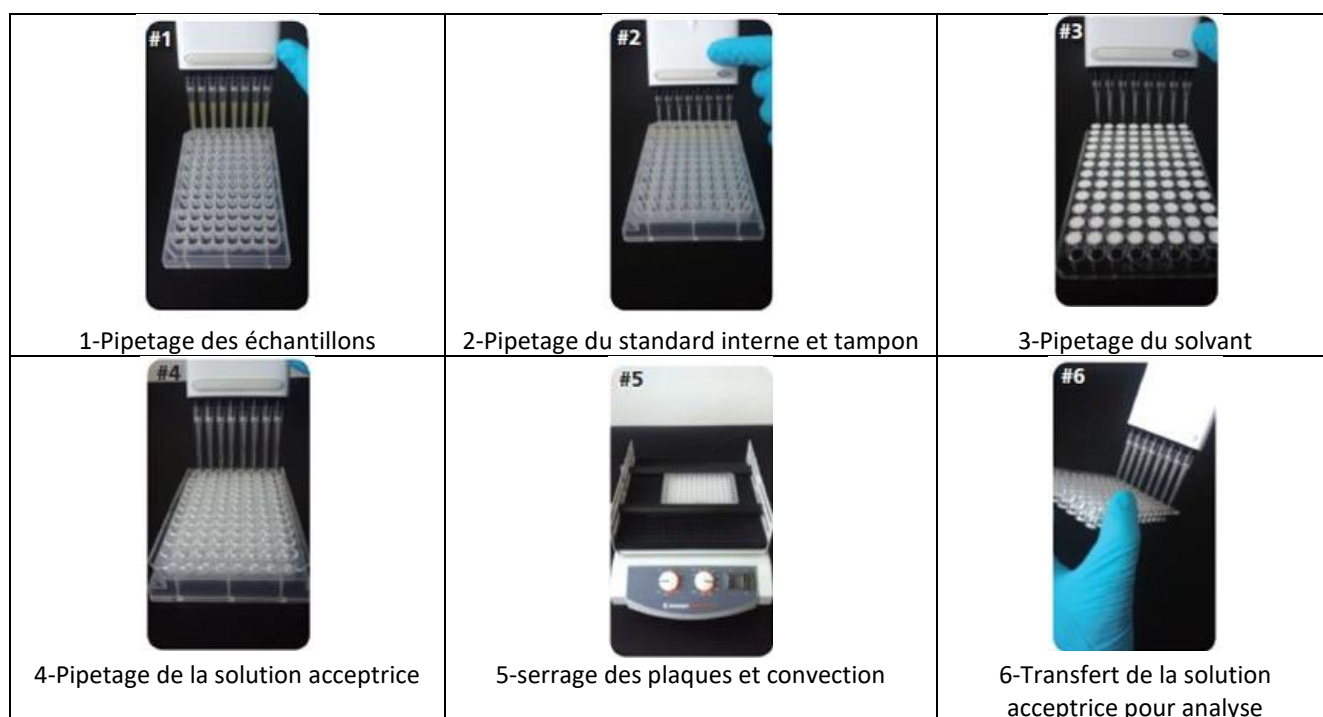


Figure 50 : Différentes étapes du flux de travaux pour une extraction PALME.

Annexe 3 : Supplementary material – Article 1

Parallel artificial liquid membrane extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental samples

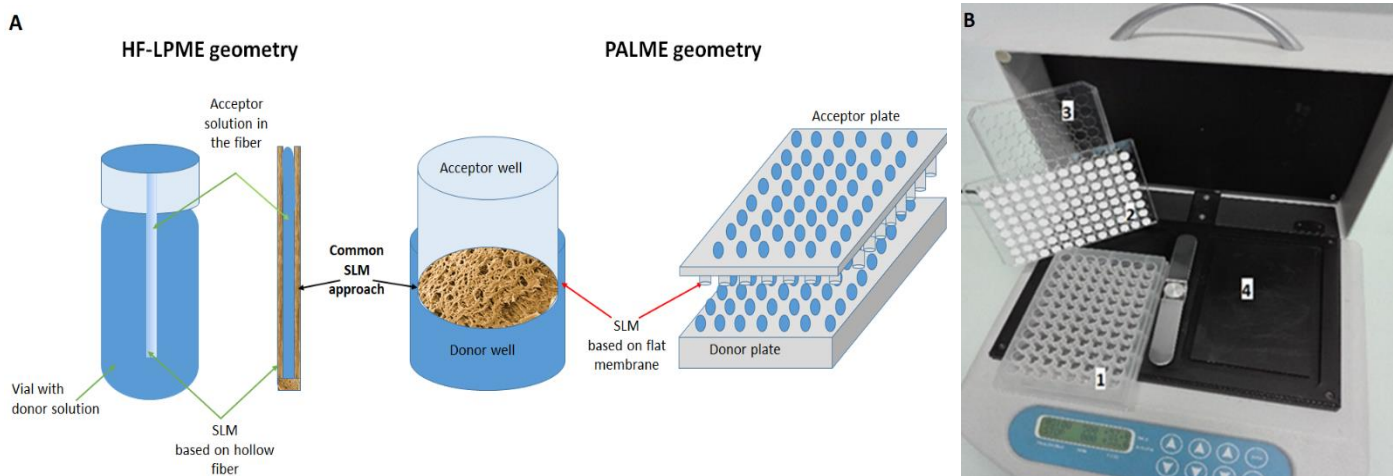


Figure 51 : Schematic illustration of the difference of geometry between HF-LPME and PALME (A). Picture of the hole set-up used for PALME (B): the donor plate (1), the acceptor plate (with white filter PVDF membranes) (2), the lid (3) and the bi-plate shaker (4).

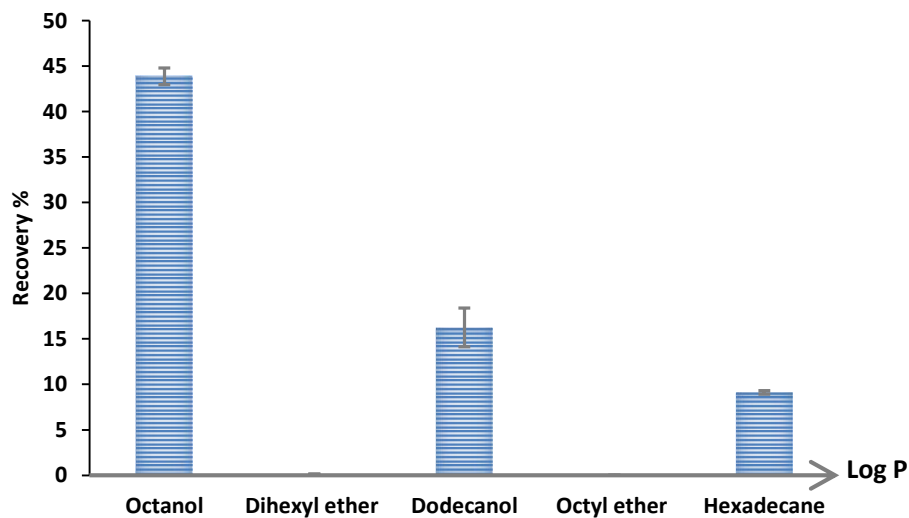
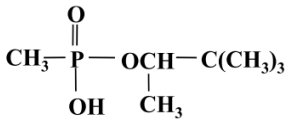
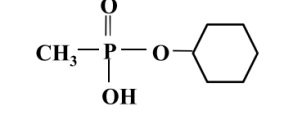
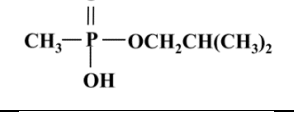
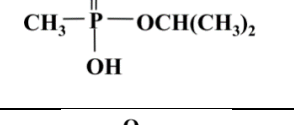
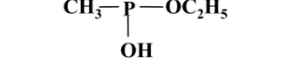


Figure 52 : Effect of the organic solvent on the extraction recovery of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of PMPA from pure water ($n = 3$). Extraction conditions: membrane material: PVDF; donor phase: pH 1, $V_d = 350 \mu\text{L}$, 0 % NaCl (w/v); acceptor phase: pH 13, $V_a = 50 \mu\text{L}$; immersion of $4 \mu\text{L}$ of different organic solvents; extraction time: 30 min; temperature: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and stirring speed: 600 rpm.

Table S. 1 : Physicochemical properties of the studied alkyl methylphosphonic acids.

| Analytes | Chemical Structures | Molecular weight (g/mol) | Log P* /log P ** | pKa*** |
|----------|--|--------------------------|------------------------------|--------|
| PMPA |  | 180.18 | 0.67 to 1.409 / 0.8±0.6 | 2.06 |
| CMPA |  | 178.17 | 0.62 to 1.037 /0.6±0.6 | 1.97 |
| iBMPA |  | 152.13 | -0.03 to 0.564 /0.0±0.6 | 2.03 |
| iPrMPA |  | 138.10 | -0.56 to 0.101 /-0.5±0.6 | 1.96 |
| EMPA |  | 124.08 | -0.91 to -0.310 /-0.8±0.6 | 1.99 |

*Range obtained from <https://chemicalize.com>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> and www.chemspider.com.

**values from Røen et al., 2014 [50]

*** obtained from <https://chemicalize.com>.

Table S. 2: Parameters applied in ESI-MS detection (MRM mode).

| Analyte | Capillary voltage (V) | Precursor (m/z) | Fragmentor (V) | Quantifier ion (m/z) | CE (V) |
|---------|-----------------------|-----------------|----------------|----------------------|--------|
| PMPA | 2500 | 179.1 | 136 | 94.9 | 18 |
| CMPA | 2500 | 177.1 | 112 | 95.0 | 18 |
| iBMPA | 3000 | 151.1 | 112 | 95.0 | 14 |
| iPrMPA | 3500 | 137.0 | 78 | 95.0 | 14 |
| EMPA | 2500 | 123.0 | 44 | 94.9 | 10 |

Table S. 3 : Characteristics of the studied membranes [297][298].

| Characteristics | PVDF IMOBILON p | Accurel PP 1E (R/P) |
|-------------------|-----------------|---------------------|
| Wall thickness | 100-130 µm | 100 µm |
| Diameter | 6 mm | 6 mm |
| Pore size | 0.45 µm | 0.1 µm |
| Membrane porosity | 68 % | 69% |

Table S. 4 : Comparison between previous HF-LPME and PALME of PMPA in pure water.

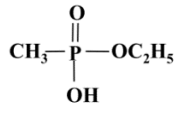
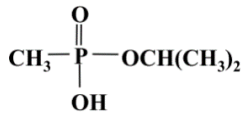
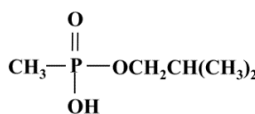
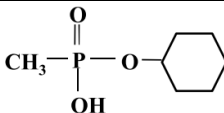
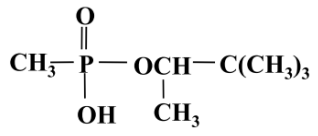
| Microextraction technique and Reference | | Tak et al [86] HF-LPME | Desoubries et al [87] HF-LPME | Actual work PALME |
|--|--|-----------------------------------|--|--|
| Physical characteristics | Type of membrane | Hollow fiber | Hollow fiber | Flat membrane |
| | Membrane material | Accurel Q 3/2 PP | Accurel Q 3/2 PP | Immobilon®-P PVDF |
| | Thickness (µm) | 200 | 200 | 100-130 |
| | Pore size (µm) | 0.20 | 0.20 | 0.45 |
| | Contact area of the SLM (mm ²) | n.g | 56.83 | 28.27 |
| | Porosity | 69.0 % | 69.0 % | 68.4 % |
| Optimal conditions | Preconditioning of the membrane | Yes (sonication) | Yes (sonication) | No |
| | Vd (mL)/ Va (µL) | 6/8 | 3/6 | 2.12/50 |
| | pH (donor phase) /pH (acceptor phase) | 1 (HCl) / 14 (NaOH) | 1 (HCl) /14 (NaOH) | 1 (HCl) /14 (NaOH) |
| | NaCl (%) | 10 | 30 | 30 |
| | Solvent (immersion time) | 1-Octanol (20s) | 1-Octanol (5s) | 1-Octanol (instantly) |
| | Stirring speed/Agitation (rpm) | 900 | 600 | 1000 |
| | Temperature | RT | 42°C | 40°C |
| | Extraction time (min) | 60 min/sample | 50 min/sample | 120 min for 96*2 samples (37.5 sec/sample) |
| ²Performance | FE (max achievable) = Vd/Va | 750 | 500 | 42.4 |
| | FE obtained | 85 ± 8 | 225 ± 30 | 42.75 ± 4.66 |
| | Recovery % | 11.33 % | 45 % | 100.83 % |
| | LOD or LOQ of PMPA in pure water | LOD (S/N≥5): 0.1 ng/mL | LOQ (S/N≥10): 0.013 ng/mL | LOQ (S/N≥10): 0.009 ng/mL |

Annexe 4 : Supplementary material – Article 2

Electronic Supplementary Information

Parallel artificial liquid membrane extraction using deep eutectic solvents of organophosphorus nerve agent degradation products from urine samples

Table S. 5 : Physicochemical properties of the studied alkyl methylphosphonic acids.

| Analytes | Chemical Structures | Molecular weight (g/mol) | Log P* /log P ** | pKa *** |
|----------|---|--------------------------|------------------------------|---------|
| EMPA |  | 124.08 | -0.91 to -0.310 /-0.8±0.6 | 1.99 |
| iPrMPA |  | 138.10 | -0.56 to 0.101 /-0.5±0.6 | 1.96 |
| iBMPA |  | 152.13 | -0.03 to 0.564 /0.0±0.6 | 2.03 |
| CMPA |  | 178.17 | 0.62 to 1.037 /0.6±0.6 | 1.97 |
| PMPA |  | 180.18 | 0.67 to 1.409 /0.8±0.6 | 2.06 |

*Range obtained from <https://chemicalize.com>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> and www.chemspider.com.

**values from Røen *et al.*, 2014 [50]

*** obtained from <https://chemicalize.com>.

Table S. 6 : Parameters applied in ESI-MS detection (MRM mode).

| Analyte | Precursor (m/z) | Capillary voltage (V) | Fragmentor (V) | Dwell time (ms) | Quantifier ion (m/z) | CE* (V) | Qualifier ion (m/z) | CE** (V) |
|---------|-----------------|-----------------------|----------------|-----------------|----------------------|---------|---------------------|----------|
| EMPA | 123.0 | 2500 | 44 | 100 | 94.9 | 10 | 79.1 | 30 |
| iPrMPA | 137.0 | 3500 | 78 | 100 | 95.0 | 14 | 78.9 | 34 |
| iBMPA | 151.1 | 3000 | 112 | 100 | 95.0 | 14 | 78.1 | 26 |
| CMPA | 177.1 | 2500 | 112 | 100 | 95.0 | 18 | 78.9 | 50 |
| PMPA | 179.1 | 2500 | 136 | 100 | 94.9 | 18 | 78.9 | 46 |

* CE: collision energy related to the quantifier ion

** CE: collision energy related to the qualifier ion

Table S. 7 : Characteristics of the studied membranes [297][298].

| Characteristics | PVDF IMOBILON p | Accurel PP 1E (R/P) |
|-------------------|-----------------------|---------------------|
| Wall thickness | 100-130 μm | 100 μm |
| Diameter | 6 mm | 6 mm |
| Pore size | 0.45 μm | 0.1 μm |
| Membrane porosity | 68 % | 69% |

Table S. 8 : Input used to assign AGREEprep score for NaHDES-PALME-LC-MS/MS method.

| Criterion | Weight | Input | Justification for input |
|-----------|--------|-----------------------|---|
| 1 | 1 | On-site | Sample preparation performed in mobile lab at the chemical incident scene |
| 2 | 5 | 4 μL | The quantity of solvent used in PALME either “toxic” or not is giving the maximum score of 1. Unfortunately, for the AGREEprep software, under 10 μL of any solvent is considered like free-solvent method |
| 3 | 2 | 50-75% | 50-75% of reagents and materials are sustainable and renewable and can be used once |
| 4 | 4 | 0.38 g | Donor plate could be reused many times however donor plate is for disposable use only. Thus the waste is the weight of the plate divided by number of samples. (36.5g/96) |
| 5 | 2 | 1.95 mL | Volume of urine sample |
| 6 | 3 | 96 | 192 samples are extracted simultaneously during 120 minutes (equivalent to 96/ hour). Unfortunately, for the AGREEprep software, starting from 70 samples/hour is getting the maximum score of 1 |
| 7 | 2 | 1 manual step | Extraction is performed manually, and is the only step |
| 8 | 4 | 0.21 Wh per sample | Shaker uses 80 W for 2 hours for 192 samples. Less than 10Wh/sample is considered as energy-free method by the AGREEprep software. |
| 9 | 2 | Liquid chromatography | The used analytical tool is LC-MS/MS. To improve the greenness of the method. The CE methods [238][293] developed in our laboratory could be used |
| 10 | 3 | 1 hazard | 1 Pictogram: corrosive (GHS05) for hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) |

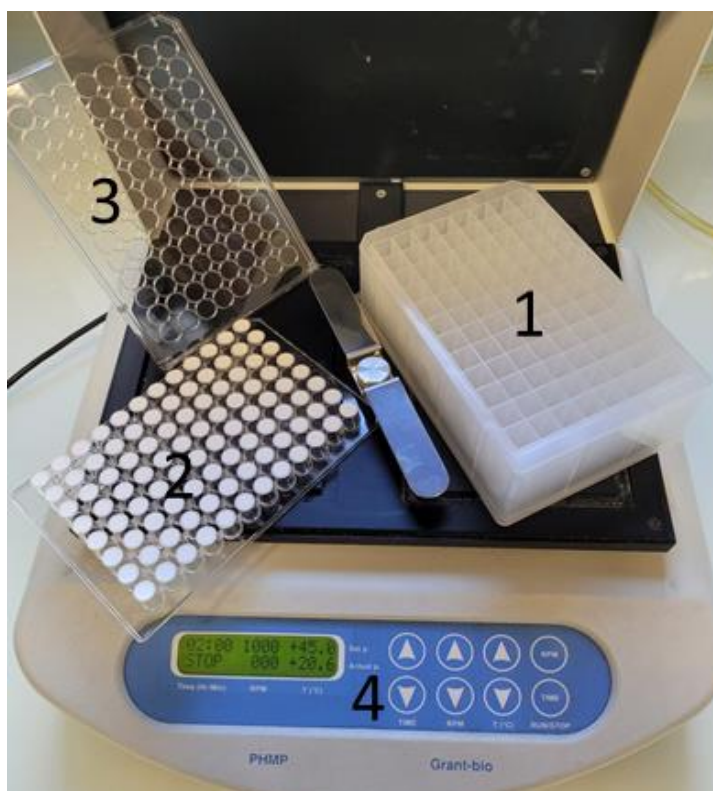


Figure 53 : Picture of the hole set-up used for PALME: the deep well donor plate (1), the acceptor plate (with white filter PVDF membranes) (2), the lid (3) and the bi-plate shaker (4).

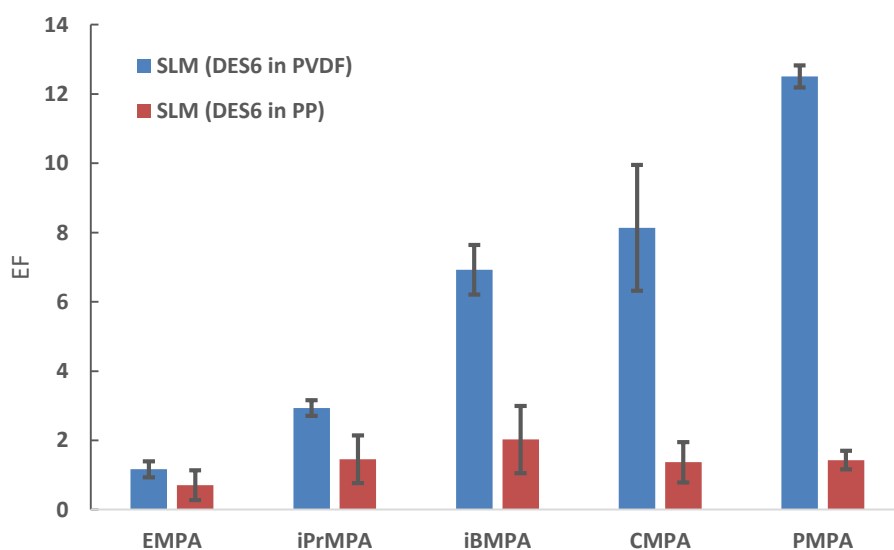


Figure 54 : Effect of the type of membrane material on EFs obtained when applying PALME to urine sample spiked at 100 ng/ml with each AMPA (n = 3). Donor phase: urine at pH 1, $V_d = 1950 \mu\text{l}$, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, $V_a = 50 \mu\text{l}$; 4 μl of DES 6; extraction time: 30 min; $T_{\text{ext}} = 40^\circ\text{C}$; agitation rate: 1000 rpm.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Chronologie des accidents sérieux liés à l'utilisation de substances toxiques comme agents chimiques de guerre. | 13 |
| Figure 2 : Structure des principaux agents chimiques toxiques..... | 18 |
| Figure 3 : Echelle de toxicité relative des agents chimiques de guerre..... | 19 |
| Figure 4 : Cinétique de dégradation du sarin dans le sol donnant de l'isopropyl méthylphosphonique IPrMPA puis l'acide méthylphosphonique (MPA)..... | 21 |
| Figure 5 : Dégradation des agents neurotoxiques en produits spécifiques et non-spécifiques | 22 |
| Figure 6 : Mécanisme de dégradation des agents neurotoxique ayant la structure d'un alkyl alkylphosphonofluoridates comme le sarin..... | 22 |
| Figure 7 : Mécanisme de dégradation des agents neurotoxiques ayant la structure O-Alkyl N,N-dialkylphosphoramidocyanidates comme le Tabun | 22 |
| Figure 8 : Mécanisme de dégradation des agents neurotoxique de type V comme le VX..... | 23 |
| Figure 9 : Structures des agents neurotoxiques et de leurs produits de dégradation respectifs | 24 |
| Figure 10 : Comparaison des temps de rétention UPLC et HPLC d'un volume d'injection de 10µL de solution d'étalonnage. Les pics correspondant aux analyses cibles des analyses HPLC et UPLC de gauche à droite sont MPA, EHDMPA, EMPA, IMPA et PMPA respectivement..... | 30 |
| Figure 11 : Les temps consacrés pour chaque étape de la procédure analytique (a) sources d'erreurs générés lors d'une procédure analytique (b). | 34 |
| Figure 12 : Principe de l'extraction liquide-liquide..... | 35 |
| Figure 13 : Illustration des différents formats de la SPE | 36 |
| Figure 14 : Description d'une procédure d'extraction par SPE | 37 |
| Figure 15 : Schéma montrant une méthode SPE hybride | 41 |
| Figure 16 : Schéma montrant la synthèse de polymères à empreinte moléculaire (MIP)..... | 41 |
| Figure 17 : Configuration de la SPE-LC pour l'étape de percolation de l'échantillon (A) et d'élution (B).43 | |
| Figure 18 : Constitution de la seringue SPME et son utilisation..... | 45 |
| Figure 19 : Présentation de la technique SBSE | 47 |
| Figure 20 : Représentation de la technique de microextraction en phase solide dispersive (DSPE) | 49 |
| Figure 21 : Représentation de la technique SDME telle que proposée par Liu et Dasgupta | 51 |
| Figure 22 : Configuration du système SDME (travaux de Cantwell)..... | 51 |
| Figure 23 : Système SDME des AMPA..... | 52 |
| Figure 24 : Représentation de la technique de micro extraction liquide-liquide dispersive..... | 53 |
| Figure 25 : Microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse en configuration D (à droite) : (a) phase donneuse (b) fibre creuse avec sa phase organique (c) phase acceptrice. Et configuration U (à gauche) 55 | |
| Figure 26 : Photo de la fibre creuse : A) une section de la fibre creuse en HF-LPME en propylène poreux vue par microscope électronique à balayage (MEB x1000), B) Dimensions de la fibre comparée à une pièce de 5 centimes..... | 56 |
| Figure 27 : Microextraction liquide-liquide assistée par fibre creuse en mode biphasique et mode triphasique..... | 57 |
| Figure 28 : Microextraction liquide assistée par fibre creuse en sa configuration instrumentale standard et le processus typique de la HF-EME..... | 64 |
| Figure 29 : photo d'un prototype de la HF-LPME en 96 puits proposé par Stig Pedersen-Bjergaard en coopération avec la société VARIAN constitué de : A) plaque acceptrice à 96 puits, B) Support pour 96 fibres creuses | 67 |
| Figure 30 : Technique d'extraction par membrane liquide artificielle parallèle. | 69 |

| | |
|--|-----|
| Figure 31: Processus d'extraction des analytes acides par la PALME | 70 |
| Figure 32 : Chromatogrammes illustrant l'élimination des phospholipides par PALME : (A) Chromatogramme obtenu après précipitation des protéines, (B) Chromatogramme obtenu après traitement de l'échantillon par PALME (C) Chromatogramme obtenu après injection d'un blanc de phase mobile | 74 |
| Figure 33 : Principe de transfert des analytes en Pa-EME a) anions et b) cations | 79 |
| Figure 34 : Principe de transfert des analytes en Pa-EME a) anions et b) cations | 80 |
| Figure 35 : Effect of the type of the flat membrane on the extraction recovery of 500 ng mL ⁻¹ of EMPA and 100 ng mL ⁻¹ of PMPA from pure water by PALME (n = 3). Extraction conditions: donor phase: pure water at pH 1, V _d =350 µL, 0 % NaCl (w/v); acceptor phase: pure water at pH 13, V _a = 50 µL; 4 µL of octanol; extraction time: 30 min; T _{ext} = 25 °C; agitation rate: 600 rpm..... | 96 |
| Figure 36 : Effect of the pH of the donor phase (A) and of the acceptor phase (B), of the amount of NaCl in the donor phase (C), of the temperature (D), of agitation speed (E) and of the extraction time (F) on the extraction recoveries of PMPA (100 ng mL ⁻¹) from pure water by PALME (average ±SD, n=3). Constant parameters from A to F (except when mentioned): 4 µL of 1-octanol in PVDF membrane; Acceptor phase: V _a = 50 µL, pH 13 (except B); donor phase: V _d = 350 µL; pH 1 (except A), 0 % NaCl (w/v) (except C); T _{ext} = 25°C (except D); agitation speed 600 rpm (except E); extraction time 30 min (except F). | 99 |
| Figure 37 : Effect of the donor pH and the extraction time on the PALME recoveries and the EFs of the five studied analytes (100 ng mL ⁻¹) in pure water (n=3). Extraction conditions: 4µl of 1-octanol in PVDF flat membrane (SLM); donor phase: pH = 1, V _d = 350 µL; 30% NaCl (w/v); acceptor phase: pH 14; V _a = 50 µL; 1000 rpm; T _{ext} = 40 °C. (Initial optimized values for donor pH and extraction time were 1 and 1H00 respectively)..... | 101 |
| Figure 38 : Effect of the extraction time on the PALME recoveries and on the EFs for the five studied AMPAs (100 ng mL ⁻¹) in spiked pure water (n=3). Extraction conditions: 4 µl of 1-octanol in PVDF flat membrane (SLM); donor phase: pH = 1, V _d = 2120 µL; 30% NaCl (w/v); acceptor phase: pH = 14; V _a = 50 µL; 1000 rpm; T _{ext} = 40 °C. | 103 |
| Figure 39: Extraction recoveries obtained with PALME of the five targeted AMPAs (0.1 µg mL ⁻¹) in different aqueous matrices (n=3). Constant parameters: 4 µl of 1-octanol in PVDF flat membrane (SLM); donor phase: pH 1, V _d = 1950 µL; 30% NaCl (w/v); acceptor phase: pH 14; V _a = 50 µL; 1000 rpm; T _{ext} = 40 °C..... | 106 |
| Figure 40 : Chromatogram of the target analytes obtained after from the application of PALME to aqueous soil extracts 1:1 (V/W) spiked at low concentrations ([PMPA] = 0.05 ng mL ⁻¹ , [CMPA] = 0.05 ng mL ⁻¹ , [iBMPA] = 0.1 ng mL ⁻¹ and [iPrMPA] = 1 ng mL ⁻¹) and analysis by LC-MS/MS in negative ionization mode: (A) TIC of MRM transitions and MRM mode for (B) PMPA (m/z 179.1→ 94.9), (C) CMPA (m/z 177.1 → 95.0), (D) iBMPA (m/z 151.1 → 95.0), (E) iPrMPA (m/z 137.0 → 95.0).. | 111 |
| Figure 41 : Représentation illustrative d'un diagramme de phase d'un solvant eutectique profond (DES) à deux composants. Représentation illustrative d'un diagramme de phase d'un solvant eutectique profond (DES) à deux composants..... | 115 |
| Figure 42 : Nombre d'articles publiés entre 2004 et 2021 sur les solvants eutectiques profonds hydrophobes - basés sur la base de données Scopus (mots-clés recherchés : solvants eutectiques profonds et solvants eutectiques profonds hydrophobes ; consultés le 01.03.2022)..... | 116 |
| Figure 43 : EFs obtained after PALME of AMPAs from pure water (results obtained previously in [232]) and urine samples spiked at 100 ng/ml (n = 3). Extraction conditions: donor phase: urine at pH 1, V _d = 1950 µl, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, V _a = 50 µl; 4 µl of solvent octanol (OCT) with or without trioctylamine (TOA) in PP (or PVDF) membrane; extraction time: 120 min; T _{ext} = 40°C; agitation rate: 1000 rpm..... | 126 |
| Figure 44 : Effect of the type of solvent on EFs of 100 ng/ml of AMPAs from spiked pure water sample by PALME (n = 3). Extraction conditions: donor phase: urine at pH = 1, V _d = 350 µl, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, V _a = 50 µl; 4 µl of solvent; extraction time: 30 min; T _{ext} = 40°C; agitation rate: 1000 rpm | 128 |
| Figure 45 : Effect of the type of solvent on EFs obtained when applying PALME to urine sample spiked at 100 ng/ml with each AMPA (n = 3). Donor phase: urine at pH 1, V _d = 1950 µl, 30% NaCl (w/v); acceptor | |

| | |
|---|-----|
| phase: NaOH(aq) solution at pH 14, Va = 50 µl; 4 µl of solvent; extraction time: 30 min; T _{ext} = 40°C; agitation rate: 1000 rpm. | 129 |
| Figure 46 : Chromatogram of the target analytes resulting from the application of DES-PALME to a urine sample spiked at low concentrations ([PMPA, CMPA, iBMPA] = 0.5 ng/ml, [iPrMPA] = 5 ng/ml and [EMPA] = 10 ng/ml) and analysis by LC–MS/MS in negative ionization mode: (A) TIC of MRM transitions and MRM mode for (B) PMPA (m/z 179.1 → 94.9), (C) CMPA (m/z 177.1 → 95.0), (D) iBMPA (m/z 151.1 → 95.0), (E) iPrMPA (m/z 137.0 → 95.0). | 131 |
| Figure 47 : Greenness assessment: AGREEprep pictograms for NaHDES-PALME-LC-MS/MS generated using the software v. 0.9 | 132 |
| Figure 48 : Facteurs d'enrichissements des AMPAs par PALME sans et après prétraitement à partir des échantillons d'urine dopés à 100 ng/ml (n = 3). Conditions d'extraction : phase donneuse : urine à pH 1, Vd = 1950 µL, 30% NaCl (w/v) ; phase acceptrice : eau pure à pH 14, Va = 50 µL ; 4 µL d'octanol en PVDF ; temps d'extraction : 120 min ; T° = 40°C ; vitesse d'agitation : 1000 rpm. | 138 |
| Figure 49 : Illustration des deux modes de transferts biphasique et triphasique en PALME pour un seul échantillon. | 142 |
| Figure 50 : Différentes étapes du flux de travaux pour une extraction PALME. | 150 |
| Figure 51 : Schematic illustration of the difference of geometry between HF-LPME and PALME (A). Picture of the hole set-up used for PALME (B): the donor plate (1), the acceptor plate (with white filter PVDF membranes) (2), the lid (3) and the bi-plate shaker (4). | 152 |
| Figure 52 : Effect of the organic solvent on the extraction recovery of 0.1 µg mL ⁻¹ of PMPA from pure water (n = 3). Extraction conditions: membrane material: PVDF; donor phase: pH 1, Vd = 350 µL, 0 % NaCl (w/v); acceptor phase: pH 13, Va = 50 µL; immersion of 4 µL of different organic solvents; extraction time: 30 min; temperature: 25 °C and stirring speed: 600 rpm. | 152 |
| Figure 53 : Picture of the hole set-up used for PALME: the deep well donor plate (1), the acceptor plate (with white filter PVDF membranes) (2), the lid (3) and the bi-plate shaker (4). | 158 |
| Figure 54 : Effect of the type of membrane material on EFs obtained when applying PALME to urine sample spiked at 100 ng/ml with each AMPA (n = 3). Donor phase: urine at pH 1, Vd = 1950 µl, 30% NaCl (w/v); acceptor phase: NaOH(aq) solution at pH 14, Va = 50 µl; 4 µl of DES 6; extraction time: 30 min; T _{ext} = 40°C; agitation rate: 1000 rpm. | 158 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des agents chimiques neurotoxiques de guerre | 20 |
| Tableau 2 : Propriétés physicochimiques des produits de dégradation des agents chimiques neurotoxiques de guerre..... | 24 |
| Tableau 3 : Limites de détection (en ng injecté) obtenues pour l'analyse des AMPA par différentes méthodes..... | 32 |
| Tableau 4 : Etat de l'art des méthodes HF-LPME en mode biphasique et triphasique pour l'extraction et l'analyse des AMPAs | 59 |
| Tableau 5 : Comparaison entre les valeurs de paramètres d'extraction en HF-LPME entre deux études menées pour l'analyse des AMPA dans l'eau pure et les valeurs FE obtenues pour les analytes ciblés en commun par les deux méthodes | 62 |
| Tableau 6 : Comparaison entre les paramètres optimisés et les performances de la EME à travers une membrane en forme de poche et la HF-EME | 66 |
| Tableau 7 : Comparaison entre la PALME avec les méthodes courantes de traitement de l'échantillon. | 75 |
| Tableau 8 : Synthèse de tous les travaux portant sur la technique PALME | 76 |
| Table 9 : Linearity and repeatability of the PALME-LC–MS/MS method for AMPAs in pure water..... | 104 |
| Table 10 : Limits of quantification (S/N = 10) obtained for each AMPA in pure water, simulated waste water, river water and aqueous soil extracts after PALME and LC–MS/MS analysis. n.a.: not applicable. | 106 |

| | |
|--|-----|
| Table 11 : Comparison of the current PALME method with other sample preparation techniques for the determination of AMPAs in water and soil samples | 108 |
| Table 12 : List of the synthesized NaHDESs tested as a SLM in this study | 123 |
| Table 13 : figures of merit of the DES-PALME-LC-MS/MS method applied to urine samples..... | 130 |
| Table 14 : Comparison of the NaHDES-PALME method with other sample preparation techniques for the determination of AMPAs in urine. | 134 |
| Table S. 1 : Physicochemical properties of the studied alkyl methylphosphonic acids. | 153 |
| Table S. 2 : Parameters applied in ESI-MS detection (MRM mode)..... | 153 |
| Table S. 3 : Characteristics of the studied membranes | 153 |
| Table S. 4 : Comparison between previous HF-LPME and PALME of PMPA in pure water..... | 154 |
| Table S. 5 : Physicochemical properties of the studied alkyl methylphosphonic acids. | 156 |
| Table S. 6 : Parameters applied in ESI-MS detection (MRM mode). | 156 |
| Table S. 7 : Characteristics of the studied membranes | 157 |
| Table S. 8 : Input used to assign AGREEprep score for NaHDES-PALME-LC-MS/MS method..... | 157 |

REFERENCES

- [1] V. Pitschmann, Overall view of chemical and biochemical weapons, *Toxins (Basel)*. 6 (2014) 1761–1784. <https://doi.org/10.3390/toxins6061761>.
- [2] A. Richardt, H. Birgit, *CBRN Protection :Managing the Threat ofChemical, Biological, Radioactive and Nuclear Weapons*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527650163>.
- [3] A. Hay, Old dogs or new tricks: Chemical warfare at the millennium, *Med. Confl. Surviv.* 16 (2000) 37–41. <https://doi.org/10.1080/13623690008409494>.
- [4] OIAC, *Destruction Timelines*, (n.d.). <https://www.opcw.org/our-work/eliminating-chemical-weapons> (accessed January 17, 2019).
- [5] J. Ledgard, *The Preparatory Manual of Chemical Warfare Agents*, 2012.
- [6] F.R. Hartley, ed., *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 1996. <https://doi.org/10.1002/0470034351>.
- [7] C.P. Holstege, M. Kirk, F.R. Sidell, Chemical warfare: Nerve agent poisoning, *Crit. Care Clin.* 13 (1997) 923–942. [https://doi.org/10.1016/S0749-0704\(05\)70374-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0704(05)70374-2).
- [8] R.G. Darling, E.E. Noste, *Future Biological and Chemical Weapons*, in: *Ciottoné’s Disaster Med.*, 2nd ed., Elsevier, 2016: pp. 489–498. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28665-7.00080-7>.
- [9] J.A. Vale, T.C. Marrs, R.L. Maynard, Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK, *Clin. Toxicol.* 56 (2018) 1–5. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1469759>.
- [10] J. Patocka, *SUBSTANCES FROM THE COLD WAR PERIOD*, *Mil. Med. Sci. Lett.* (2018).
- [11] E. Nepovimova, K. Kuca, Chemical warfare agent NOVICHOK - mini-review of available data, *Food Chem. Toxicol.* 121 (2018) 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.015>.
- [12] P.R. Chai, B.D. Hayes, T.B. Erickson, E.W. Boyer, Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective, *Toxicol. Commun.* 2 (2018) 45–48. <https://doi.org/10.1080/24734306.2018.1475151>.
- [13] Z.P.A. Eden Joy Pacsial-Ong, Chemical warfare agent detection: a review of current trends and future perspective, *Front. Biosci.* 5 (2013) 516–543. https://www.researchgate.net/profile/Zoraida_Aguilar/publication/234019460_Chemical_warfare_agent_detection_A_review_of_current_trends_and_future_perspective/links/563a648608ae405111a5871a.pdf.
- [14] S.E. Hosseini, H. Saeidian, A. Amozadeh, M.T. Naseri, M. Babri, Fragmentation pathways and structural characterization of organophosphorus compounds related to the Chemical Weapons Convention by electron ionization and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 2585–2593. <https://doi.org/10.1002/rcm.7757>.
- [15] C. Roux, J. Chable, P. Margot, Fibre transfer experiments onto car seats, *Sci. Justice.* 36 (1996) 143–151. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(96\)72589-3](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(96)72589-3).
- [16] OPCW, *UPGRADING THE OPCW CHEMICAL LABORATORY TO A CENTRE FOR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY*, DEN HAAG, 2017. https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2017/en/s-1512-2017_e_.pdf.
- [17] M. Balali-Mood, S. Mousavi, B. Balali-Mood, Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans, *Emerg. Health Threats J.* 1 (2008) e7. <https://doi.org/10.3134/ehjt.08.007>.
- [18] S. Sezigen, K. Ivelik, M. Ortatatli, M. Almacioglu, M. Demirkasimoglu, R.K. Eyison, Z.I. Kunak, L. Kenar, Victims of chemical terrorism, a family of four who were exposed to sulfur mustard, *Toxicol. Lett.* 303 (2019) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.006>.
- [19] M. Balali-Mood, M. Hefazi, The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19 (2005) 297–315. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00325.x>.
- [20] R.R. McGuire, J.C. Compton, eds., *Environmental Aspects of Converting CW Facilities to Peaceful*

- Purposes, NATO Scien, Springer Netherlands, Dordrecht, 2002. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-0508-1>.
- [21] R.C. Gupta, ed., *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Second edi, Elsevier, USA, 2009.
- [22] J. Nawała, K. Czupryński, S. Popiel, D. Dziedzic, J. Bełdowski, J. Nawa, K. Czupry, Development of the HS-SPME-GC-MS/MS method for analysis of chemical warfare agent and their degradation products in environmental samples, *Anal. Chim. Acta.* 933 (2016) 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.033>.
- [23] H. Sanderson, P. Fauser, M. Thomsen, P.B. Sørensen, Human health risk screening due to consumption of fish contaminated with chemical warfare agents in the Baltic Sea, *J. Hazard. Mater.* 162 (2009) 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.059>.
- [24] C. Della Torre, T. Petochi, C. Farchi, I. Corsi, M.M. Dinardo, V. Sammarini, L. Alcaro, L. Mechelli, S. Focardi, A. Tursi, G. Marino, E. Amato, Environmental hazard of yperite released at sea: sublethal toxic effects on fish, *J. Hazard. Mater.* 248–249 (2013) 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.003>.
- [25] M. Czub, L. Kotwicki, T. Lang, H. Sanderson, Z. Klusek, M. Grabowski, M. Szubska, J. Jakacki, J. Andrzejewski, D. Rak, J. Bełdowski, Deep sea habitats in the chemical warfare dumping areas of the Baltic Sea, *Sci. Total Environ.* 616–617 (2018) 1485–1497. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.165>.
- [26] H. Sanderson, P. Fauser, M. Thomsen, P. Vanninen, M. Soderstrom, Y. Savin, I. Khalikov, A. Hirvonen, S. Niiranen, T. Missiaen, A. Gress, P. Borodin, N. Medvedeva, Y. Polyak, V. Paka, V. Zhurbas, P. Feller, Environmental Hazards of Sea-Dumped Chemical Weapons, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4389–4394. <https://doi.org/10.1021/es903472a>.
- [27] T. Missiaen, M. Söderström, I. Popescu, P. Vanninen, Evaluation of a chemical munition dumpsite in the Baltic Sea based on geophysical and chemical investigations, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3536–3553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.056>.
- [28] J. Bełdowski, Z. Klusek, M. Szubska, R. Turja, A.I. Bulczak, D. Rak, M. Brenner, T. Lang, L. Kotwicki, K. Grzelak, J. Jakacki, N. Fricke, A. Östin, U. Olsson, J. Fabisiak, G. Garnaga, J.R. Nyholm, P. Majewski, K. Broeg, M. Söderström, P. Vanninen, S. Popiel, J. Nawała, K. Lehtonen, R. Berglind, B. Schmidt, Chemical Munitions Search & Assessment—An evaluation of the dumped munitions problem in the Baltic Sea, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 128 (2016) 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.01.017>.
- [29] E. Amato, L. Alcaro, I. Corsi, C. Della Torre, C. Farchi, S. Focardi, G. Marino, A. Tursi, An integrated ecotoxicological approach to assess the effects of pollutants released by unexploded chemical ordnance dumped in the southern Adriatic (Mediterranean Sea), *Mar. Biol.* 149 (2006) 17–23. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0216-x>.
- [30] M. Mesilaakso, *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis. Sample Collection, Preparation and Analytical Methods*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2005. <https://doi.org/10.1002/0470012285>.
- [31] ORGANISATION POUR L'INTERDICTION DES ARMES CHIMIQUES, *Convention Sur L'Interdiction De La Mise Au Point, De La Fabrication, Du Stockage Et De L'Emploi Des Armes Chimiques Et Sur Leur Destruction*, La Haye, 1993. <https://www.opcw.org>.
- [32] OIAC, Designated laboratories, (n.d.) 1. <https://www.opcw.org/designated-laboratories-0> (accessed January 17, 2019).
- [33] L. Konopski, P. Liu, W. Wuryani, M. Śliwakowski, OPCW proficiency test: A practical approach also for interlaboratory test on detection and identification of pesticides in environmental matrices, *Sci. World J.* 2014 (2014) 1–25. <https://doi.org/10.1155/2014/542357>.
- [34] V. Dubey, S. Velikeloth, M. Sliwakowski, G. Mallard, Official proficiency tests of the organisation for the prohibition of chemical weapons: current status and future directions, *Accredit. Qual. Assur.* 14 (2009) 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00769-009-0520-0>.
- [35] OIAC, STATUS OF LABORATORIES DESIGNATED FOR ANALYSIS OF AUTHENTIC ENVIRONMENTAL SAMPLES, L, n.d. https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2018/en/s-1616-

- 2018_e_.pdf.
- [36] N. Grigoriu, G. Epure, R. Ginghina, D. Mosteanu, An Overview Of The OPCW's Programme For Biomedical Samples Analysis, *Int. Conf. KNOWLEDGE-BASED Organ.* 21 (2015) 815–820. <https://doi.org/10.1515/kbo-2015-0138>.
- [37] OIAC, STATUS OF LABORATORIES DESIGNATED FOR THE ANALYSIS OF BIOMEDICAL SAMPLES, La Haye, n.d. https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2018/en/s-1661-2018_e_.pdf.
- [38] K. Kuča, M. Pohanka, Chemical warfare agents, in: *EXS*, 2010: pp. 543–558. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1_16.
- [39] CONVENTION ON THE PROHIBITION OF THE DEVELOPMENT, PRODUCTION, STOCKPILING AND USE OF CHEMICAL WEAPONS AND ON THEIR DESTRUCTION, 2005. https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_en.pdf.
- [40] P. Vanninen, ed., Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament, Ministry of Defence, University of Helsinki, 2017. <http://www.helsinki.fi/verifin/bluebook/BlueBook.pdf>.
- [41] P. Rearden, P.B. Harrington, Rapid screening of precursor and degradation products of chemical warfare agents in soil by solid-phase microextraction ion mobility spectrometry (SPME–IMS), *Anal. Chim. Acta.* 545 (2005) 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.035>.
- [42] A.F. Kingery, H.E. Allen, The environmental fate of organophosphorus nerve agents: A review, *Toxicol. Environ. Chem.* 47 (1995) 155–184. <https://doi.org/10.1080/02772249509358137>.
- [43] E. Fischer, M. Blum, W.S. Alwan, J.E. Forman, Spring 2015 ConfChem: Science Disarmament and Diplomacy in Chemical Education The Example of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, (2016) 1–14.
- [44] S.W. Wiener, R.S. Hoffman, Nerve Agents: A Comprehensive Review, *J. Intensive Care Med.* 19 (2004) 22–37. <https://doi.org/10.1177/0885066603258659>.
- [45] B. Picard, I. Chataigner, J. Maddaluno, J. Legros, Introduction to chemical warfare agents, relevant simulants and modern neutralisation methods, *Org. Biomol. Chem.* 17 (2019) 6528–6537. <https://doi.org/10.1039/C9OB00802K>.
- [46] E. Raber, R. McGuire, Oxidative decontamination of chemical and biological warfare agents using L-Gel, *J. Hazard. Mater.* 93 (2002) 339–352. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(02\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(02)00051-1).
- [47] Z. Yue, C. Mangun, J. Economy, P. Kemme, D. Cropek, S. Maloney, Removal of Chemical Contaminants from Water to below USEPA MCL Using Fiber Glass Supported Activated Carbon Filters, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2844–2848. <https://doi.org/10.1021/es001858r>.
- [48] V.T. Borrett, T.-H. Gan, B.R. Lakeland, D. Ralph Leslie, R.J. Mathews, E.R. Mattsson, S. Riddell, V. Tantarò, Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of amiton and the recovery of amiton from concrete, paint, rubber and soil matrices, *J. Chromatogr. A.* 1003 (2003) 143–155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00774-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00774-X).
- [49] S.L. Bartelt-Hunt, D.R.U. Knappe, M.A. Barlaz, A Review of Chemical Warfare Agent Simulants for the Study of Environmental Behavior, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38 (2008) 112–136. <https://doi.org/10.1080/10643380701643650>.
- [50] B.T. Røen, S.R. Sellevåg, K.E. Dybendal, E. Lundanes, Trace determination of primary nerve agent degradation products in aqueous soil extracts by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry using ZrO₂ for enrichment, *J. Chromatogr. A.* 1329 (2014) 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.004>.
- [51] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, A. Varenne, N. Delaunay, P. Gareil, B. Bellier, E.C. Sm, Le couplage EC/SM pour la détection et l'identification de produits de dégradation d'agents de guerre chimique RÉSUMÉ, *SPECTRA Anal.* (2007) 33–38.
- [52] P. Vanninen, ed., Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament, 2011. <http://www.helsinki.fi/verifin/bluebook/BlueBook.2011.01.pdf>.
- [53] S.A. Young, B.R. Capacio, The Application of a Single-Column GC–MS–MS Method for the Rapid Analysis of Chemical Warfare Agents and Breakdown Products, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 179–187. <https://doi.org/10.1093/jat/bky085>.

- [54] N.B. Munro, S.S. Talmage, G.D. Griffin, L.C. Waters, A.P. Watson, J.F. King, V. Hauschild, The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products., *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 933–974. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107933>.
- [55] No Title, (n.d.). www.chemicalize.com.
- [56] K.K. Kroening, R.N. Easter, D.D. Richardson, S.A. Willison, J.A. Caruso, *Analysis of Chemical Warfare Degradation Products*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2011. <https://doi.org/10.1002/9781119993681>.
- [57] C.A. Valdez, R.N. Leif, Analysis of organophosphorus-based nerve agent degradation products by gas chromatography-mass spectrometry (Gc-ms): Current derivatization reactions in the analytical chemist’s toolbox, *Molecules.* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26154631>.
- [58] C. B’Hymer, A Brief Overview of HPLC–MS Analysis of Alkyl Methylphosphonic Acid Degradation Products of Nerve Agents, *J. Chromatogr. Sci.* 57 (2019) 606–617. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz034>.
- [59] J. Puton, J. Namieśnik, Ion mobility spectrometry: Current status and application for chemical warfare agents detection, *TrAC Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.002>.
- [60] G.A. Pianetti, M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, Determination of alkylphosphonic acids by capillary zone electrophoresis using indirect UV detection, *J. Chromatogr. A.* 630 (1993) 371–377. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80474-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80474-M).
- [61] I.S. Che Sulaiman, B.W. Chieng, F.E. Pojol, K.K. Ong, J.I. Abdul Rashid, W.M.Z. Wan Yunus, N.A. Mohd Kasim, N. Abdul Halim, S.A. Mohd Noor, V.F. Knight, A review on analysis methods for nerve agent hydrolysis products, *Forensic Toxicol.* 38 (2020) 297–313. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00513-x>.
- [62] M.T. Söderström, H. Björk, V.M.A. Häkkinen, O. Kostianen, M. Kuitunen, M. Rautio, Identification of compounds relevant to the chemical weapons convention using selective gas chromatography detectors, gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy in an international trial proficiency, *J. Chromatogr. A.* 742 (1996) 191–203. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00182-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00182-3).
- [63] G.A. Sega, B.A. Tomkins, W.H. Griest, Analysis of methylphosphonic acid, ethyl methylphosphonic acid and isopropyl methylphosphonic acid at low microgram per liter levels in groundwater, *J. Chromatogr. A.* 790 (1997) 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00747-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00747-4).
- [64] W.R. Creasy, A.A. Rodríguez, J.R. Stuff, R.W. Warren, Atomic emission detection for the quantitation of trimethylsilyl derivatives of chemical-warfare-agent related compounds in environmental samples, *J. Chromatogr. A.* 709 (1995) 333–344. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00451-R](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00451-R).
- [65] J.R. Stuff, W.R. Creasy, A.A. Rodriguez, H.D. Durst, Gas chromatography with atomic emission detection as an aid in the identification of chemical warfare related material, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 644–651. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(199911\)11:9<644::AID-MCS2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(199911)11:9<644::AID-MCS2>3.0.CO;2-5).
- [66] M. KANAMORI-KATAOKA, M. TACHIKAWA, R. SEKIOKA, H. SEKIGUCHI, H. MARUKO, T. SATO, Y. SETO, Analysis of Chemical Warfare Agents and Their Related Compounds Using Gas Chromatograph with Atomic Emission Detector, *BUNSEKI KAGAKU.* 61 (2012) 969–977. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.61.969>.
- [67] C.A. Valdez, R.N. Leif, S. Hok, B.R. Hart, Analysis of chemical warfare agents by gas chromatography-mass spectrometry: Methods for their direct detection and derivatization approaches for the analysis of their degradation products, *Rev. Anal. Chem.* 37 (2018) 1–26. <https://doi.org/10.1515/revac-2017-0007>.
- [68] P. Husek, P. Simek, Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. Review on a Decade Use of the Reagents as Esterifying Agents, *Curr. Pharm. Anal.* 2 (2006) 23–43. <https://doi.org/10.2174/157341206775474007>.
- [69] R.M. Black, B. Muir, Derivatization reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 253–281.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00183-3).

- [70] J.G. Purdon, J.G. Pagotto, R.K. Miller, Preparation, stability and quantitative analysis by gas chromatography and gas chromatography-electron impact mass spectrometry of *tert*-butyldimethylsilyl derivatives of some alkylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids, *J. Chromatogr. A.* 475 (1989) 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89681-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89681-3).
- [71] M. Kanamori-Kataoka, Y. Seto, Laboratory Identification of the Nerve Gas Hydrolysis Products Alkyl Methylphosphonic Acids and Methylphosphonic Acid, by Gas Chromatography-mass Spectrometry after *tert*-Butyldimethylsilylation, *J. Heal. Sci.* 54 (2008) 513–523. <https://doi.org/10.1248/jhs.54.513>.
- [72] A. Presser, A. Hfner, Trimethylsilyldiazomethane? A Mild and Efficient Reagent for the Methylation of Carboxylic Acids and Alcohols in Natural Products, *Monatshefte For Chemie/Chemical Mon.* 135 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00706-004-0188-4>.
- [73] K. Amphaisri, M. Palit, G. Mallard, Thermally assisted methylation and subsequent silylation of scheduled acids of chemical weapon convention for on-site analysis and its comparison with the other methods of methylation, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 972–980. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.065>.
- [74] C.A. Valdez, R.N. Leif, A. Alcaraz, Effective methylation of phosphonic acids related to chemical warfare agents mediated by trimethyloxonium tetrafluoroborate for their qualitative detection and identification by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 933 (2016) 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.034>.
- [75] C.A. Valdez, M.K. Marchioretto, R.N. Leif, S. Hok, Efficient derivatization of methylphosphonic and aminoethylsulfonic acids related to nerve agents simultaneously in soils using trimethyloxonium tetrafluoroborate for their enhanced, qualitative detection and identification by EI-GC-MS and GC-FPD, *Forensic Sci. Int.* 288 (2018) 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.041>.
- [76] C.A. Valdez, R.N. Leif, S. Hok, A.K. Vu, E.P. Salazar, A. Alcaraz, Methylation protocol for the retrospective detection of isopropyl-, pinacolyl- and cyclohexylmethylphosphonic acids, indicative markers for the nerve agents sarin, soman and cyclosarin, at low levels in soils using EI-GC-MS, *Sci. Total Environ.* 683 (2019) 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.205>.
- [77] R. Subramaniam, C. Åstot, L. Juhlin, C. Nilsson, A. Östin, A. Östin, Direct derivatization and rapid GC-MS screening of nerve agent markers in aqueous samples, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7452–7459. <https://doi.org/10.1021/ac101604n>.
- [78] R. Subramaniam, A. Östin, C. Nilsson, C. Åstot, Direct derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry identification of nerve agent biomarkers in urine samples, *J. Chromatogr. B.* 928 (2013) 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.009>.
- [79] J.R. Nyholm, T. Gustafsson, A. Östin, Structural determination of nerve agent markers using gas chromatography mass spectrometry after derivatization with 3-pyridyldiazomethane, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 813–822. <https://doi.org/10.1002/jms.3225>.
- [80] K.M. Kubachka, D.D. Richardson, D.T. Heitkemper, J.A. Caruso, Detection of chemical warfare agent degradation products in foods using liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1202 (2008) 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.028>.
- [81] J. Riches, Analysis of Polar Nerve Agent Hydrolysis Products, *Chromatogr. TODAY.* (2013) 36–38. https://www.chromatographytoday.com/article/bioanalytical/40/james_riches/analysis_of_polar_nerve_agent_hydrolysis_products/1484.
- [82] D.B. Mawhinney, E.I. Hamelin, R. Fraser, S.S. Silva, A.J. Pavlopoulos, R.J. Kobelski, The determination of organophosphonate nerve agent metabolites in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 852 (2007) 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.01.023>.
- [83] B.T. Røen, S.R. Sellevåg, E. Lundanes, On-line solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of nerve agent degradation products in water samples, *Anal. Chim. Acta.* 761 (2013) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.053>.
- [84] B.T. Røen, S.R. Sellevåg, E. Lundanes, Quantification of nerve agent biomarkers in human serum

- and urine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11833–11840. <https://doi.org/10.1021/ac503408x>.
- [85] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, HILIC methods in pharmaceutical analysis, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698–715. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900742>.
- [86] V. Tak, D. Pardasani, P.K. Kanaujia, D.K. Dubey, Liquid-liquid-liquid microextraction of degradation products of nerve agents followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4319–4328. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.039>.
- [87] C. Desoubries, F. Chapuis-Hugon, A. Bossée, V. Pichon, Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction of organophosphorous nerve agent degradation products from complex samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 900 (2012) 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.029>.
- [88] S.A. Willison, Investigation of the Persistence of Nerve Agent Degradation Analytes on Surfaces through Wipe Sampling and Detection with Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1034–1041. <https://doi.org/10.1021/ac503777z>.
- [89] E.W.. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.T. Brinkman, Determination of alkylphosphonic acids by microcolumn liquid chromatography with gradient elution coupled on-line with flame photometric detection, *J. Chromatogr. A.* 907 (2001) 165–172. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01005-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01005-0).
- [90] C.E. Kientz, A. Verweij, G.J. De Jong, U.A. Th. Brinkman, Verification of nonproduction of chemical warfare agents: I. Determination of organophosphorus compounds by microcolumn liquid chromatography with flame photometric or thermionic detection, *J. Microcolumn Sep.* 4 (1992) 465–475. <https://doi.org/10.1002/mcs.1220040602>.
- [91] P.C. Bossle, J.J. Martin, E.W. Sarver, H.Z. Sommer, High-performance liquid chromatography analysis of alkyl methylphosphonic acids by derivatization, *J. Chromatogr. A.* 267 (1983) 209–212. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90834-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90834-9).
- [92] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.T. Brinkman, Analytical separation techniques for the determination of chemical warfare agents, *J. Chromatogr. A.* 982 (2002) 177–200. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01426-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01426-7).
- [93] E.W.. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.T. Brinkman, Analytical separation techniques for the determination of chemical warfare agents, *J. Chromatogr. A.* 982 (2002) 177–200. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01426-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01426-7).
- [94] A. Weissberg, M. Madmon, S. Dagan, Determination of organophosphorus acids by liquid chromatography positive electrospray ionization tandem mass spectrometry after chemical derivatization, *Int. J. Mass Spectrom.* 408 (2016) 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.08.014>.
- [95] E.D. Pusfitasari, Comparison of ESI, Unispray, and APCI in LC-MS/MS Analysis of Sarin Metabolite Isopropyl Methylphosphonic Acid, University of Helsinki, 2019.
- [96] I. Rodin, A. Braun, A. Stavrianidi, T. Baygildiev, O. Shpigun, D. Oreshkin, I. Rybalchenko, ‘Dilute-and-Shoot’ RSLC–MS-MS Method for Fast Detection of Nerve and Vesicant Chemical Warfare Agent Metabolites in Urine, *J. Anal. Toxicol.* 39 (2015) 69–74. <https://doi.org/10.1093/jat/bku119>.
- [97] N.L. Koryagina, E.I. Savel’eva, N.S. Khlebnikova, A.I. Ukolov, E.S. Ukolova, G. V. Karakashev, A.S. Radilov, Chromatography–mass spectrometry determination of alkyl methylphosphonic acids in urine, *J. Anal. Chem.* 71 (2016) 1309–1318. <https://doi.org/10.1134/S1061934816140069>.
- [98] Q. Liu, X. Hu, J. Xie, Determination of nerve agent degradation products in environmental samples by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization, *Anal. Chim. Acta.* 512 (2004) 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.023>.
- [99] M. Otsuka, K. Tsuge, Y. Seto, H. Miyaguchi, M. Uchiyama, Analysis of degradation products of nerve agents via post-pentafluorobenzoylation liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1577 (2018) 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.042>.
- [100] K.M. Rubin, K.M. Rubin, B.A. Goldberger, T.J. Garrett, Detection of Chemical Weapon Nerve Agents in Bone by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2020) 391–401. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz118>.

- [101] V. Tak, A. Purohit, D. Pardasani, D.R. Goud, R. Jain, D.K. Dubey, Simultaneous detection and identification of precursors, degradation and co-products of chemical warfare agents in drinking water by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1370 (2014) 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.030>.
- [102] M. Koller, C. Becker, H. Thiermann, F. Worek, GC–MS and LC–MS analysis of nerve agents in body fluids: Intra-laboratory verification test using spiked plasma and urine samples, *J. Chromatogr. B.* 878 (2010) 1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.12.023>.
- [103] J.Y. Lee, Y.H. Lee, Rapid screening and determination of nerve agent metabolites in human urine by LC-MS/MS, *J. Anal. Chem.* 69 (2014) 909–916. <https://doi.org/10.1134/S1061934814090081>.
- [104] M. Katagi, M. Tatsuno, M. Nishikawa, H. Tsuchihashi, On-line solid-phase extraction liquid chromatography-continuous flow frit fast atom bombardment mass spectrometric and tandem mass spectrometric determination of hydrolysis products of nerve agents alkyl methylphosphonic acids by p-bromophenacyl derivatiz, *J. Chromatogr. A.* 833 (1999) 169–179. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01049-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01049-8).
- [105] V. Tak, A. Purhoit, D. Pardasani, P. Garg, R. Jain, D.K. Dubey, Determination of alkyl alkylphosphonic acids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry using a dicationic reagent, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 2637–2648. <https://doi.org/10.1002/rcm.6384>.
- [106] Z. Witkiewicz, S. Neffe, E. Sliwka, J. Quagliano, Analysis of the Precursors, Simulants and Degradation Products of Chemical Warfare Agents, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 48 (2018) 337–371. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1439366>.
- [107] S. Vucinic, B. Antonijevic, A.M. Tsatsakis, L. Vassilopoulou, A.O. Docea, A.E. Nosyrev, B.N. Izotov, H. Thiermann, N. Drakoulis, D. Brkic, Environmental exposure to organophosphorus nerve agents, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56 (2017) 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.004>.
- [108] R.M. Black, R.W. Read, Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 421–437. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-1005-1>.
- [109] A.S. Appel, B.A. Logue, Analysis of nerve agent metabolites from nail clippings by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1031 (2016) 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.034>.
- [110] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [111] Á.I. López-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjerggaard, V.G. Zuin, S.A. Ozkan, E. Psillakis, The Ten Principles of Green Sample Preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* (2022) 116530. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116530>.
- [112] R.E. Majors, *Sample preparation fundamentals for chromatography*, Agil. Technol. Mississauga, Canada. (2013).
- [113] D. Noort, A.G. Hulst, D.H.J.M. Platenburg, M. Polhuijs, H.P. Benschop, Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage, *Arch. Toxicol.* 72 (1998) 671–675. <https://doi.org/10.1007/s002040050559>.
- [114] I.N. Stan'kov, A.A. Sergeeva, I.D. Derevyagina, K. V. Konovalov, Gas-Chromatographic Determination of Sarin, Soman, and O -Isobutyl S -2-(N , N -Diethylamino)ethyl Methylphosphonothioate (a VX-Like Compound) Traces in Water, *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 160–164. <https://doi.org/10.1023/A:1022362206338>.
- [115] R.A. Meyers, ed., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2000. <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470027318>.
- [116] F.F. Cantwell, M. Losier, Chapter 11 Liquid–liquid extraction, in: 2002: pp. 297–340. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(02\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(02)80048-4).
- [117] Liquid liquid extraction, (n.d.). <https://www.shutterstock.com/fr/image-illustration/schema-liquidliquid-extraction-beaker-510367069> (accessed March 21, 2019).

- [118] H. John, F. Worek, H. Thiermann, LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 97–116. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1925-z>.
- [119] D. Pardasani, M. Palit, A.K. Gupta, P. Shakya, K. Sekhar, D.K. Dubey, Sample Preparation of Organic Liquid for Off-Site Analysis of Chemical Weapons Convention Related Compounds, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1172–1176. <https://doi.org/10.1021/ac0486138>.
- [120] V.D. Serban C. Moldoveanu, *Modern Sample Preparation for Chromatography*, Elsevier, 2015. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-00093-5>.
- [121] V. PICHON, *Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques*, 2006. <https://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42385210-p1420.pdf>.
- [122] J. Riches, I. Morton, R.W. Read, R.M. Black, The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography–ion trap negative ion tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 816 (2005) 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.11.039>.
- [123] M.L. Shih, J.R. Smith, J.D. McMonagle, T.W. Dolzine, V.C. Gresham, Detection of metabolites of toxic alkylmethylphosphonates in biological samples, *Biol. Mass Spectrom.* 20 (1991) 717–723. <https://doi.org/10.1002/bms.1200201111>.
- [124] S. Fredriksson, L.-G. Hammarström, L. Henriksson, H. Lakso, Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biological samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 1133–1143. <https://doi.org/10.1002/jms.1190300810>.
- [125] M. Kataoka, Y. Seto, Discriminative determination of alkyl methylphosphonates and methylphosphonate in blood plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry after tert.-butyldimethylsilylation, *J. Chromatogr. B.* 795 (2003) 123–132. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00548-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00548-8).
- [126] P.K. Kanaujia, D. Pardasani, A.K. Gupta, R. Kumar, R.K. Srivastava, D.K. Dubey, Extraction of acidic degradation products of organophosphorus chemical warfare agents Comparison between silica and mixed-mode strong anion-exchange cartridges, *J. Chromatogr. A.* 1161 (2007) 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.076>.
- [127] U.V.R. Vijaya Saradhi, S. Prabhakar, T. Jagadeshwar Reddy, M.R.V.S. Murty, Gas chromatographic–mass spectrometric determination of alkylphosphonic acids from aqueous samples by ion-pair solid-phase extraction on activated charcoal and methylation, *J. Chromatogr. A.* 1157 (2007) 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.057>.
- [128] M.C. Carson, Ion-pair solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 343–350. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00471-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00471-4).
- [129] U.V.R.V. Saradhi, S. Prabhakar, T.J. Reddy, M. Vairamani, Ion-pair solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometric determination of acidic hydrolysis products of chemical warfare agents from aqueous samples, *J. Chromatogr. A.* 1129 (2006) 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.080>.
- [130] S. Pal Anagoni, A. Kauser, G. Maity, V.V.R. Upadhyayula, Quantitative determination of acidic hydrolysis products of Chemical Weapons Convention related chemicals from aqueous and soil samples using ion-pair solid-phase extraction and in situ butylation, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 689–696. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700955>.
- [131] M. Blanca, A. Shifrovitch, S. Dachir, S. Lazar, M. Elgarisi, D. Marder, T. Shamai Yamin, S. Baranes, M. Avraham, H. Dekel Jaoui, S. Dagan, A. Weissberg, Highly sensitive retrospective determination of organophosphorous nerve agent biomarkers in human urine implemented in vivo in rabbit, *Arch. Toxicol.* 94 (2020) 3033–3044. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02827-x>.
- [132] A. Spietelun, M. Pilarczyk, A. Kloskowski, J. Namieśnik, Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4524. <https://doi.org/10.1039/c003335a>.
- [133] M. Zi-Hui, L. Qin, Determination of degradation products of nerve agents in human serum by solid phase extraction using molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* 435 (2001) 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00858-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00858-3).

- [134] S. Le Moullec, A. Bégos, V. Pichon, B. Bellier, Selective extraction of organophosphorus nerve agent degradation products by molecularly imprinted solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 1108 (2006) 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.105>.
- [135] S.D. Harvey, Molecularly imprinted polymers for selective analysis of chemical warfare surrogate and nuclear signature compounds in complex matrices, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1221–1230. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301702>.
- [136] M.F. Liron, Zvi, Avraham Bromberg, ed., *Novel Approaches in Biosensors and Rapid Diagnostic Assays*, Springer, 2001.
- [137] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, *J. Chromatogr. A.* 1152 (2007) 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.046>.
- [138] S.X.L. Goh, A. Duarah, L. Zhang, S.A. Snyder, H.K. Lee, Online solid phase extraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of estrogens and glucocorticoids in water, *J. Chromatogr. A.* 1465 (2016) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.040>.
- [139] M. Rogeberg, H. Malerod, H. Roberg-Larsen, C. Aass, S.R. Wilson, On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.006>.
- [140] L.L. Swaim, R.C. Johnson, Y. Zhou, C. Sandlin, J.R. Barr, Quantification of Organophosphorus Nerve Agent Metabolites Using a Reduced-Volume, High-Throughput Sample Processing Format and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 774–777. <https://doi.org/10.1093/jat/32.9.774>.
- [141] E.I. Hamelin, W. Bragg, R.L. Shaner, L.L. Swaim, R.C. Johnson, Comparison of high-resolution and tandem mass spectrometry for the analysis of nerve agent metabolites in urine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 1697–1704. <https://doi.org/10.1002/rcm.6621>.
- [142] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [143] K. Schmidt, I. Podmore, Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer, *J. Biomarkers.* 2015 (2015) 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/981458>.
- [144] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. Marcé, Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 557–568. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00145-4).
- [145] Y. Picó, M. Fernández, M.J. Ruiz, G. Font, Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.10.010>.
- [146] H. Kataoka, New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 232–244. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00402-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00402-3).
- [147] S. Popiel, M. Sankowska, Determination of chemical warfare agents and related compounds in environmental samples by solid-phase microextraction with gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8457–8479. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.066>.
- [148] B. Zygmunt, A. Zaborowska, J. Swiatowska, J. Namiesnik, Solid Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography - A Powerful Tool for the Determination of Chemical Warfare Agents and Related Compounds, *Curr. Org. Chem.* 11 (2007) 241–253. <https://doi.org/10.2174/138527207779940847>.
- [149] M. Heyl, R. McGuire, eds., *Analytical Chemistry Associated with the Destruction of Chemical Weapons*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1997. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5600-4>.
- [150] M.T. Sng, W.F. Ng, In-situ derivatisation of degradation products of chemical warfare agents in water by solid-phase microextraction and gas chromatographic–mass spectrometric analysis, *J. Chromatogr. A.* 832 (1999) 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00990-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00990-X).
- [151] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in single-drop microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 54–64. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00126-1).
- [152] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction

- technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4).
- [153] V. PICHON, Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques, *Tech. l'ingénieur.* (2006). <https://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42385210-p1420.pdf>.
- [154] F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, P. Grossi, I.R.B. Olivares, Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 813–824. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800669>.
- [155] GERSTEL GmbH & Co, Twister Back Extraction TBE, (2018) 2018. <http://www.gerstel.com/en/twister-back-extraction.htm>.
- [156] X. Fernandez, D. Cabrol-bass, X. Fernandez, D. Cabrol-bass, *Analyse des arômes*, 33 (2007).
- [157] X. HUANG, N. QIU, D. YUAN, B. HUANG, A novel stir bar sorptive extraction coating based on monolithic material for apolar, polar organic compounds and heavy metal ions, *Talanta*. 78 (2009) 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.058>.
- [158] F. David, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A.* 1152 (2007) 54–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.032>.
- [159] P. Li, B. Hu, X. Li, Zirconia coated stir bar sorptive extraction combined with large volume sample stacking capillary electrophoresis-indirect ultraviolet detection for the determination of chemical warfare agent degradation products in water samples, *J. Chromatogr. A.* 1247 (2012) 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.059>.
- [160] J. A., K. Aguilar-Arteaga, C. Dez, E. Barrado, Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples, in: *Herbic. - Adv. Res., InTech*, 2013: p. 64. <https://doi.org/10.5772/54962>.
- [161] P. Garg, D. Pardasani, A. Mazumder, A. Purohit, D.K. Dubey, Dispersive solid-phase extraction for in-sorbent Fourier-transform infrared detection and identification of nerve agent simulants in analysis for verification of chemical weapon convention, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 955–963. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4337-9>.
- [162] V. Singh, A.K. Purohit, S. Chinthakindi, R. Goud D, V. Tak, D. Pardasani, A.R. Shrivastava, D.K. Dubey, Magnetic hydrophilic–lipophilic balance sorbent for efficient extraction of chemical warfare agents from water samples, *J. Chromatogr. A.* 1434 (2016) 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.028>.
- [163] V. Singh, A.K. Purohit, S. Chinthakindi, R.D. Goud, V. Tak, D. Pardasani, A.R. Shrivastava, D.K. Dubey, Analysis of chemical warfare agents in organic liquid samples with magnetic dispersive solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry for verification of the chemical weapons convention, *J. Chromatogr. A.* 1448 (2016) 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.058>.
- [164] H. Liu, P.K.P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. solvent extraction in a microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821. <https://doi.org/10.1021/ac960145h>.
- [165] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent Microextraction into a Single Drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240. <https://doi.org/10.1021/ac960042z>.
- [166] A. de S. Pinheiro, G.O. da Rocha, J.B. de Andrade, A SDME/GC–MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water, *Microchem. J.* 99 (2011) 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.05.019>.
- [167] J.M. Kokosa, Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.019>.
- [168] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, Single drop microextraction—Development, applications and future trends, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2326–2336. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.089>.
- [169] S. Tang, T. Qi, P.D. Ansah, J.C. Nalouzebi Fouemina, W. Shen, C. Basheer, H.K. Lee, Single-drop microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.016>.
- [170] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235–239. <https://doi.org/10.1021/ac960814r>.

- [171] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Preconcentration into a Single Microdrop, *Anal. Chem.* 71 (1999) 388–393. <https://doi.org/10.1021/ac9805899>.
- [172] J.M. Kokosa, Advances in solvent-microextraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.020>.
- [173] Y.K. Park, W.Y. Chung, B. Kim, Y.S. Kye, M.S. Shin, D. Kim, Ion-pair single-drop microextraction determinations of degradation products of chemical warfare agents in water, *Chromatographia*. 76 (2013) 679–685. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2431-9>.
- [174] L. Xu, X.Y. Gong, H.K. Lee, P.C. Hauser, Ion-pair liquid–liquid–liquid microextraction of nerve agent degradation products followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A.* 1205 (2008) 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.005>.
- [175] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- [176] F. Hansen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 189 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113446>.
- [177] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656. <https://doi.org/10.1021/ac990055n>.
- [178] E. Carasek, J. Merib, Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review, *Anal. Chim. Acta.* 880 (2015) 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>.
- [179] T.S. Ho, T. Vasskog, T. Anderssen, E. Jensen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, 25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction, *Anal. Chim. Acta.* 592 (2007) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.014>.
- [180] A. Esrafil, M. Baharf, M. Tajik, Y. Yamini, M. Ghambarian, Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.015>.
- [181] L.M. Madikizela, V.E. Pakade, S. Ncube, H. Tutu, L. Chimuka, Application of Hollow Fibre-Liquid Phase Microextraction Technique for Isolation and Pre-Concentration of Pharmaceuticals in Water, *Membranes (Basel)*. 10 (2020) 311. <https://doi.org/10.3390/membranes10110311>.
- [182] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. De La Guardia, J. Namieśnik, Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta*. 119 (2014) 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.050>.
- [183] V. Sharifi, A. Abbasi, A. Nosrati, Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction techniques in analytical toxicology, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.10.004>.
- [184] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00105-0).
- [185] L.S. de Jager, A.R.J. Andrews, Preliminary studies of a fast screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using hollow fibre membrane solvent microextraction (HFMSME), *Analyst*. 126 (2001) 1298–1303. <https://doi.org/10.1039/b102039k>.
- [186] S. Cui, S. Tan, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2241–2247. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.022>.
- [187] J. Cai, G. Chen, J. Qiu, R. Jiang, F. Zeng, F. Zhu, G. Ouyang, Hollow fiber based liquid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ecological textiles by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*. 146 (2016) 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.069>.

- [188] W.-L. Zhou, L. Ding, Y.-H. Cheng, Z. Xu, M.-L. Chen, X.-S. Fu, Application of an improved hollow fiber liquid phase microextraction technique coupled to LC-MS/MS to studying migration of fluorescent whitening agents from plastic food contact materials, *Food Addit. Contam. Part A.* (2022) 1–11. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2066192>.
- [189] LSABM, Analyse de produit de dégradation d'armes chimiques par des techniques d'extraction liquide-liquide miniaturisés (HF-LPME et méthode dérivées), (n.d.). <https://www.lsabm.espci.fr/spip.php?article87> (accessed April 1, 2022).
- [190] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid–liquid–liquid extraction in the 96-well format, *Bioanalysis.* 5 (2013) 1377–1385. <https://doi.org/10.4155/bio.13.59>.
- [191] J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review, *Anal. Chim. Acta.* 624 (2008) 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.050>.
- [192] D.K. Dubey, D. Pardasani, A.K. Gupta, M. Palit, P.K. Kanaujia, V. Tak, Hollow fiber-mediated liquid-phase microextraction of chemical warfare agents from water, *J. Chromatogr. A.* 1107 (2006) 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.095>.
- [193] H.S.N. Lee, C. Basheer, H.K. Lee, Determination of trace level chemical warfare agents in water and slurry samples using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1124 (2006) 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.030>.
- [194] H.S.N. Lee, M.T. Sng, C. Basheer, H.K. Lee, Determination of degradation products of chemical warfare agents in water using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in-situ derivatisation followed by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1148 (2007) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.104>.
- [195] D. Pardasani, P.K. Kanaujia, A.K. Gupta, V. Tak, R.K. Shrivastava, D.K. Dubey, In situ derivatization hollow fiber mediated liquid phase microextraction of alkylphosphonic acids from water, *J. Chromatogr. A.* 1141 (2007) 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.010>.
- [196] K.H. Holmgren, T. Gustafsson, A. Östin, Screening of nerve agent markers with hollow fiber-chemosorption of phosphonic acids, *J. Chromatogr. B.* 1033–1034 (2016) 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.017>.
- [197] N. Campillo, K. Gavazov, P. Viñas, I. Hagarova, V. Andruch, Liquid-phase microextraction: update May 2016 to December 2018, *Appl. Spectrosc. Rev.* 55 (2020) 307–326. <https://doi.org/10.1080/05704928.2019.1604537>.
- [198] S.S.H. Davarani, A. Morteza-Najarian, S. Nojavan, A. Pourahadi, M.B. Abbassi, Two-phase electromembrane extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 736–743. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200838>.
- [199] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.024>.
- [200] P. Kubáň, P. Boček, Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection: A universal tool for the determination of supported liquid membrane selectivity in electromembrane extraction of complex samples, *J. Chromatogr. A.* 1267 (2012) 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.010>.
- [201] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes New concept for rapid sample preparation of biological fluid, *J. Chromatogr. A.* 1109 (2006) 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.025>.
- [202] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Recent developments in electromembrane extraction, *Anal. Methods.* 5 (2013) 4549–4557. <https://doi.org/10.1039/C3AY40547H>.
- [203] M. Balchen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane, *J. Chromatogr. A.* 1152 (2007) 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.096>.
- [204] S. Pedersen-Bjergaard, C. Huang, A. Gjelstad, Electromembrane extraction–Recent trends and

- where to go, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.002>.
- [205] L. Xu, P.C. Hauser, H.K. Lee, Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A.* 1214 (2008) 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.058>.
- [206] C. Desoubries, *Extraction de Produits de Dégradation d'Agents Guerre Chimique : Etude du Potentiel d'une Phase de Dioxyde de Titane et de la Microextraction Liquide Liquide Assistée par Fibre Creuse*, UPMC Paris, 2013.
- [207] C. Huang, Z. Chen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, X. Shen, Electromembrane extraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 95 (2017) 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.027>.
- [208] K.E.R. Stig Pedersen-Bjergaard, Astrid Gjelstad, Given ongoing challenges in sample preparation and a lack of novel alternatives, is it time to give liquid-phase microextraction (LPME) a second chance?, *Anal. Sci.* 217 (2017) 66–68.
- [209] E. Gjelstad, Astrid ; PEDERSEN-BJER-GAARD, Stig RASMUSSEN, Knut, Micro-scale Liquid-Liquid-Liquid Extraction patent, WO 2014/064542 A2, 2014.
- [210] G. Astrid, A.T. Andresen, D. Anders, E.G. Thomas, S.P.- B, High-throughput liquid-liquid extraction in 96-well format: Parallel artificial liquid membrane extraction, *LC GC Eur.* (2017) 95–98.
- [211] L. Vårdal, G. Wong, Å.M.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, E.L. Øiestad, Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4967–4978. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1147-y>.
- [212] M. Roldán-Pijuán, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2811–2819. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8505-9>.
- [213] K.S. Ask, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction-A simple combination of microsampling and microextraction, *Anal. Chim. Acta.* 1009 (2018) 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.024>.
- [214] K.N. Olsen, K.S. Ask, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: a novel approach in therapeutic drug monitoring, *Bioanalysis.* 10 (2018) 385–395. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0250>.
- [215] L. Vårdal, H.-M. Askildsen, A. Gjelstad, E.L. Øiestad, H.M.E. Edvardsen, S. Pedersen-Bjergaard, Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood, *J. Chromatogr. B.* 1048 (2017) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.010>.
- [216] K.S. Ask, T. Bardakci, M.P. Parmer, T.G. Halvorsen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.011>.
- [217] V. Pilařová, M. Sultani, K.S. Ask, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>.
- [218] S. Yu, Q. Xiao, B. Zhu, X. Zhong, Y. Xu, G. Su, M. Chen, Gas chromatography–mass spectrometry determination of earthy–musty odorous compounds in waters by two phase hollow-fiber liquid-phase microextraction using polyvinylidene fluoride fibers, *J. Chromatogr. A.* 1329 (2014) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.002>.
- [219] Y. Wu, J. Zhou, X. Wang, Z. Zhang, S. Gao, Ionic Liquid-based Hollow Fiber Liquid-Liquid-Liquid Microextraction Combined with Capillary Electrophoresis for the Determination of Sulfonamides in Aquaculture Waters, *J. Chromatogr. Sci.* 57 (2019) 950–960. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz053>.
- [220] M. Tajik, Y. Yamini, A. Esrafil, B. Ebrahimpour, Automated hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for the extraction of two hormonal drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.028>.

- [221] L. Chimuka, T.A.M. Msagati, E. Cukrowska, H. Tutu, Critical parameters in a supported liquid membrane extraction technique for ionizable organic compounds with a stagnant acceptor phase, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 2318–2325. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.004>.
- [222] J.Å. Jönsson, P. Lövkvist, G. Audunsson, G. Nilvé, Mass transfer kinetics for analytical enrichment and sample preparation using supported liquid membranes in a flow system with stagnant acceptor liquid, *Anal. Chim. Acta*. 277 (1993) 9–24. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85084-W](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)85084-W).
- [223] M. Knutsson, L. Mathiasson, J.Å. Jönsson, Supported liquid membrane work-up in combination with liquid chromatography and electrochemical detection for the determination of chlorinated phenols in natural water samples, *Chromatographia*. 42 (1996) 165–170. <https://doi.org/10.1007/BF02269647>.
- [224] A. Gjelstad, Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.007>.
- [225] L.E.E. Eibak, M.P. Parmer, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7345-8>.
- [226] L.E.E. Eibak, K.E. Rasmussen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel electromembrane extraction in the 96-well format, *Anal. Chim. Acta*. 828 (2014) 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.038>.
- [227] N. Drouin, J.-F. Mandscheff, S. Rudaz, J. Schappler, Development of a New Extraction Device Based on Parallel-Electromembrane Extraction, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6346–6350. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01284>.
- [228] A. Gjelstad, A.T. Andresen, A. Dahlgren, T.E. Gundersen, S. Pederson-Bjergaard, High-throughput liquid–liquid extraction in 96-well format: Parallel artificial liquid membrane extraction, *LC-GC Eur.* 30 (2017) 10–17.
- [229] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction, *J. Chromatogr. A*. 1184 (2008) 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.088>.
- [230] R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read, M.T.J. Reid, P.A. D’Agostino, L.R. Provost, Capillary column isobutane chemical ionization mass spectrometry of mustard and related compounds, *Biol. Mass Spectrom.* 15 (1988) 553–564. <https://doi.org/10.1002/bms.1200151008>.
- [231] United Nations, United Nations Mission to Investigate Allegations of the Use of Chemical Weapons in the Syrian Arab Republic, 2017, Report if the alleged use of a chemical weapons in the Ghouta area of Damascus on 21 August 2013, (n.d.). http://www.un.org/disarmament/content/slideshow/Secretary_General_Report_of_CW_Investigation.pdf.
- [232] K. Bouchouareb, A. Combes, V. Pichon, Parallel artificial liquid membrane extraction of organophosphorus nerve agent degradation products from environmental samples, *Anal. Chim. Acta*. 1190 (2021) 339261. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339261>.
- [233] T.M.M. Baygildiev, I.A.A. Rodin, A.N.N. Stavriani, A.V. V. Braun, A.T.T. Lebedev, I.V. V. Rybalchenko, O.A.A. Shpigun, Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination in environmental samples after pre-column derivatization with p-bromophenacyl bromide, *J. Chromatogr. A*. 1442 (2016) 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.001>.
- [234] A.S. Appel, J.H. McDonough, J.D. McMonagle, B.A. Logue, Analysis of Nerve Agent Metabolites from Hair for Long-Term Verification of Nerve Agent Exposure, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6523–6530. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01274>.
- [235] R.A. Evans, E.M. Jakubowski, W.T. Muse, K. Matson, S.W. Hulet, R.J. Mioduszewski, S.A. Thomson, A.L. Totura, J.A. Renner, C.L. Crouse, Quantification of sarin and cyclosarin metabolites isopropyl methylphosphonic acid and cyclohexyl methylphosphonic acid in minipig plasma using isotope-dilution and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008)

- 78–85. <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.78>.
- [236] F.L. Ciner, C.E. McCord, R.W. Plunkett, M.F. Martin, T.R. Croley, Isotope dilution LC/MS/MS for the detection of nerve agent exposure in urine, *J. Chromatogr. B.* 846 (2007) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.08.008>.
- [237] P.K. Kanaujia, D. Pardasani, V. Tak, A.K. Purohit, D.K. Dubey, Selective enrichment of the degradation products of organophosphorus nerve agents by zirconia based solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6612–6620. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.091>.
- [238] S. Le Moullec, L. Truong, C. Montauban, A. Begos, V. Pichon, B. Bellier, Extraction of alkyl methylphosphonic acids from aqueous samples using a conventional polymeric solid-phase extraction sorbent and a molecularly imprinted polymer, *J. Chromatogr. A.* 1139 (2007) 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.022>.
- [239] Scientific Advisory Board, REPORT OF THE TWELFTH SESSION OF THE SCIENTIFIC ADVISORY BOARD, DEN HAAG, 2008. https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/SAB/en/sab-12-01_e_.pdf.
- [240] J.P. Hutchinson, L. Setkova, J. Pawliszyn, Automation of solid-phase microextraction on a 96-well plate format, *J. Chromatogr. A.* 1149 (2007) 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.117>.
- [241] S. Rostami, K. Zór, D.S. Zhai, M. Viehrig, L. Morelli, A. Mehdinia, J. Smedsgaard, T. Rindzevicius, A. Boisen, High-throughput label-free detection of Ochratoxin A in wine using supported liquid membrane extraction and Ag-capped silicon nanopillar SERS substrates, *Food Control.* 113 (2020) 107183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107183>.
- [242] K.S. Ask, M. Lid, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Liquid-phase microextraction in 96-well plates - calibration and accurate quantification of pharmaceuticals in human plasma samples, *J. Chromatogr. A.* 1602 (2019) 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.013>.
- [243] P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, L.R. Provost, Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 912 (2001) 291–299. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01275-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01275-9).
- [244] S. Pal Anagoni, A. Kauser, G. Maity, V.V.R. Upadhyayula, Quantitative determination of acidic hydrolysis products of Chemical Weapons Convention related chemicals from aqueous and soil samples using ion-pair solid-phase extraction and in situ butylation, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 689–696. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700955>.
- [245] V.D. Silva, V. Simão, A.N. Dias, J.S. Carletto, E. Carasek, Combination of hollow-fiber-supported liquid membrane and dispersive liquid-liquid microextraction as a fast and sensitive technique for the extraction of pesticides from grape juice followed by high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 1959–1968. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401418>.
- [246] F.A. Hansen, E. Santigosa-Murillo, M. Ramos-Payán, M. Muñoz, E. Leere Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane, *Anal. Chim. Acta.* 1143 (2021) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.044>.
- [247] R. Venson, A.S. Korb, G. Cooper, A review of the application of hollow-fiber liquid-phase microextraction in bioanalytical methods – A systematic approach with focus on forensic toxicology, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1108 (2019) 32–53. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.006>.
- [248] J. Xiong, J. Chen, M. He, B. Hu, Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography–flame ionization detector, *Talanta.* 82 (2010) 969–975. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.001>.
- [249] J. Xiong, B. Hu, Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection, *J. Chromatogr. A.* 1193 (2008) 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.072>.
- [250] Y.B. Cha, S.W. Myung, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine sample using HPLC/UV and three phase hollow fiber-liquid phase microextraction (HF-LPME), *Bull.*

- Korean Chem. Soc. 34 (2013) 3444–3450. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.11.3444>.
- [251] K.J. Chia, S. Da Huang, Analysis of organochlorine pesticides in wine by solvent bar microextraction coupled with gas chromatography with tandem mass spectrometry detection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 118–124. <https://doi.org/10.1002/rcm.2282>.
- [252] C. Worawit, W. Alahmad, M. Miró, P. Varanusupakul, Combining graphite with hollow-fiber liquid-phase microextraction for improving the extraction efficiency of relatively polar organic compounds, *Talanta.* 215 (2020) 120902. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120902>.
- [253] M. Kataoka, K. Tsuge, H. Takesako, T. Hamazaki, Y. Seto, Effect of pedological characteristics on aqueous soil extraction recovery and tert-butyltrimethylsilylation yield for gas chromatography-mass spectrometry of nerve gas hydrolysis products from soils, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1823–1829. <https://doi.org/10.1021/es001529z>.
- [254] M. Kataoka, K. Tsuge, Y. Seto, Efficiency of pretreatment of aqueous samples using a macroporous strong anion-exchange resin on the determination of nerve gas hydrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry after tert.-butyldimethylsilylation, *J. Chromatogr. A.* 891 (2000) 295–304. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00640-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00640-3).
- [255] A.E.F. Nassar, S. V. Lucas, L.D. Hoffland, Determination of chemical warfare agent degradation products at low- part-per-billion levels in aqueous samples and sub-part-per-million levels in soils using capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1285–1292. <https://doi.org/10.1021/ac980886d>.
- [256] R.W. Read, R.M. Black, Rapid screening procedures for the hydrolysis products of chemical warfare agents using positive and negative ion liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation, *J. Chromatogr. A.* 862 (1999) 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00944-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00944-9).
- [257] M. de los Á. Fernández, J. Boiteux, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments, *Anal. Chim. Acta.* 1038 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.059>.
- [258] Á. Santana-Mayor, R. Rodríguez-Ramos, A. V. Herrera-Herrera, B. Socas-Rodríguez, M.Á. Rodríguez-Delgado, Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 134 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>.
- [259] K. Bouchouareb, A. Combès, V. Pichon, Determination of nerve agent biomarkers in human urine by a natural hydrophobic deep eutectic solvent-parallel artificial liquid membrane extraction technique, *Talanta.* 249 (2022) 123704. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123704>.
- [260] Z. Witkiewicz, S. Neffe, Chromatographic analysis of chemical warfare agents and their metabolites in biological samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 130 (2020) 115960. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115960>.
- [261] D. Spurgin, J. Cybulski, Fast Sample Preparation with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Illegal Opioid Analysis, *LC GC Eur. J. Column-* (2018) 19–22. <https://www.chromatographyonline.com/view/fast-sample-preparation-liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry-illegal-opioid-analysis>.
- [262] J.R. Barr, W.J. Driskell, L.S. Aston, R.A. Martinez, Quantitation of Metabolites of the Nerve Agents Sarin, Soman, Cyclohexylsarin, VX, and Russian VX in Human Urine Using Isotope-Dilution Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 372–378. <https://doi.org/10.1093/jat/28.5.372>.
- [263] V. Van Son, H. Nakamura, T. Imasaka, T. Imasaka, Determination of nerve agent metabolites in human urine by femtosecond laser ionization mass spectrometry using 2-(bromomethyl)naphthalene as a derivatizing reagent, *Anal. Chim. Acta.* 1069 (2019) 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.012>.
- [264] I.N. Stan'Kov, V.B. Kondrat'Ev, I.D. Derevyagina, O.T. Morozova, S. V. Sadovnikov, V.I. Selivanova, S.N. Mylova, Y.A. Karpel'Tseva, I.E. Karaseva, N.E. Kuz'Mina, V. V. Krylov, Gas chromatography determination of trace of biomarkers of mustard agent and some organophosphoric toxic agents in urine, *J. Anal. Chem.* 66 (2011) 626–632. <https://doi.org/10.1134/S1061934811070148>.
- [265] G.I. Mohammed, A.S. Bashammakh, A.A. Alsibaai, H. Alwael, M.S. El-Shahawi, A critical overview

- on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs, *TrAC Trends Anal. Chem.* 78 (2016) 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.007>.
- [266] P. Sibiya, E. Cukrowska, J.Å. Jönsson, L. Chimuka, Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Johannesburg Jukskei River, South Africa, *Chromatographia*. 76 (2013) 427–436. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2420-z>.
- [267] I. Oksavik, A. Gjelstad, S. Pedersen-bjergaard, E. Leere, Green and sustainable drug analysis – Combining microsampling and microextraction of drugs of abuse, 24 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100517>.
- [268] H. Bavlovič Piskáčková, A. Nemeškalová, R. Kučera, S. Pedersen-Bjergaard, V. Najmanová, P. Štěřbová-Kovaříková, M. Kuchař, D. Sýkora, Advanced microextraction techniques for the analysis of amphetamines in human breast milk and their comparison with conventional methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 210 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114549>.
- [269] F. Vincenti, C. Montesano, S. Gobbi, M. Sergi, R. Curini, D. Compagnone, Quantitative analysis of fentanyl, several analogues and metabolites in urine by parallel artificial liquid membrane extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. Open*. 1 (2021) 100006. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100006>.
- [270] R. Marcinkowska, K. Konieczna, Ł. Marcinkowski, J. Namieśnik, A. Kloskowski, Application of ionic liquids in microextraction techniques: Current trends and future perspectives, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 119 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.025>.
- [271] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, M.A.M. Reis, J.G. Crespo, Supported liquid membranes using ionic liquids: Study of stability and transport mechanisms, *J. Memb. Sci.* 242 (2004) 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.07.028>.
- [272] J.F. Liu, G. Bin Jiang, Y.G. Chi, Y.Q. Cai, Q.X. Zhou, J.T. Hu, Use of Ionic Liquids for Liquid-Phase Microextraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870–5876. <https://doi.org/10.1021/ac034506m>.
- [273] J. Soares da Silva Burato, D.A. Vargas Medina, A.L. de Toffoli, E. Vasconcelos Soares Maciel, F. Mauro Lanças, Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 202–225. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900776>.
- [274] B. Herce-Sesa, J.A. López-López, C. Moreno, Advances in ionic liquids and deep eutectic solvents-based liquid phase microextraction of metals for sample preparation in Environmental Analytical Chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116398>.
- [275] J.F. Peng, J.F. Liu, X.L. Hu, G. Bin Jiang, Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1139 (2007) 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.006>.
- [276] E. Carasek, G. Bernardi, D. Morelli, J. Merib, Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications, *J. Chromatogr. A*. 1640 (2021) 461944. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461944>.
- [277] W. Tang, Y. An, K.H. Row, Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 136 (2021) 116187. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116187>.
- [278] P. Makoś, E. Słupek, J. Gębicki, Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review, *Microchem. J.* 152 (2020) 104384. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>.
- [279] M.R. Afshar Mogaddam, M.A. Farajzadeh, A. Mohebbi, M. Nemati, Hollow fiber–liquid phase microextraction method based on a new deep eutectic solvent for extraction and derivatization of some phenolic compounds in beverage samples packed in plastics, *Talanta*. 216 (2020) 120986. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120986>.
- [280] M.M. Khataei, Y. Yamini, A. Nazaripour, M. Karimi, Novel generation of deep eutectic solvent as an acceptor phase in three-phase hollow fiber liquid phase microextraction for extraction and preconcentration of steroidal hormones from biological fluids, *Talanta*. 178 (2018) 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.068>.
- [281] S. Zhang, X. Zhang, X. Chen, S. Hu, X. Bai, Deep eutectic solvent-based hollow fiber liquid-phase

- microextraction for quantification of Q-markers of cinnamic acid derivatives in traditional Chinese medicines and research of their plasma protein binding rates, *Microchem. J.* 155 (2020) 104696. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104696>.
- [282] J. Xue, R. qin Wang, X. Chen, S. Hu, X. hong Bai, Three-phase hollow-fiber liquid-phase microextraction based on deep eutectic solvent as acceptor phase for extraction and preconcentration of main active compounds in a traditional Chinese medicinal formula, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 2239–2246. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900184>.
- [283] M. Rajabi, N. Ghassab, M. Hemmati, A. Asghari, Highly effective and safe intermediate based on deep eutectic medium for carrier less-three phase hollow fiber microextraction of antiarrhythmic agents in complex matrices, *J. Chromatogr. B.* 1104 (2019) 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.11.008>.
- [284] S. Seidi, L. Alavi, A. Jabbari, M. Shanehsaz, Three-phase carrier-mediated hollow fiber microextraction based on deep eutectic solvent followed by HPLC–UV for determination of raloxifene and ethinylestradiol in pharmaceutical wastewater treatment plants, *J. Iran. Chem. Soc.* 16 (2019) 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s13738-018-01572-4>.
- [285] C. Florindo, L.C. Branco, I.M. Marrucho, Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments, *Fluid Phase Equilib.* 448 (2017) 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.04.002>.
- [286] D.C. Morelli, G. Bernardi, L. Morés, M.E. Pierri, E. Carasek, A green - high throughput –extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection, *J. Chromatogr. A.* 1626 (2020) 461377. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461377>.
- [287] L. Guo, H.K. Lee, Ionic liquid based three-phase liquid-liquid-liquid solvent bar microextraction for the determination of phenols in seawater samples, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4299–4306. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.031>.
- [288] E. Santigosa, S. Pedersen-Bjergaard, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, Green microfluidic liquid-phase microextraction of polar and non-polar acids from urine, *Anal. Bioanal. Chem.* (2021) 3717–3723. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03320-9>.
- [289] K. Li, Y. Jin, D. Jung, K. Park, H. Kim, J. Lee, In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1614 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460730>.
- [290] H. Sereshti, S. Semnani Jazani, N. Nouri, G. Shams, Dispersive liquid–liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents: Application for tetracyclines monitoring in milk, *Microchem. J.* 158 (2020) 105269. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105269>.
- [291] Y. Seto, M. Tachikawa, M. Kanamori-Kataoka, K. Sasamoto, N. Ochiai, Target analysis of tert - butyldimethylsilyl derivatives of nerve agent hydrolysis products by selectable one-dimensional or two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1501 (2017) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.024>.
- [292] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 149 (2022) 116553. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.
- [293] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, N. Delaunay, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, Field-amplified sample stacking for the detection of chemical warfare agent degradation products in low-conductivity matrices by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1178 (2008) 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.024>.
- [294] inż. Wojciech Wojnowski, Analytical Greenness Metric for Sample Preparation, (2022). <https://mostwiedzy.pl/pl/wojciech-wojnowski,174235-1/agreeprep>.
- [295] D. V. Oreshkin, T.M. Baygildiev, M.F. Vokuev, A. V. Braun, I.A. Godovikov, I. V. Rybalchenko, I.A. Rodin, Determination of p-Methoxyphenacyl Bromide Derivatives of Alkylmethylphosphonic Acids in Urine Using Gas Chromatography with High-Resolution Mass Spectrometric Detection, *J. Anal. Chem.* 76 (2021) 1530–1537. <https://doi.org/10.1134/S1061934821130098>.

- [296] Y. Lin, J. Chen, L. Yan, L. Guo, B. Wu, C. Li, J. Feng, Q. Liu, J. Xie, Determination of nerve agent metabolites in human urine by isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase supported derivatization, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5213–5220. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7695-x>.
- [297] D.D. Richardson, J.A. Caruso, Derivatization of organophosphorus nerve agent degradation products for gas chromatography with ICPMS and TOF-MS detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 809–823. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1164-8>.
- [298] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, X. Shen, S. Pedersen-Bjergaard, Combination of Electromembrane Extraction and Liquid-Phase Microextraction in a Single Step: Simultaneous Group Separation of Acidic and Basic Drugs, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6951–6957. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01610>.

RESUME

Les agents neurotoxiques organophosphorés (OPNA) sont les agents de guerre les plus toxiques. Ils se dégradent rapidement dans la nature ou dans le corps humain par hydrolyse pour donner naissance à des acides alkyl méthyl phosphoniques (AMPA). Ces produits de dégradations peuvent être utilisés comme marqueurs d'une exposition aux OPNA. Cependant, leur analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) dans des matrices complexes implique le recours à des méthodes de traitement de l'échantillon efficaces. Ainsi, l'extraction liquide assistée par membrane parallèle artificielle (PALME) a été développée pour extraire et concentrer les AMPA. Il s'agit d'une méthode de microextraction réalisée dans un système de deux plaques 96-puits où l'échantillon aqueux et la phase acceptrice aqueuse sont séparés par une membrane plate imprégnée de solvant organique. Ce qui permet le traitement de plusieurs échantillons simultanément. Initialement, un système de plaques tel que décrit dans la littérature a été utilisé. Plusieurs paramètres affectant l'extraction des analytes ciblés ont été étudiés dont, pour la première fois, de nouveaux tel que l'effet de la force ionique et la température sur l'extraction. Cependant, les facteurs d'enrichissements (FE) obtenus étaient limités et ne permettaient pas d'atteindre la sensibilité souhaitée et ce malgré les taux d'extraction exhaustifs pour 3 des 5 composés étudiés. Suite à ce constat, le dispositif de la PALME a été modifié en introduisant une plaque 96-puits donneuse avec un volume donneur 6 fois plus important que la plaque 96-puits classique de 0.5 ml de volume. Ceci a permis d'atteindre des FE de 42. La méthode PALME finale développée a donc pu être appliquée pour la première fois au domaine environnemental sur des échantillons d'eau de rivière, d'eau usée et d'extraits aqueux de sols.

Afin de répondre aux 10 principes de traitement de l'échantillon vert, une partie de ces travaux de thèse a eu pour objectif de rendre la PALME plus « verte » grâce au remplacement des solvants organiques, nuisibles à la santé et l'environnement, par des solvants naturels. L'octanol utilisé comme solvant en PALME a donc été remplacé par un solvant eutectique profond hydrophobe d'origine naturelle (NaHDES) à base de thymol et de coumarin. Cette nouvelle méthode NaHDES-PALME associée à la LC-MS/MS a été appliquée avec succès sur des échantillons biologiques (urines). Elle présente une sensibilité conforme aux exigences de l'OIAC et peut donc être utilisée à des fins médicales et/ou criminalistiques. Elle est très simple à mettre en œuvre, économique, rapide, verte et à haut débit et donc totalement adaptée au contexte d'urgence d'une intervention sur une scène potentiellement contaminée par les OPNA. Par ailleurs, les paramètres opérationnels considérés comme optimaux pour l'extraction des AMPA en PALME se sont avérés être les mêmes que ceux préalablement obtenus lors de l'optimisation de la méthode de micro-extraction liquide assistée par fibre creuse (HF-LPME), méthode similaire dans son principe mais qui diffèrent en termes de dimensions. Ce résultat permet d'envisager le transfert de très nombreuses méthodes déjà développées en HF-LPME vers la PALME.

ABSTRACT

Organophosphate nerve agents (OPNAs) are the most toxic warfare agents. They degrade rapidly in nature or in the human body by hydrolysis to give rise to alkyl methyl phosphonic acids (AMPAs). These degradation products can be used as markers of exposure to OPNAs. However, their analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) in complex matrices implies the use of effective sample treatment methods. Therefore, Parallel Artificial Liquid Microextraction method (PALME) was developed to extract and concentrate AMPAs. PALME is a microextraction method carried out in a two-plates 96-well system where the aqueous sample and the aqueous acceptor phase are separated by a flat membrane impregnated with organic solvent. This allows the processing of several samples simultaneously. Initially, a plate system as described in the literature was used. Several parameters affecting the extraction of the targeted analytes were studied including, for the first time, new ones such as the effect of ionic strength and temperature on the extraction efficiency. However, the enrichment factors (EFs) obtained were limited and did not allow to achieve the required sensitivity, despite the exhaustive extraction rates for 3 of the 5 studied compounds. Following this observation, the PALME device was modified by introducing a 96-well donor plate with a donor volume 6 times larger than the classic 96-well plate of 0.5 ml volume. This made possible to reach EFs of 42. The final PALME method developed was then applied for the first time in the environmental field on samples of river water, wastewater and aqueous soil extracts.

In order to meet the 10 principles of green sample preparation, part of this thesis work aimed to make the PALME more "green" by replacing organic solvents, which are harmful to health and the environment, with natural solvents. The octanol used as a solvent in PALME was therefore replaced by a hydrophobic deep eutectic solvent of natural origin (NaHDES) based on thymol and coumarin. This new NaHDES-PALME method associated with LC-MS/MS has been successfully applied to biological samples (urine). It has a sensitivity that meets the OPCW requirements and can therefore be used for medical and/or forensic purposes. It is very simple to implement, economical, fast, green and high throughput and therefore totally adapted to the emergency context of an intervention on a scene potentially contaminated by OPNAs. Moreover, the optimized operational parameters for the extraction of AMPAs in PALME turned out to be the same as those previously obtained during the optimization of the hollow fiber liquid micro-extraction method (HF-LPME), a similar method of PALME in principle but differing in geometry. This result makes it possible the transfer of many methods already developed in HF-LPME to PALME.