

Revue générale

Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications

Solid phase extraction (SPE): theory and applications

Luc Humbert*

Laboratoire de Toxicologie et de Génopathies, Centre de Biologie Pathologie, Bd. du Prof. J. Leclercq, 59037 Lille, France

Résumé – L'extraction en phase solide (SPE) est devenue depuis quelques années une technique de préparation d'échantillons de plus en plus utilisée en toxicologie analytique. Son principe de base est analogue à celui de la chromatographie de partage. Depuis son apparition de nombreuses phases stationnaires ont été développées par les industriels, permettant des extractions de plus en plus ciblées, ou bien adaptées pour l'extraction d'un grand nombre de substances de natures chimiques variées : pour une recherche large de xénobiotiques en milieu hospitalier pour des patients admis aux urgences ou en médecine légale dans les recherches des causes de la mort. De par la diversité des phases stationnaires elle permet l'extraction de composés polaires difficilement extractibles auparavant par les phases organiques. L'extraction se déroule généralement en quatre étapes : le conditionnement de la phase stationnaire, le chargement de l'échantillon, le(s) lavage(s) de la cartouche et enfin l'élution. La maîtrise de ce pré-analytique permet des facteurs de pré-concentration de(s) analyte(s) à rechercher ou à doser qui peut abaisser la limite de détection d'une méthode. Les larges gammes commercialisées par les industriels sont adaptées à des extractions ponctuelles de volumes très variés (de quelques dizaines de microlitres à plusieurs millilitres voire litres) mais aussi à l'extraction de grandes séries grâce à des plaques de 96 puits. C'est aussi une technique qui a l'avantage d'être automatisable. De très nombreuses méthodes analytiques ont été développées sur les matrices biologiques habituelles : le sérum, le plasma ou les urines mais également dans des matrices plus complexes comme les cheveux ou le méconium.

Mots clés : Extraction, phase stationnaire, matrices biologiques

Abstract – Solid phase extraction (SPE) has become, in recent years, a technique for sample preparation increasingly used in analytical toxicology. Its basic principle is similar to that of partition chromatography. Since its appearance, many stationary phases have been developed by industry for more targeted extractions or adapted for the extraction of a large number of chemical substances of various kinds for a wide search for xenobiotics in hospital for patients admitted to the emergency ward, or forensic research into the causes of death. Because of the variety of stationary phases it allows the extraction of polar compounds from previously difficult to extract organic phases. The extraction is generally conducted in four steps: conditioning of the stationary phase, loading of the sample, washing(s) of the cartridge and finally, elution. Control of this pre-analytical stage allows factors of pre-concentration of the analyte(s) to search for or to be determined which can lower the limit of detection of a method. The wide ranges marketed by the industry are suitable for specific extraction of very varied volumes (a few tens of microliters up to several mL or liters) but also for extraction of large sets with plates of 96 wells. It is also a technique which has the advantage of being automated. Many analytical methods have been developed on biological matrices: serum, plasma and urine, but also in more complex matrices such as hair and meconium.

Key words: Extraction, stationary phase, biological matrices

Reçu le 1^{er} février 2010, accepté après modifications le 22 mars 2010
Publication en ligne le 12 mai 2010

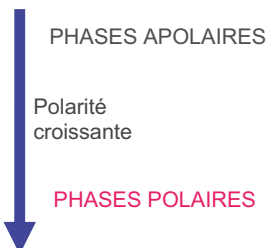
1 Introduction

Partie intégrante d'une analyse, la préparation d'échantillons a, parallèlement à l'amélioration des performances des

outils analytiques, considérablement évolué ces dernières années. C'est très certainement l'étape la plus importante du processus analytique. La diversité des échantillons biologiques qui sont confiés aux laboratoires de toxicologies pour analyse sont des matrices complexes (sérum, sang, urines, bile,

* Correspondance : Luc Humbert, l-humbert@chru-lille.fr

Tableau I. Exemple de quelques phases stationnaires classées en fonction de leurs polarités.

C18	Octadecyl	
C2	Éthyl	
CH	Cyclohexyl	
PH	Phényl	
CN	Cyanopropyl	
2OH	Diol	
NH ₂	Aminopropyl	
Si	Silica	

cheveu, méconium, ...). De ce constat, on comprend mieux pourquoi une bonne préparation d'échantillons influe directement sur la limite de détection, la répétabilité et la reproductibilité de l'analyse. Son impact sur la qualité de l'analyse est majeur. Cette étape a aussi pour but de concentrer les xénobiotiques à détecter ou à doser dans une matrice biologique tout en extrayant le moins possible de composés endogènes.

Depuis maintenant de nombreuses années l'extraction en phase solide (SPE) s'est imposée comme une méthode performante de préparation d'échantillon. Elle est actuellement employée par de nombreux laboratoires et permet de réaliser des purifications et une concentration efficace de l'échantillon avant l'analyse par des techniques de chromatographie en phase liquide et en phase gazeuse équipées de tout type de détecteurs. Elle permet à la fois d'extraire de façon beaucoup plus ciblée quelques composés d'intérêt pour des dosages spécifiques ou d'extraire de façon très large un grand nombre de substances dans le cadre de recherche non ciblée de substances pour caractériser une intoxication, une tentative d'autolyse ou la mort.

Depuis son apparition, la gamme de phase stationnaire proposée par les industriels ne cesse de s'accroître. La silice a été dès le départ le support le plus employé pour le greffage des phases stationnaires. Ces phases sont le plus souvent de même nature que celles utilisées en chromatographie phase liquide. Le niveau de qualité requis des adsorbants s'est donc renforcé. De nouvelles innovations technologiques telles que les polymères PS-DVB à très hautes surfaces spécifiques et les silices sphériques pures sont devenues incontournables. L'extraction de substances présentes dans les matrices biologiques, par nature aqueuse, nécessite pour l'obtention d'une forte rétention l'utilisation de phases pour lesquelles l'eau est peu éluante. Il s'agit de groupements fonctionnels hydrophobes et notamment la silice greffée par des chaînes hydrocarbonées de type C18, C8. Ces supports créent des rétentions basées sur des interactions de type hydrophobes [1]. Les groupements fonctionnels disponibles permettent de répondre à tout type d'extraction (tableau I). Il est apparu ensuite les supports polymériques qui ont permis d'élargir la gamme et corriger quelques difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre. Les usages et les besoins étant très vastes parallèlement à l'élargissement de la gamme de phases, les conditionnements ont eux aussi beaucoup évolué. Une même phase stationnaire se décline maintenant, pour des analyses ponctuelles ou de petites séries, en cartouche contenant des quantités différentes de phase stationnaire adaptée pour différents volumes d'échantillons, mais aussi, pour de plus grandes séries, en plaques de 96 puits (figure 1), ou



Fig. 1. Différents conditionnements d'adsorbants disponibles pour l'extraction en phase solide. Source : Waters Corporation.

encore parfois dans des embouts de pipettes pour des préparations simples d'échantillons [2, 3]. Il existe également depuis quelques années des phases stationnaires dites mixtes mettant en jeu plusieurs mécanismes réactionnels tel que les interactions hydrophobes et les échanges de cations ou d'anions. Ces associations permettent d'affiner les étapes des lavages en impliquant de façon sélective l'un des deux mécanismes.

Le choix de l'adsorbant et son conditionnement sera déterminant dans la qualité de la préparation, une bonne compréhension des mécanismes mis en jeu sera indispensable pour l'optimisation de cette étape analytique. La plupart des industriels proposent une documentation abondante valorisant leurs gammes avec des arbres décisionnels et des modes opératoires déjà développés comme aide à la décision.

2 Historique

Trois chercheurs, les Drs. Reginald Adams, Thomas Good et Michael Telepchak, ont les premiers fait évoluer la SPE dès 1974. Ils ont découvert par hasard des applications à cette méthode, suite à des erreurs de manipulations sur des colonnes analytiques C18 destinées au départ à la chromatographie en phase liquide. La première publication dans ce domaine est apparue en 1978; elle concernait les colonnes SepPak [4]. En 1980 des colonnes échangeuses d'ions étaient utilisées pour l'extraction. En 1986, la première colonne à phase copolymérique était introduite sur le marché par Telepchak, suivie par d'autres développements [5].

3 Principe et processus d'extraction

3.1 Principe

L'extraction en phase solide est basée sur le partage des composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase stationnaire, l'adsorbant.

3.2 Processus d'extraction

Il se compose généralement de quatre étapes (figure 2). La première étape est le conditionnement de la phase stationnaire.

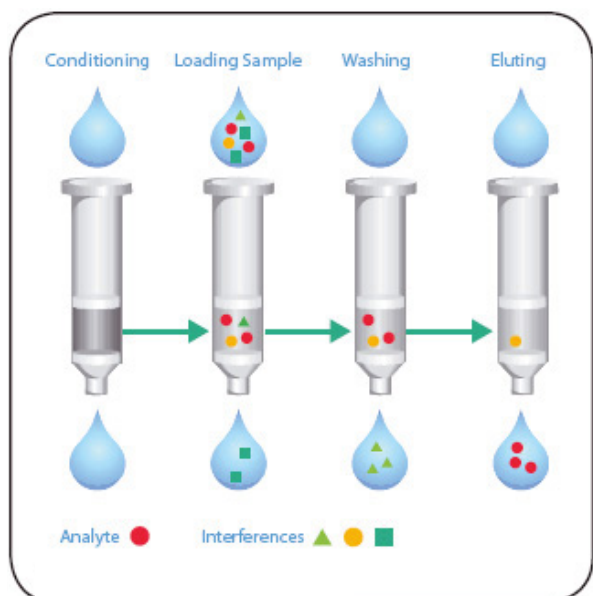


Fig. 2. Les quatre étapes constituant une extraction en phase solide. Source : Gilson.

Elle permet de la mouiller au moyen d'un solvant organique et d'activer les sites de rétention, siège des interactions moléculaires. Un support hydrophobe est conditionné par un solvant organique (le plus souvent le méthanol) puis par un solvant dont les caractéristiques ioniques et de pH sont les plus proches possibles du solvant de l'échantillon (généralement l'eau). La seconde étape est le dépôt de l'échantillon. Le but est de provoquer une rétention quantitative des analytes d'intérêts sur la phase stationnaire tandis que le maximum d'interférences est éliminé par simple non rétention. Pour un maximum d'efficacité, la vitesse d'écoulement de l'échantillon doit être modérée.

L'étape suivante est le lavage. Elle n'est pas systématique ; elle a pour but d'éliminer des interférents faiblement retenus. Il faut choisir des solvants de faibles forces éluantes (exemple : solution méthanol/eau) pour n'éluer que les interférents. Cette étape pour les phases dites mixtes peut être multipliée en agissant alternativement sur un des mécanismes, par exemple premier lavage par une solution de force éluante faible pour nos analytes, puis un deuxième lavage en modifiant le pH de la phase mobile. Ces lavages multiples améliorent très nettement la propreté de l'extrait contribuant à la qualité de l'analyse. Il est recommandé à la fin de cette étape d'assécher le support pour évaporer les traces de solvant de lavage. Cette étape améliore le rendement d'extraction.

La dernière étape est celle de l'élution. Il est préférable d'utiliser le solvant de la plus faible force éluante possible capable d'entraîner la totalité des molécules d'intérêts évitant ainsi d'éluer des interférents fortement retenus. Le choix du solvant est aussi guidé par sa facilité d'évaporation ou sa compatibilité avec la technique analytique suivante. Il doit néanmoins être le plus efficace possible ; son volume doit être faible de manière à obtenir un facteur de pré-concentration très important. La vitesse d'écoulement du solvant doit être lente pour favoriser l'élution.

Ce processus est pour certaines matrices (sang total, cheveu, organe ...) précédé d'un prétraitement qui peut être une simple dilution, une technique de précipitation ...

4 Choix de l'adsorbant SPE

Le choix de l'adsorbant revêt une importance capitale, il faut trouver celui qui pourra extraire avec un excellent rendement le(s) composé(s) d'intérêt tout en maintenant un extrait propre c'est-à-dire sans extraire une grande partie des substances endogènes de la matrice. Les facteurs tels que la polarité relative du composé d'intérêt dans la matrice échantillon, la présence de groupements fonctionnels chargés, la solubilité, le poids moléculaire, ... sont des paramètres qui détermineront la force de rétention qu'aura celui-ci pour l'adsorbant choisi.

Le choix de cet adsorbant permet de définir une sélectivité spécifique aux composés d'intérêt ainsi qu'une capacité de charge suffisante à l'entière adsorption de ceux-ci. On rencontre en général deux grandes familles :

- les polymères ;
- les silices.

Ces deux familles possèdent des caractéristiques très différentes. Leurs applications, avantages et inconvénients sont divers et variés.

4.1 Les polymères

Les polymères de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB), polystyrène divinyl pyrrolidone (PS-PVP) et diméthylacryloxy méthyl naphthalène divinylbenzène (DMN-DVB) sont très stables chimiquement. Ils résistent le plus souvent à un pH compris entre 1 et 14, ils sont faiblement sélectifs comparés aux silices greffées. Ils possèdent une capacité de charge bien supérieure aux silices traditionnelles et permettent la purification d'un très grand nombre de molécules ou de familles de molécules.

4.2 Les silices

Leurs stabilités chimiques sont moins importantes que les polymères, elles sont stables à un pH compris entre 2 et 7,5. Beaucoup plus sélectives que les polymères, avec une capacité de charge moins importante du fait de leur plus faible surface spécifique, les silices restent toujours des adsorbants de référence très utilisés. Elles représentent encore 90 % du marché de la colonne d'extraction [2].

On distingue 4 familles de silices identifiables par leur mode de fonctionnement ainsi que par leur sélectivité.

4.2.1 Silices pour mode « phase inverse »

En mode phase inverse, les greffons hydrophobes fonctionnent selon les interactions de type Van der Waals. La purification permet un isolement de familles de composés apolaires ou faiblement polaires. L'ajout de tampon est préférable lorsque les composés sont ionisables (acides, bases).

Les phases apolaires non post-silanisées (non *end capped*) donnent, avec les groupements silanols superficiels, des interactions polaires supplémentaires qui peuvent améliorer la rétention des composés contenant des fonctionnalités polaires. Pour un même éluant, plus la chaîne carbonée est courte, plus la rétention d'un composé est faible. Pour les composés aromatiques, le greffage phényle présente de meilleures interactions. Le méthanol ou l'acétonitrile sont des solvants d'éluion régulièrement utilisés.

4.2.2 Silices pour mode « phase normale »

Le mode « phase normale » reste un compromis très intéressant pour la purification de molécules ou familles de molécules dont la structure présente un grand nombre de fonctions polaires. Le choix du solvant est très important et influe directement sur le type d'interaction mis en œuvre pour la purification (un solvant apolaire favorise les interactions polaires entre l'adsorbant et les composés).

- Le greffage cyano (CN) peut être utilisé soit en « phase normale » pour l'extraction de composés polaires soit en « phase inverse » pour les molécules moyennement polaires.
- La silice greffée Diol se présente comme une très bonne alternative à la silice vierge pour l'extraction de composés polaires (liaisons hydrogène).

Phase mixte, la silice amino (NH₂) peut s'utiliser comme un échangeur d'anions faibles (pour les acides très forts) ou comme un adsorbant polaire qui peut interagir avec les groupements fonctionnels -OH, -NH, -SH, ...

4.2.3 Silices pour mode « échange d'ions »

En mode « échange d'ions », le mécanisme de rétention est l'interaction ionique. L'extrémité du greffon de l'adsorbant crée une attraction forte avec le ou les composés de l'échantillon possédant une ou des fonctions ionisables antagonistes. L'interaction des phases échangeuses d'ions dépend essentiellement du pH et de la force ionique du contre-ions. La force de la liaison sera d'autant plus importante que l'acide et la base qui s'apparient sont forts, ce qui peut être problématique pour l'étape d'éluion et pour l'obtention d'un bon taux de recouvrement. C'est pourquoi il existe différents greffons échange d'ions :

- les phases échangeuses d'anions sont généralement une amine quaternaire très forte; elles sont utilisées pour extraire les acides faibles portant une ou des charge(s) négative(s);
- les phases échangeuses de cations ayant une fonctionnalité sulfonique sont utilisées pour extraire tous les composés basiques faibles portant une ou des charge(s) positive(s);
- les phases échangeuses d'anions sur une base d'amine moins forte que les précédentes sont utilisées pour extraire les acides forts portant une ou des charge(s) négative(s);
- les phases échangeuses de cations sont fonctionnalisées par un acide carboxylique; elles sont utilisées pour extraire tous les composés basiques forts portant une ou des charge(s) positive(s).

4.2.4 Silices pour mode « mode mixte »

Une des techniques les plus sélectives des adsorbants silices greffées est celle du « mode mixte ». Le double greffage (échange d'ions et chaîne carbonée hydrophobe) apporte de nouvelles sélectivités. Les composés d'intérêt, qui doivent impérativement posséder une fonction acide ou basique, sont retenus sur le greffage échange d'ions. Un premier lavage puissant, faisant intervenir le pH, permet d'éliminer les impuretés ionisables. Il est ensuite possible d'éliminer les autres impuretés retenues sur le greffage hydrophobe par un solvant organique. Cette technique est très utilisée pour l'extraction de composés basiques (médicaments, drogues et métabolites) dans les fluides biologiques (sang, plasma, urines, ...). Comme en « échange d'ions », il existe différents greffons spécifiques aux composés d'intérêt :

- constituées d'un acide fort (sulfonique) et d'un greffon hydrophobe. Elles sont utilisées pour extraire les bases faibles portant une ou des charge(s) positive(s);
- constituées d'une base d'amine quaternaire et de greffons hydrophobes. Elles sont utilisées pour extraire les acides faibles portant une ou des charge(s) négative(s);
- constituées d'un acide faible (carboxylique) et de greffons hydrophobes. Elles sont utilisées pour extraire les bases fortes portant une ou des charge(s) positive(s);
- constituées d'une base d'amine faible et de greffons hydrophobes. Elles sont utilisées pour extraire les acides forts portant une ou des charge(s) négative(s).

Le choix de la phase d'extraction dépend d'abord de la matrice de l'échantillon. Si la phase est aqueuse, comme le sont les échantillons biologiques, des supports hydrophobes conviendront mieux puisque l'eau est sur ce type de support la phase mobile la moins éluante. La polarité d'un soluté est difficile à définir, elle peut toutefois être reliée à la notion d'hydrophobie définie à partir de la constante de partage octanol-eau (Po/w). Les composés dont le logarithme Po/w sont compris entre 1 et 3 sont considérés comme étant modérément polaires, comme polaires ceux dont le Po/w est inférieur à 1 et comme apolaire ceux dont le Po/w est supérieur à 3. C'est en fonction de ce classement que pourra s'effectuer la sélection du support [1].

5 Les conditionnements

Généralement, pour une extraction ponctuelle ou des petites séries, l'adsorbant est contenu dans une cartouche en polypropylène ou en verre dont la capacité du réservoir peut être de type seringue ou avec un corps évasé (figure 1). Il est maintenu dans la cartouche entre deux frittés ou bien encore incorporé dans la matrice d'une membrane de filtration (SPEC). Les volumes des cartouches les plus utilisées en toxicologie sont compris entre 1 et 5 mL. La quantité de phase est très variable, le plus souvent entre 30 et 500 mg. L'application des fluides peut se faire selon deux principes :

- par pression positive : il s'agit d'un système qui s'adapte sur le haut de la cartouche permettant de pousser les liquides par le biais d'une seringue facilitant le réglage les

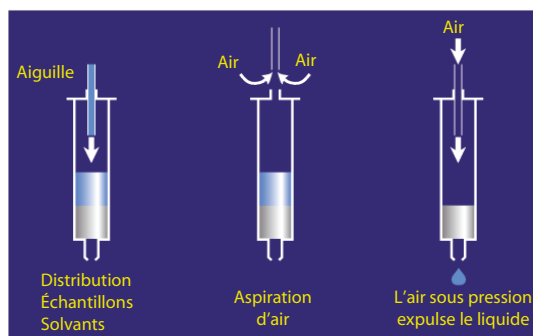


Fig. 3. Principe schématique de l'extraction en phase solide réalisée en pression positive.



Fig. 4. Cuve pour extraction en phase solide dite en pression négative.

débites (figure 3). Cependant, réalisé même pour des petites séries il devient rapidement fastidieux. Ce principe a été automatisé par des industriels autorisant l'extraction de séries ;

- par pression négative : c'est la méthode la plus répandue. Il s'agit le plus souvent d'un bac en verre possédant un couvercle adaptable percé de 6 à 24 orifices muni d'un robinet de réglage et d'une pompe ou tout autre système à vide permet de tirer le vide en créant une dépression (figure 4). L'extraction de grandes séries peut être réalisée selon le même principe sur des plaques plus adaptées à l'extraction de grands nombres d'échantillons composées de 96 puits (figure 5).

6 Applications

Les applications sont nombreuses et variées tant sur le plan de la matrice que du couplage analytique en aval, allant des techniques de chromatographie en phase liquide et en phase



Fig. 5. Système d'extraction en phase solide pour plaque 96 puits. Source : Waters Corporation.

gazeuse équipées de tout type de détecteurs, en passant également par l'électrophorèse capillaire. Pour illustrer la multitude d'applications seules quelques publications récentes représentatives des différentes problématiques seront présentées.

Dans le domaine du suivi thérapeutique, de nombreuses méthodes publiées utilisent ce principe. Elles concernent aussi bien le dosage de 5 antibiotiques [6], le dosage d'antirétroviraux par HPLC/DAD [7] que le dosage de neuf antiépileptiques sur 100 μL de plasma [8], la cyclosporine sur 100 μL de plasma [9], du budénoside avec une limite de quantification de 50 pg/mL par LC/MS [10] ; le dosage de la simvastatine et de l'atorvastatine [11], du fentanyl avec une limite de quantification de 50 pg/mL par le couplage LC/MS/MS [12]. Le dosage du vigabatrin a également pu être réalisé par électrophorèse capillaire équipée d'un détecteur fluorescent [13].

D'autres travaux ont été publiés comparant différentes méthodes d'extraction et leurs impacts sur les rendements d'extraction mais aussi sur les effets matrices en fonction des différentes matrices biologiques dans le cadre d'une recherche large de xénobiotiques.

Une étude incluant 350 urines compare différentes méthodes d'hydrolyses et d'extractions (liquide/liquide et SPE) pour une analyse par GC/MS. Les deux méthodes d'extractions sont apparues similaires pour la plupart des molécules identifiées mais la SPE s'est révélée plus longue à réaliser ; elle s'avère une alternative si une automatisation est possible pour l'analyse de grandes séries [14]. Une autre étude compare également dans du sang total différentes extractions pour 122 médicaments ou stupéfiants basiques. La SPE apparaît plus sensible en termes de limite de détection pour un plus grand nombre de molécules mais aussi la seule capable d'extraire des composés plus polaires tels que la morphine ou la benzoylecgonine [15]. Le couplage LC/MS est très affecté par des phénomènes d'effets matrices qui engendrent pour certaines molécules de la suppression (ou de la majoration) d'ions. Une étude a évalué les différents modes de préparation d'échantillons : injection directe, dilution, précipitation des protéines et SPE pour trois liquides biologiques : plasma, urine et salive pour la recherche des stupéfiants. La SPE est apparue nécessaire pour une analyse sensible du plasma [16]. Une étude a comparé le rendement et les effets matrices de 6 phases stationnaires différentes pour 9 médicaments en solution aqueuse.

La conclusion montre que les phases qui ont les meilleurs rendements ont également les phénomènes de suppression d'ions les plus élevés [17].

Dans le cadre de la recherche large de xénobiotiques plusieurs auteurs rapportent des méthodes permettant la recherche ciblée soit d'une classe de composés dans le sang total [18–20] soit dans l'urine [21, 22]. Certains auteurs rapportent des méthodes autorisant une recherche beaucoup plus vaste de composés acides, neutres ou basiques [23, 24].

L'extraction SPE est aussi très utilisée dans les études métaboliques car elle permet une meilleure extraction des métabolites, composés plus polaires. Des études du métabolisme ont été faites sur la mitragynine (un des alcaloïdes constituant le Kratom) par LC/MS [25] sur des antirétroviraux [26] ou sur une nouvelle drogue de synthèse, la 4-méthylthioamphétamine (4-MTA) [27]. Elle permet aussi bien évidemment l'identification et la quantification des composés glucuroconjugés dans le plasma [28] ou l'urine [29].

Elle est également très employée pour des matrices alternatives. L'identification et la quantification de xénobiotiques dans les cheveux connaît depuis de nombreuses années un essor constant. Beaucoup d'auteurs proposent des méthodes l'utilisant pour la caractérisation de produits stupéfiants [30–32], de substances dopantes [33], de marqueurs de l'alcoolisme [34–37], la recherche de GHB [38] ou encore pour la caractérisation d'une soumission chimique dans le cas où les faits supposés sont éloignés du moment des prélèvements [39]. La salive est aussi un milieu d'investigation toxicologique. Utilisée par de nombreux pays pour le dépistage de la conduite sous l'influence de produits stupéfiants, elle a été aussi utilisée par certains auteurs pour la caractérisation de ces substances [40–43] ou encore le tabagisme [44]. Le méconium matrice complexe, qui permet de mettre en évidence une exposition *in utero* du fœtus aux consommations de xénobiotiques par sa mère durant la gestation, est également de plus en plus investigué. Plusieurs auteurs proposent des méthodes pour caractériser une consommation de cocaïne ou d'opiacés [45] ou encore de buprénorphine [46]. La sueur est également une matrice qui permet de caractériser une consommation de produits stupéfiants [47]. La recherche de xénobiotiques dans les organes est également réalisable par cette extraction [48] et également dans du lait [49].

Dans le cadre de la recherche d'une exposition de certains professionnels à des substances toxiques, notamment les cytotoxiques (5-fluorouracil, méthotrexate) des méthodes d'analyses pour des prélèvements de surface ont été développées [50, 51].

7 Conclusion

L'extraction en phase solide a pris au fil des années une place importante dans la préparation des échantillons. La gamme des phases stationnaires ainsi que leurs conditionnements s'enrichit régulièrement. Ce mode d'extraction permet de réaliser facilement des extractions de composés difficilement extractibles, car très polaires, par des solvants organiques et qui n'étaient donc analysables qu'après une simple précipitation. Elle est aussi promise à un bel avenir car son automatisation existe déjà sous différentes formes et de nombreux laboratoires l'utilisent déjà ou envisagent de le faire.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Chapuis F, Pichon V, Hennion MC. Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières. *Oil Gas Sci Technol.* 2005; 60: 899–912.
2. Van Hout MW, van Egmond WM, Franke JP, de Zeeuw RA, de Jong GJ. Feasibility of the direct coupling of solid-phase extraction-pipette tips with a programmed-temperature vaporiser for gas chromatographic analysis of drugs in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 766: 37–45.
3. Kumazawa T, Hasegawa C, Lee XP, Hara K, Seno H, Suzuki O, Sato K. Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44: 602–607.
4. Mitchell W, Rahn P. HPLC in Cosmetic Analysis. *Drug and Cosmetics Ind.* 1978; 123: 6–68.
5. Telepchak M, August F, Chaney G. Forensic and clinical application of solid phase extraction. Humana press, 2008.
6. Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 864: 161–167.
7. Cattaneo D, Maggiolo F, Ripamonti D, Perico N. Determination of atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr Sci.* 2008; 46: 485–489.
8. Subramanian M, Birnbaum AK, Rimmel RP. High-speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2008; 30: 347–356.
9. Dénes J, Katona M, Hosszú A, Czuczy N, Takáts Z. Analysis of biological fluids by direct combination of solid phase extraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2009; 81: 1669–1675.
10. Streel B, Cahay B, Klinkenberg R. Using total error concept for the validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of budesonide epimers in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 2290–2300.
11. Nováková L, Vlcková H, Satínský D, Sadílek P, Solichová D, Bláha M, Bláha V, Solich P. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 2093–2103.
12. Takashina Y, Naito T, Mino Y, Kagawa Y, Kawakami J. Validated LC coupled to ESI-MS/MS analysis for fentanyl in human plasma and UV analysis in applied reservoir transdermal patches using a simple and rapid procedure. *J Clin Pharm Ther.* 2009; 34: 523–529.
13. Musenga A, Mandrioli R, Comin I, Kenndler E, Raggi MA. Determination of vigabatrin in human plasma by means of CE with LIF detection. *Electrophoresis.* 2007; 28: 3535–3541.

14. Peters FT, Drvarov O, Lottner S, Spellmeier A, Rieger K, Haefeli WE, Maurer HH. A systematic comparison of four different workup procedures for systematic toxicological analysis of urine samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393: 735–745.
15. Juhascik MP, Jenkins AJ. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs. *J Chromatogr Sci.* 2009; 47: 553–557.
16. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003; 14: 1290–1294.
17. Van de Steene JC, Mortier KA, Lambert WE. Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *J Chromatogr A.* 2006; 1123: 71–81.
18. Martínez MA, Sánchez de la Torre C, Almarza E. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Anal Toxicol.* 2004; 28: 174–180.
19. Sánchez de la Torre C, Martínez MA, Almarza E. Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures. *Forensic Sci Int.* 2005; 155: 193–204.
20. Kristoffersen L, Øiestad EL, Opdal MS, Krogh M, Lundanes E, Christophersen AS. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850: 147–160.
21. Murray GJ, Danaceau JP. Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 3857–3864.
22. Paterson S, Cordero R, McCulloch S, Houldsworth P. Analysis of urine for drugs of abuse using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Ann Clin Biochem.* 2000; 37: 690–700.
23. de Zeeuw RA, Wijsbeek J, Franke JP. SPEC disc solid-phase extraction for rapid broad-spectrum drug screening in urine. *J Anal Toxicol.* 2000; 24: 97–101.
24. Boone CM, Douma JW, Franke JP, de Zeeuw RA, Ensing K. Screening for the presence of drugs in serum and urine using different separation modes of capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int.* 2001; 121: 89–96.
25. Philipp AA, Wissenbach DK, Zoerntlein SW, Klein ON, Kanogsunthornrat J, Maurer HH. Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug Kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2009; 44: 1249–1261.
26. Williams LD, Von Tungeln LS, Beland FA, Doerge DR. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of the metabolism and disposition of the anti-retroviral nucleoside analogs zidovudine and lamivudine in C57BL/6N and B6C3F1 mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 798: 55–62.
27. Ewald AH, Peters FT, Weise M, Maurer HH. Studies on the metabolism and toxicological detection of the designer drug 4-methylthioamphetamine (4-MTA) in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 824: 123–131.
28. Musuamba FT, Di Fazio V, Vanbinst R, Wallemacq P. A fast ultra-performance liquid chromatography method for simultaneous quantification of mycophenolic acid and its phenol- and acyl-glucuronides in human plasma. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 110–115.
29. Svensson JO, Andersson M, Gustavsson E, Beck O. Electrospray LC-MS method with solid-phase extraction for accurate determination of morphine-, codeine-, and ethylmorphine-glucuronides and 6-acetylmorphine in urine. *J Anal Toxicol.* 2007; 31: 81–86.
30. Cognard E, Rudaz S, Bouchonnet S, Staub C. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 826: 17–25.
31. Wu YH, Lin KL, Chen SC, Chang YZ. Integration of GC/EI-MS and GC/NCI-MS for simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, MDMA, ketamine, and metabolites in human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 870: 192–202.
32. Cordero R, Paterson S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 ; 850: 423–431.
33. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goullé JP, Ludes B. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2000; 107: 381–388.
34. Tarcomnicu I, van Nuijs AL, Aerts K, De Doncker M, Covaci A, Neels H. Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2010; 196: 121–127.
35. Kharbouche H, Sporkert F, Troxler S, Augsburg M, Mangin P, Staub C. Development and validation of a gas chromatography-negative chemical ionization tandem mass spectrometry method for the determination of ethyl glucuronide in hair and its application to forensic toxicology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 2337–2343.
36. Morini L, Zucchella A, Poletini A, Politi L, Groppi A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: An in vitro experiment. *Forensic Sci Int.* 2009; 198: 23–27.
37. Paul R, Kingston R, Tsanaclis L, Berry A, Guwy A. Do drug users use less alcohol than non-drug users? A comparison of ethyl glucuronide concentrations in hair between the two groups in medico-legal cases. *Forensic Sci Int.* 2008 21; 176: 82–86.
38. Kalasinsky KS, Dixon MM, Schmunk GA, Kish SJ. Blood, brain, and hair GHB concentrations following fatal ingestion. *J Forensic Sci.* 2001; 46: 728–730.
39. Kintz P, Evans J, Villain M, Chatterton C, Cirimele V. Hair analysis to demonstrate administration of sildenafil to a woman in a case of drug-facilitated sexual assault. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 553–556.
40. Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral

- fluid by long column fast gas chromatography/electron impact mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2005; 40: 739–753.
41. Wood M, Laloup M, Ramirez Fernandez Mdel M, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, De Boeck G, Samyn N. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2005; 150: 227–238
 42. Fritch D, Blum K, Nonnemacher S, Haggerty BJ, Sullivan MP, Cone EJ. Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates, and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 569–577.
 43. Milman G, Barnes AJ, Lowe RH, Huestis MA. Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2010; 1217: 1513–1521.
 44. Kim I, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 814: 233–240.
 45. Pichini S, Marchei E, Pacifici R, Pellegrini M, Lozano J, García-Algar O. Application of a validated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay to the analysis of m- and p-hydroxybenzoylecgonine in meconium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 820: 151–156.
 46. Kacinko SL, Shakleya DM, Huestis MA. Validation and application of a method for the determination of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronide conjugates in human meconium. *Anal Chem.* 2008; 80: 246–252.
 47. Brunet BR, Barnes AJ, Scheidweiler KB, Mura P, Huestis MA. Development and validation of a solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous quantification of methadone, heroin, cocaine and metabolites in sweat. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 392: 115–127.
 48. Ishii R, Horie M, Chan W, MacNeil J. Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008; 25: 509–519.
 49. Blasco C, Picó Y, Andreu V. Analytical method for simultaneous determination of pesticide and veterinary drug residues in milk by CE-MS. *Electrophoresis.* 2009; 30: 1698–1707.
 50. Turci R, Micoli G, Minoia C. Determination of methotrexate in environmental samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography: ultraviolet or tandem mass spectrometry detection? *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000; 14: 685–691.
 51. Micoli G, Turci R, Arpellini M, Minoia C. Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 750: 25–32.