

## Revue générale

# Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés

## *Liquid-liquid extraction: theory, applications and difficulties*

Emuri Abe\*, Stanilas Grassin Delyle, Jean Claude Alvarez

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP et UVSQ, 104 boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

**Résumé** – Les méthodes d'extraction liquide-liquide (ELL) permettent le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible. Elles sont couramment employées en pharmacologie/toxicologie afin de purifier et concentrer les échantillons préalablement à une analyse par méthode chromatographique. Divers paramètres physico-chimiques régissent la réalisation d'une ELL, propres aux solvants employés et aux solutés à extraire. La connaissance de certaines propriétés du solvant telles sa miscibilité à l'eau, sa constante d'acidité, sa constante diélectrique, son moment dipolaire, sa densité, sa volatilité ainsi que sa toxicité permettront le choix de ce solvant seul ou en mélange pour l'extraction d'une substance donnée. De la même manière, la connaissance des propriétés du soluté telles sa structure, sa constante d'acidité, sa lipophilie, la nature et la complexité de la matrice dans laquelle il se trouve, permettront d'optimiser l'extraction, dont l'efficacité sera évaluée par le rendement d'extraction. L'influence de ces paramètres sera abordée dans cette revue, et les différents processus d'ELL (extraction simple, multiple, *back-extraction*, formation de paires d'ions) seront exposés simultanément avec leurs avantages et inconvénients respectifs. La maîtrise de toutes ces variables permettra à l'opérateur une optimisation des étapes d'ELL lors de la mise au point de méthodes d'analyse en pharmacologie/toxicologie.

**Mots clés** : Extraction liquide-liquide, solvants, soluté, propriétés physico-chimiques

**Abstract** – Liquid-liquid extraction (LLE) methods allow transfer of compounds solubilized in a liquid phase into another immiscible liquid phase. These methods are routinely used in pharmacology/toxicology so as to purify and concentrate biological samples before chromatographic analysis. Many different physico-chemical properties of solvents and solutes have to be taken into account in LLE. To perform an extraction, the choice of a solvent or of a mixture of solvents depends on their miscibility with water, proticity, dielectric constant, dipole moment, density, volatility and toxicity. In the same way, the evaluation of properties of solutes such as structure, acidity constant and lipophilicity, together with the nature and complexity of the matrix, will allow the optimization of the extraction process. Its efficiency will be evaluated with the extraction recovery. The influence of these parameters will be discussed in this review, and the different extraction processes (single, multiple, back-extraction and ion-pair formation) will be described with their respective advantages and drawbacks. The control of all these variables should allow the operator to optimize LLE during development of analytical methods in pharmacology/toxicology.

**Key words**: Liquid-liquid extraction, solvents, solutes, physico-chemical properties

Reçu le 8 mars 2010, accepté après modifications le 22 avril 2010  
Publication en ligne le 8 juillet 2010

## 1 Introduction

Les méthodes d'extraction ont été adoptées dès la pré-histoire par les hommes qui avaient recours à la filtration de l'eau. Les Égyptiens connaissaient l'enflourage à froid ou à chaud permettant d'extraire le parfum des fleurs. La distillation sèche ou humide, inventée par Avicenne, médecin philosophe

perse du X<sup>e</sup> siècle, était connue des alchimistes du Moyen Âge afin d'obtenir l'essence de chaque substance. Mais ce n'est qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, avec la synthèse des solvants organiques, qu'apparaît l'extraction liquide-liquide (ELL) qui permet d'isoler de nombreuses espèces chimiques tels les corps gras ou les alcaloïdes. Ce sont les industries nucléaires et pharmaceutiques dans les années 1940–1950 qui les premières ont développé massivement ces techniques de purification. À la

\* Correspondance : Emuri Abe, [emuri.abe@rpc.aphp.fr](mailto:emuri.abe@rpc.aphp.fr)

même période, la biologie expérimentait l'isolement d'hormones, de corps gras ou d'antibiotiques. Dans les années 1950–1960, ce sera au tour des industries pétrochimiques et pétrolières d'employer d'énormes décanteurs pour extraire les molécules d'intérêt. Aujourd'hui l'ELL reste très utilisée en pharmacologie et en toxicologie pour le prétraitement des échantillons car relativement simple à mettre en œuvre. Nous allons aborder les principes, les solvants ainsi que les facteurs influençant l'ELL. Puis nous verrons les différents types d'ELL ainsi que leurs avantages et les inconvénients.

## 2 Principe et généralités

L'ELL est fondée sur la distribution inégale d'un soluté entre deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux.

### 2.1 Notion de coefficient de partage et taux de distribution

Le schéma classique de la séparation est l'extraction par un solvant B d'un soluté S dissous dans une solution A. L'indice A est par convention attribué à la phase aqueuse et l'indice B à la phase organique. Soit une solution A contenant un soluté S à extraire. Lorsque l'on ajoute à cette solution A un solvant B non miscible, le soluté S se répartit dans les deux phases (A et B) dans des proportions bien définies dépendant de son coefficient de partage thermodynamique  $K_D$ . Le  $K_D$  est le rapport des fractions molaires  $N_A$  et  $N_B$  du soluté dans les deux phases à l'équilibre dans des conditions données de température, de pression et de pH. Il s'exprime par l'équation suivante :

$$K_D = N_B/N_A.$$

$K_D$  varie selon les solutés à répartir et selon le couple de solvants. La valeur des fractions molaires n'étant pas facilement accessible, on utilise plus classiquement le coefficient de partage  $\lambda$  ou  $K$  qui est le rapport des concentrations de la substance S dans les deux phases à l'équilibre :

$$\lambda = C_B/C_A.$$

Le coefficient de partage le plus utilisé est le coefficient de partage octanol/eau noté P ou exprimé sous la forme logP. L'octanol est un solvant organique très hydrophobe. La valeur de P, d'après la définition, reflète alors le caractère lipophile de la molécule. Plus cette valeur est grande, plus la substance S à extraire est soluble dans l'octanol et donc lipophile. Dans le tableau I figurent les valeurs de logP de quelques molécules.

Lorsque S se trouve sous plusieurs formes (moléculaire ou ionisée) dans une et/ou l'autre des phases, il faudra tenir compte de la somme des concentrations de chaque forme et il convient de parler de la constante de distribution **D** définie par l'équation suivante :

$$D = \Sigma C_B / \Sigma C_A.$$

Les valeurs des coefficients de partage sont difficiles à trouver car il apparaît délicat de recenser pour une substance donnée le coefficient de partage entre deux solvants vu la multitude de possibilités.

**Tableau I.** Coefficient de partage octanol/eau de quelques molécules.

Molécule	Log P
Paracétamol	0,5
3 Hydroxy-bromazépam	1,1
Bromazépam	1,7
Propofol	3,8
Imipramine	4,8
Ritonavir	6,0
Cholesterol	8,3

### 2.2 Rendement d'extraction

Lorsque l'on procède à une extraction, un des buts à atteindre est de récupérer la plus grande quantité possible de substance S à l'aide d'un volume donné de solvant extractif. Pour étudier le rendement d'extraction, il faut connaître la quantité extraite par le solvant B ( $Q_B$ ) à partir de la quantité initiale présente dans le solvant A ( $Q_{A0}$ ). Le rendement d'extraction  $\rho$  s'exprime de la manière suivante :

$$\rho = Q_B/Q_{A0} \text{ dans le cas d'une extraction simple}$$

$$\text{ou } \rho = \sum Q_B/Q_{A0} \text{ dans le cas d'une extraction multiple.}$$

Plus  $Q_B$  sera proche de  $Q_{A0}$ , meilleur sera le rendement d'extraction. Le rendement d'extraction dépend du solvant et du soluté et par conséquent de la constante de distribution, du volume de solvant d'extraction et du nombre d'opérations effectuées.

En effet, lorsque l'on exprime le rendement d'extraction de la manière suivante,

$$\rho = Q_B/Q_{A0} = \frac{C_B \times V_B}{C_B V_B + C_A V_A} \text{ et } D = C_B/C_A$$

$$\text{et } Q_B = Q_{A0} - Q_A.$$

On peut alors écrire :

$$\rho = 1 - \frac{1}{\left[1 + D \frac{V_B}{V_A}\right]^n}$$

avec  $V_A$  = volume de solution aqueuse (à extraire)

$V_B$  = volume de solvant organique

$C_B$  = concentration de l'analyte dans la phase

$C_A$  = concentration de l'analyte dans la phase aqueuse

$D$  = constante de distribution

$n$  = nombre d'opérations (à  $V_B$  constant).

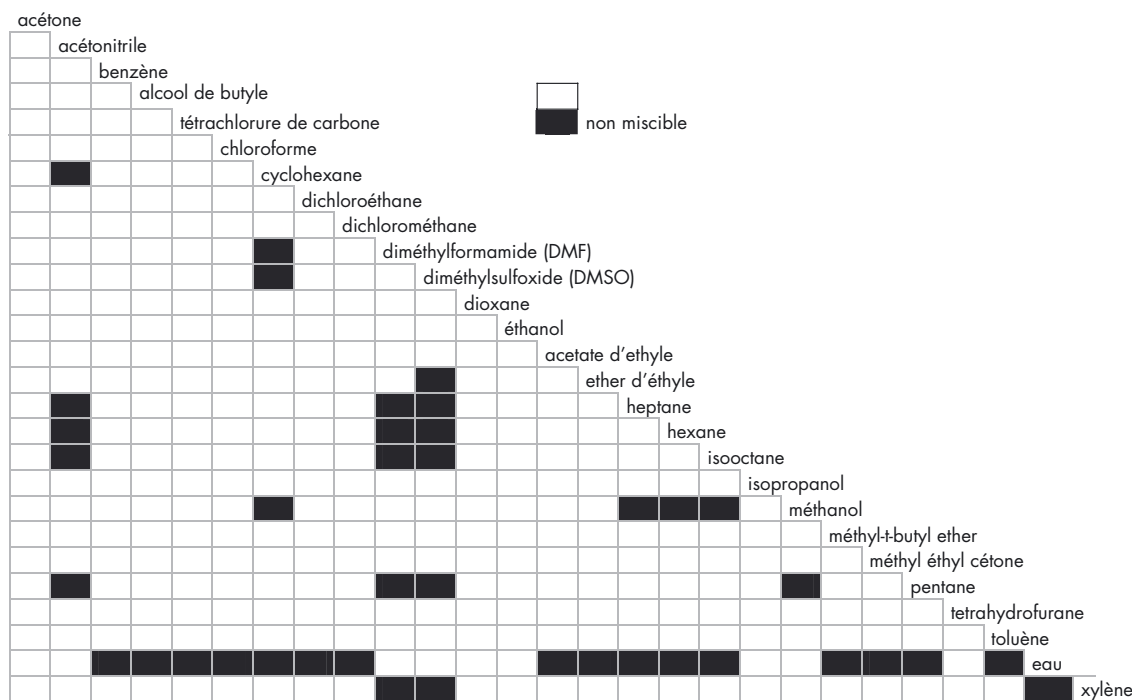
Il est alors possible de démontrer que plus le volume de solvant d'extraction  $V_B$  est grand par rapport au volume de solution aqueuse à extraire  $V_A$ , meilleur est le rendement d'extraction.

Exemple :

$$\text{si } D = 10 \text{ et } V_B/V_A = 1 \text{ alors } \rho = 1 - \frac{1}{1 + 10 \times 1/1} = 0,909;$$

$$\text{si } D = 10 \text{ et } V_B/V_A = 5 \text{ alors } \rho = 1 - \frac{1}{1 + 10 \times 5/1} = 0,98.$$

**Tableau II.** Tableau de miscibilité des solvants.



En pratique courante le volume de solvant organique  $V_B$  à utiliser doit être 4 à 5 fois supérieur à celui de la phase aqueuse  $V_A$  à extraire.

De manière similaire on démontre que pour un même volume de solvant organique  $V_B$ , le rendement d'extraction est meilleur lorsqu'une extraction multiple est réalisée par rapport à une extraction simple.

Exemple :

$$\begin{aligned} &\text{si } D = 10 \text{ et } V_B/V_A = 1 \text{ et } n = 1 \\ &\text{alors } \rho = 1 - \frac{1}{[1 + 10 \times 1/1]^1} = 0,909; \\ &\text{si } D = 10 \text{ et } V_B/V_A = 1 \text{ et } n = 2 \\ &\text{alors } \rho = 1 - \frac{1}{[1 + 10 \times 1/1]^2} = 0,991. \end{aligned}$$

### 3 Les solvants

Le solvant est le milieu dans lequel s'effectue la réaction, mais il n'intervient pas dans celle-ci. Le solvant a la capacité de dissoudre d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans se modifier lui-même. Chaque solvant a des caractéristiques différentes qui sont les conséquences de sa structure moléculaire. Un solvant se caractérise par :

- sa miscibilité à l'eau ;
- sa constante d'acidité (pKa, ou l'aptitude à créer des liaisons hydrogène) ;
- sa constante diélectrique (le caractère dissociant du solvant) ;
- son moment dipolaire ou son caractère polaire ;
- sa densité et sa volatilité ;
- sa toxicité.

#### 3.1 Miscibilité à l'eau

Un solvant est dit non miscible à l'eau lorsque, quand il est ajouté à celui-ci, il se crée deux phases distinctes. Le tableau II résume la miscibilité des solvants classiquement utilisés. En pharmacologie ou en toxicologie et plus généralement en biologie, les molécules d'intérêt sont dissoutes dans les matrices biologiques qui sont majoritairement constituées d'eau. Lors d'une ELL, ces substances sont extraites par des solvants organiques nécessairement non miscibles à l'eau (ex : hexane, dichlorométhane).

#### 3.2 La constante d'acidité

La constante d'acidité est l'aptitude du solvant à créer des liaisons hydrogène. Un solvant est dit protique lorsque celui-ci est capable d'engendrer une liaison hydrogène avec les molécules qui l'entourent. Les solvants protoniques ou protogènes sont des solvants qui possèdent dans leur structure moléculaire un ou plusieurs atomes d'hydrogène (H) susceptibles de former des liaisons hydrogènes (exemples : eau, méthanol ou éthanol). On parle aussi de solvant « donneur de H ». En revanche, un solvant est dit protophile lorsqu'il accepte un hydrogène par une liaison H. Les sites accepteurs sont les atomes électronégatifs comme l'azote (N) ou l'oxygène (O). Ce sont des espèces « accepteurs de H » (exemple : acetate d'éthyle, acétone). Un solvant peut être à la fois protogène et protophile, on dit alors qu'il est amphiprotique. Il est à la fois « donneur de H » par la présence d'un H mobile et « accepteur de H » par la présence d'un hétéroatome (exemple : eau ou alcool). Un solvant est aprotique quand il n'est ni protogène ni protophile (exemple : benzène, heptane, acétonitrile), caractéristique que partagent de nombreux solvants utilisés dans l'ELL.

En revanche, il sera préférable d'éviter des solvants donneurs de H, pour éviter les interactions solutés/solvants.

### 3.3 La constante diélectrique

La constante diélectrique  $\epsilon_r$  se définit comme le rapport entre la permittivité  $\epsilon$  du solvant et la permittivité du vide  $\epsilon_0$ . La permittivité  $\epsilon$  est le rapport du déplacement électrique  $\mathbf{E}$  (ou induction électrique) sur l'intensité du champ électrique  $\mathbf{D}$  exprimée en Farad/m. Cette constante est une quantité sans dimension. Il s'agit de la dissociabilité du solvant. Plus la constante diélectrique est élevée, plus le solvant favorise la séparation des atomes, voire empêche les molécules de réagir. Un solvant possède un fort pouvoir dissociant lorsque  $\epsilon > 40$ . L'eau est le solvant le plus dissociant avec  $\epsilon = 80,3$ . Un solvant est non dissociant lorsque  $\epsilon < 20$  (par exemple le chloroforme avec  $\epsilon = 4,8$ ). En extraction liquide-liquide, les solvants organiques sont des solvants très peu dissociants.

### 3.4 Le moment dipolaire

Le moment dipolaire se définit comme la répartition des charges dans une molécule. Il se calcule par l'équation :  $\mu = q \times r$ , où  $q$  est la différence de charge exprimée en coulomb (C) et  $r$  la distance entre les deux atomes (en m). Une molécule présente un moment dipolaire lorsqu'il existe un barycentre des charges positives (P) distinct du barycentre des charges négatives (N). Il lui donne un caractère ionisant ou polaire. Un solvant sera d'autant plus polaire que son moment dipolaire sera élevé. Un solvant polaire ( $\mu > 1,3$  comme l'eau, le méthanol ou l'acétone) solubilisera des substances polaires alors qu'un solvant apolaire dissoudra des molécules apolaires ( $\mu < 0,5$  comme le benzène ou le tétrachlorure de carbone). Un solvant apolaire est un solvant inerte qui ne réagit pas avec l'analyte. En pratique, plus le solvant est apolaire, plus il est sélectif. Il conviendra de choisir le solvant le plus apolaire possible dans lequel l'analyte est encore soluble.

### 3.5 Densité et volatilité

La densité d'un corps ( $d$ ) est le rapport de sa masse volumique sur la masse volumique de l'eau. Lorsque l'on procède à une ELL, il est nécessaire de connaître ce paramètre pour localiser la phase organique par rapport à la phase aqueuse. Un solvant organique d'une densité inférieure à 1 se situera au-dessus de la phase aqueuse (diéthylerther  $d = 0,7$ ), alors qu'un solvant d'une densité supérieure à 1 sera en dessous de la phase aqueuse (dichlorométhane  $d = 1,33$ ).

Par ailleurs, pour l'ELL, un solvant doit être volatil, pour qu'il puisse s'évaporer facilement.

### 3.6 Toxicité

Tous les solvants organiques sont des substances chimiques classées dans les inventaires internationaux ou européens. La numérotation la plus répandue est celle du Chemical

Abstract Service (n° CAS) [1]. Tout solvant possède des caractéristiques propres de danger qui sont la toxicité, l'inflammabilité et l'écotoxicité, le risque d'incendie ou d'explosion et la réactivité... Le risque est généré par l'utilisation directe du solvant ou par une exposition passive [2]. Il est donc important de protéger le personnel par le port de gants et de lunettes de protection et de manipuler des produits sous une hotte. Les déchets seront acheminés par circuit particulier. Tous les solvants organiques ont été reconnus comme susceptibles de provoquer des maladies professionnelles et apparaissent au tableau 84 des maladies professionnelles du régime général [3]. Par conséquent il est utile de prendre connaissance des dangers liés à ces produits par la lecture des étiquettes du flaconnage ainsi que de la fiche de sécurité qui l'accompagne, fournie par le distributeur. Ces fiches sont aussi consultables auprès des interlocuteurs privilégiés comme le médecin du travail, les membres du comité d'hygiène, de sécurité et des conditions du travail (CHSCT) ou les responsables sécurité.

### 3.7 Classification des solvants

Il n'existe pas de classement officiel des solvants. Ceux-ci peuvent être classés selon leurs similitudes de groupement chimiques [2] : hydrocarbures aromatiques, alcools, esters, cétones, éthers... Mais la classification selon les propriétés chimiques vues précédemment semble plus intéressante concernant l'ELL.

#### Solvants protiques et polaires

Ces solvants peuvent former des liaisons H, possèdent un fort moment dipolaire ( $\mu$  élevé) et un fort pouvoir ionisant. Ils sont souvent miscibles à l'eau. Citons comme exemple l'acide formique ou les autres acides carboxyliques. Ce sont des solvants utilisés lors de *back-extraction* (voir section 5.2).

#### Solvants aprotiques et dipolaires

Ce sont des solvants miscibles à l'eau le plus souvent, qui ne donnent et n'acceptent pas de liaisons H, et qui ont un fort pouvoir ionisant et un caractère dissociant. Ce sont par exemple l'acétonitrile, l'acétone ou le diméthylsulfoxyde (DMSO).

#### Solvants aprotiques et apolaires

Ces derniers ne forment pas de liaison H, présentent un moment dipolaire très faible et sont souvent non miscibles dans l'eau : hexane, benzène, toluène ou tétrachlorure de carbone.

#### Solvants aprotiques et peu polaires

Ce sont des solvants intermédiaires. Ils possèdent un moment dipolaire faible et ne peuvent pas former de liaisons H.

On retrouve dans cette famille l'éther, le thioéther ou le tétrahydrofurane.

Ces deux dernières familles de solvants seront préférentiellement utilisées en ELL.

D'autres classifications sont disponibles, comme celle de Rohrschneider et Snyder [4] qui proposent une classification selon la polarité et la sélectivité, ou celle de Hildebrand selon les solubilités.

## 4 Les facteurs influençant l'extraction

Beaucoup de facteurs indépendants de la nature du solvant sont susceptibles d'influencer l'extraction du soluté. Parmi ces facteurs, citons la matrice et les propriétés physicochimiques de la molécule.

### 4.1 La matrice

Les matrices et en particulier les matrices biologiques sont des milieux très variés et très complexes (sang, urines, liquide gastrique, viscères, cheveux...). Plus la matrice est complexe, plus il y aura de molécules interférentes. Elles sont d'origine endogène ou exogène, organique ou minérale (protéines, lipides, phospholipides, acides biliaires, ions ou autres médicaments). Le plasma est constitué à 90 % d'eau et contient des électrolytes, des protéines (75 g/L) dont l'albumine, des globulines ainsi que des lipides. Les molécules d'intérêt en toxicologie ne représentent alors qu'une infime partie de cette matrice. Une extraction idéale serait réalisée grâce à un solvant organique qui permettrait de n'extraire que le soluté et de laisser dans la matrice toutes les autres substances. Un tel solvant organique n'existe pas. En pratique le solvant devra être le plus sélectif possible vis-à-vis du soluté.

### 4.2 Le soluté

Le soluté est la substance ou la molécule à extraire. Il possède des caractères physicochimiques qui lui sont propres. Sa structure chimique influence naturellement le coefficient de partage. Celui-ci augmente avec la longueur de la chaîne carbonée et le nombre de carbones identiques, une molécule ramifiée ayant un coefficient de partage inférieur à la même molécule linéaire. La présence d'un hétéro-atome d'oxygène ou d'azote diminue le coefficient de partage car il apporte un groupement hydrophile (groupement hydroxyle, carbonyle ou amine). Au contraire, la présence d'un atome d'halogène favorise le passage dans la phase organique.

### 4.3 Influence du pH

Une règle fondamentale dans le processus d'extraction est que seules les molécules de charge globalement neutre sont extractibles par les solvants organiques. C'est pourquoi les ions tels les électrolytes ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ ) ne sont pas extraits par les solvants hydrophobes. Il est donc nécessaire de supprimer le caractère ionique avant de procéder à l'extraction. Les anions

d'acides carboxyliques ( $\text{A}^-$ ) ne sont pas extractibles à partir d'une solution aqueuse. En diminuant le pH, on favorise l'apparition de la molécule sous sa forme moléculaire ( $\text{AH}$ ). On parle de recul d'ionisation. Il en est de même pour les cations ( $\text{BH}^+$ ). En augmentant le pH, il y a perte du proton lié à l'azote qui se transforme en molécule extractible (B). C'est le cas par exemple des alcaloïdes, des amphétamines, des benzodiazépines ou des opiacés qui sont des substances extractibles en milieux alcalin [5-7]. Il est important de connaître la constante d'acidité ( $\text{pK}_a$ ) de l'analyte. Il convient de se situer dans une zone de pH à ( $\text{pK}_a - 2$ ) pour les molécules acides et à ( $\text{pK}_a + 2$ ) pour les molécules basiques. Dans ces conditions de pH, la forme moléculaire est majoritaire et représente 99 % de l'analyte. Dans le cas d'ampholytes, le pH optimal de travail se situera au pH isoélectrique. S'il n'est pas possible de rendre la molécule neutre, une des solutions est de travailler par formation de paires d'ions.

## 5 Les principales méthodes d'extraction liquide-liquide

Il existe à ce jour dans la littérature plus de 23 000 articles référencés Pubmed décrivant des techniques d'extraction liquide-liquide. Ces méthodes permettent l'extraction de composés ayant des températures d'ébullition voisines, l'extraction azéotrope (mélange binaire de liquides, homogènes et de composition fixe, qui bout à une température constante), ou la séparation de molécules thermosensibles. En biologie, elles permettent la concentration et la purification de très nombreuses molécules comme les médicaments, pesticides, stéroïdes, lipides, vitamines, métaux... Ces techniques permettent la récupération simultanée de plusieurs molécules.

### 5.1 L'extraction simple

L'extraction simple consiste à extraire en une seule étape le maximum de soluté initialement présent dans la solution A par le solvant B. Le solvant B sera choisi en fonction de son pouvoir dissolvant vis-à-vis de S, c'est-à-dire un coefficient de partage favorable à B. En pratique, le solvant A et le solvant B sont mis en contact dans un tube fermé de manière étanche, puis une agitation énergétique est pratiquée pendant un temps nécessaire à l'établissement d'un équilibre de concentration entre les deux phases. L'agitation peut être manuelle ou aidée d'un vortex ou mécanique (portoir rotatif). Cependant l'agitation ne doit pas être trop brutale et doit être réalisée de manière à éviter les émulsions qui sont ensuite difficiles voire impossibles à casser. La formation d'émulsions est un phénomène fréquent lors d'extraction de matrice biologique, rendant la méthode d'extraction non reproductible. Toutefois les températures de congélation des solvants d'extraction étant plus basse que celles des matrices biologiques, l'extrait peut être congelé afin de faciliter la récupération de la phase organique. La séparation des deux phases s'effectue par une décantation; le processus est accéléré par la centrifugation du mélange. L'extrait est récupéré puis concentré par évaporation partielle ou complète, avant d'être repris puis injecté dans le système

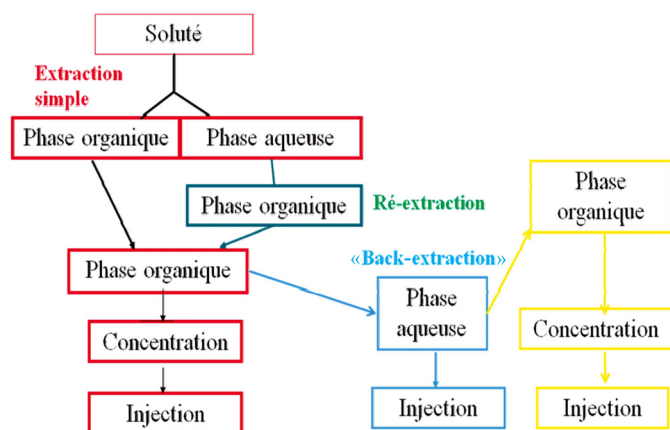


Fig. 1. Les différents types d'extraction.

chromatographique. Le procédé d'extraction est résumé sur la figure 1. En pharmacologie et en particulier en pharmacocinétique seront privilégiées les techniques d'extractions spécifiques d'une molécule (et éventuellement de son métabolite) comme par exemple le paracétamol [8], le darunavir [9] ou l'apomorphine [10]; en toxicologie la recherche et le dosage d'un composé spécifique comme par exemple l'identification de l'embutramide [11] ou de la colchicine [12]. Cependant ces techniques ne sont pas strictement spécifiques d'une molécule car le solvant employé peut extraire de la matrice toutes les molécules ayant des propriétés physico-chimiques proches. Cette caractéristique peut être mise à profit afin d'extraire, en une seule étape, un groupe de molécules de la même famille chimique comme les benzodiazépines [13], les lipides [14] ou les pesticides [15]. Il est possible d'aller encore plus loin dans la gamme des solutés à extraire en procédant à une extraction par des mélanges de solvants de propriétés différentes. C'est le cas notamment des méthodes d'extraction de screening toxicologique non ciblé. La combinaison de deux, trois, voire quatre solvants permet d'extraire un large panel de solutés. Les mélanges fréquemment utilisés sont les combinaisons suivantes : chloroforme/heptane/propanol-2 [16], toluène/acétate d'éthyle [16], ou hexane/diéthylether [17]. Les différentes méthodes d'extraction citées sont résumées dans le tableau III.

## 5.2 Extraction multiple

Les extractions multiples sont employées dans deux cas.

– Le rendement d'extraction simple n'est pas satisfaisant, ce qui signifie que le coefficient de partage n'est pas suffisamment grand pour pouvoir extraire en une seule fois la quasi totalité du soluté. Dans cette situation, il peut être nécessaire de réitérer l'opération d'extraction afin d'obtenir un rendement d'extraction satisfaisant. On parle alors d'extraction par épuisement. Le schéma d'extraction est résumé sur la figure 1. Les différents extraits obtenus sont par la suite mélangés puis concentrés pour isoler le soluté. C'est le cas notamment de la technique d'extraction de stéroïdes urinaires décrites par Menini *et al.* [18]. Il est mathématiquement démontrable que le rendement d'extraction d'une extraction multiple est meilleur que celui d'une extraction simple (*cf.* paragraphe section 2-2).

L'inconvénient majeur de la méthode d'extraction par épuisement est l'utilisation de gros volume de solvant, ainsi qu'une augmentation du temps de traitement de l'échantillon.

– L'extrait n'est pas suffisamment purifié, la réextraction de ce premier est nécessaire afin d'en éliminer les substances interférentes. Le soluté est en général resolubilisé dans une phase aqueuse. Cette procédure est appelée communément *back-extraction* (figure 1). La phase ainsi récupérée peut être directement injectée dans le système chromatographique. Par exemple, les antidépresseurs sérotoninergiques peuvent être extraits par un mélange hexane/alcool isoamylique, puis ré-extraits à nouveau dans un milieu aqueux acide afin de les purifier selon la technique de Duverneuil *et al.* [19].

D'autres étapes d'extraction ou de purification peuvent se rajouter au mode opératoire, c'est ainsi qu'une triple extraction est réalisée pour le dosage des opiacés par Gaillard [5] et une extraction suivie de deux étapes de purification peuvent être utiles pour le dosage des amphétamines [7]. Cependant, il faut garder en mémoire que l'ajout d'étapes purifie certes l'échantillon, mais augmente le temps de prétraitement de l'échantillon et le risque de perte du soluté. Il faut donc faire un choix entre l'élimination d'interférence et la perte de soluté dans l'extrait final.

## 5.3 Extraction par paire d'ions

Le principe de l'extraction par paire d'ions repose sur l'élimination ou le camouflage de la charge d'un ion par une molécule de charge opposée appelée contre-ion, puisque seules les molécules de charge neutre sont extractibles par les solvants organiques. Ce procédé concerne les molécules pour lesquelles le recul d'ionisation n'est pas suffisant. C'est le cas notamment de la succinylcholine [20], qui est un ammonium quaternaire, des bases fortes ou des esters monosulfuriques. Le contre ion doit être suffisamment volumineux et hydrophobe et un caractère peu dissociant pour favoriser le passage du complexe vers la phase organique. Des paires d'ions peuvent être formées par des composés tensioactifs anioniques comme le dioctylsulfosuccinate de sodium (DOSS) ou des ammoniums quaternaires à longues chaînes.

## 5.4 Extraction liquide-liquide sur support solide

Les extractions en milieu liquide-liquide « classique », comme nous l'avons vu précédemment, sont des techniques qui requièrent l'intervention d'un technicien qualifié à toutes les étapes de la manipulation. De plus ces méthodes sont rythmées par des étapes de durée incompressible comme le temps de contact entre la matrice et le solvant organique (agitation en moyenne de 15 minutes) ou le temps de décantation (accélééré par la centrifugation en moyenne de 5 minutes). Afin de pallier à ces difficultés et à ces temps morts, les industriels ont développé l'extraction liquide-liquide sur un support solide qui est constitué de terre de diatomées. Les diatomées sont des algues unicellulaires entourées d'une coque siliceuse. La terre de diatomées est conditionnée dans des cartouches pour de type *solid phase extraction* (SPE). Les procédures d'extraction sont simples, puisque la première étape consiste à déposer

**Tableau III.** Résumé des différentes méthodes d'extraction.

Molécules extraites	Volume de l'échantillon	pH d'extraction	Solvants d'extraction	Volume du solvant d'extraction	Référence
Extraction simple					
Paracétamol	0,5 mL de sérum	–	Diethyl ether	5 mL	8
Apomorphine	0,5 mL de sérum	–	Diethyl ether	2 mL	10
Embutramide	0,1 mL de sang	pH = alcalin	Dichlorométhane	1 mL	11
Colchicine	1 mL de sérum	pH = 8,4	Dichlorométhane	2 mL	12
Benzodiazépines	1 mL de sang	–	Hexane/acétate d'éthyle (7/3, v/v)		13
Lipides	100 g de tissus	neutre	Chloroforme/méthanol (1/2, v/v)	300 mL	14
Pesticides apolaires	2 g de tabac	pH = acide	Pentane	8 mL	15
Pesticides polaires et moyennement polaires	2 g de tabac	pH = acide	Dichlorométhane	8 mL	15
Screening toxicologique molécules basiques	0,5–1 mL de sang	pH = 9,5	Chloroforme/propanol 2/heptane (60/14/26, v/v/v)		16
Screening toxicologique molécules acides	1 mL de sang	pH = acide	Acétate d'éthyle/Toluène (4/1, v/v)		16
Screening toxicologique molécules basiques	2 mL de serum ou plasma	pH = alcalin	hexane/ether	10 mL	17
Extraction multiple					
Stéroïdes	20 mL	–	chloroforme	30 mL	18
Opiacés/cocaïne	1 mL de sang ou d'urines	pH = 8,4	Chloroforme/isopropanol/heptane (50/17/33, v/v/v) puis <i>back-extraction</i> par du HCl 0,2 N puis réextraction au chloroforme en milieu alcalin enfin dérivation au BSFTA	10 mL 5 mL 5 mL	5
Antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine	1 mL de sang ou de matrice biologique	pH = alcalin	Hexane/alcool isoamylique (98/2, v/v) puis <i>back-extraction</i> par HCl	7 mL 200 µL	19
Extraction liquide-liquide sur support solide					
Clopidogrel	250 µL de plasma	pH = 4	Dichlorométhane	4 mL	23
Insecticides	5 g de lait	–	Dichlorométhane	5 mL × 3	21
ATD inhibiteur de la capture de la sérotonine	2 mL de sang	pH = 9,0	Dichlorométhane/isopropanol (85/15, v/v)	10 mL	27

directement la matrice sur la cartouche. À ce moment la phase aqueuse de la matrice est adsorbée sur la terre de diatomée. Cette étape ne dure que quelques minutes. Le solvant d'extraction, dont la nature et le volume sont judicieusement choisis, est ensuite directement déposé sur la cartouche. Il se crée alors un équilibre entre la phase aqueuse adsorbée sur la terre de diatomées et la phase organique. Le soluté migrera vers la phase organique si son coefficient de partage lui est favorable. Enfin le solvant est récupéré par gravité dans sa totalité, en évitant toute formation d'émulsion à la sortie de la cartouche. Des colonnes de ce type sont commercialisées sous le nom de Chem Elut<sup>®</sup>, Tox Elut<sup>®</sup> (Varian<sup>®</sup>), Clean Elutr (Merck<sup>®</sup>) ou Extrelut NT (Interchim<sup>®</sup>). Les volumes d'échantillon analysés par de telles cartouches varient de 0,3 mL à 300 mL et les quantités de solvants d'extraction utilisées restent inchangées par rapport à une extraction liquide-liquide classique (respect du ratio  $V_B/V_A$  de 4 à 5). Ces techniques sont automatisables.

Les applications des ces terres de diatomées sont identiques à celles retrouvées par des méthodes classiques. Ces techniques sont employées dans les domaines de

l'environnement pour la recherche de pesticides [15,21,22], de l'agroalimentaire [21], de la pharmacocinétique avec le dosage de médicaments comme le clopidogrel et son métabolite [23], de la médecine du travail [24] ou en toxicologie par le screening de benzodiazépines [25] ou encore la recherche d'antidépresseurs [26,27]. La comparaison des rendements d'extraction de benzodiazépines par cette technique (60 à 90 %) ne montre pas d'infériorité par rapport à la technique classique (80 à 90 %) [25].

## 6 Avantages et inconvénients de l'extraction liquide-liquide

### 6.1 Avantages

L'ELL présente de nombreux avantages parmi lesquels :  
– Le coût : ce sont des techniques qui ne demandent pas d'investissement de gros matériel ou de réactifs. Le matériel nécessaire à la mise en œuvre de ces techniques est du matériel

de base de laboratoire comme de la verrerie, des pipettes, une centrifugeuse et une hotte à solvants.

– La concentration des échantillons : l'utilisation de solvants organiques volatiles permet la concentration du soluté par évaporation du solvant. Si l'on part d'une prise d'essai de 1 mL, et que si l'extrait est repris par un volume final de 100 µL, le soluté est alors concentré d'un facteur 10.

– La purification : l'utilisation d'un solvant organique judicieusement choisi permet de solubiliser la substance d'intérêt et de laisser dans la matrice les molécules interférentes, permettant par exemple de limiter les effets de matrice (extinction ou facilitation d'ionisation) en chromatographie liquide, couplé, à un spectromètre de masse en tandem en mode électrospray.

– La possibilité de travailler sur des matrices très variées (sang total laqué post mortem, viscères ou cheveux) qui ne sont pas toujours compatibles avec l'extraction en phase solide.

– La possibilité d'extraire une gamme très étendue de molécules qui couvre une multitude d'applications allant au-delà des nos laboratoires (industrie pharmaceutique, nucléaire, pétrochimique ...).

## 6.2 Inconvénients et solutions

– La consommation de volumes importants de solvants, surtout lorsqu'il s'agit d'extractions multiples : cet inconvénient peut être minimisé par la diminution de la prise d'essai qui épargne le solvant et est rendue possible par des outils de détection plus performants disponibles dans nos laboratoires.

– La toxicité des solvants : les solvants sont des produits toxiques dont il faut se protéger par le port de gant adaptés (nitrile), de lunettes, et qui nécessitent des manipulations sous une hotte.

– Difficultés d'extraire les molécules très polaires de part les caractéristiques chimiques des solvants organiques (apolaire et aprotiques). Pour quantifier de telles molécules, d'autres méthodes de traitements d'échantillons devront être appliquées comme la précipitation ou la SPE.

– Ce sont des techniques manuelles, consommatrices de temps et de personnel car peu automatisables. Ces modes opératoires demandent une certaine technicité qui ne s'acquière qu'au bout de quelques mois. L'automatisation est possible néanmoins par l'emploi de cartouche d'extraction liquide-liquide sur support solide et quelques robots (ALLEX, Mettler Toledo [28]) capables d'effectuer ces manœuvres apparaissent sur le marché. Ces derniers demandent cependant un investissement supplémentaire en matériel.

## 7 Conclusion

La mise en œuvre des techniques d'extraction liquide-liquide nécessite des connaissances en chimie analytique. Le choix du solvant par rapport à un soluté donné obéit à certains critères et nécessite une bonne connaissance de paramètres chimiques tels que : l'état physique du solvant (le solvant doit être liquide à la température et à la pression de travail), la non miscibilité à l'eau du solvant, la meilleure solubilité du soluté dans le solvant extractant que dans le solvant initial (polarité,

proticité et permittivité), la densité (d) et la volatilité du solvant.

Un grand nombre d'analytes sont extractibles par ces techniques exception faite des molécules très polaires. Le choix du type d'extraction dépend des applications, extraction simple lorsque l'on se veut peu sélectif (screening), et extraction et purification lorsque l'on cherche de la spécificité.

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

## Références

- Document consulté sur le site <http://www.cas.org/products/print/cassipr/index.html> le 15/01/10.
- INRS. Les solvants organiques, Fiches solvants: Institut national de recherches et sécurité. In: 4220 E (ed.) 2009.
- UCANSS. Tableau n° 84 des maladies professionnelles. Journal officiel. 2007.
- Snyder L. Classification of the solvent properties of common liquids. *J chromatogr sci.* 1978; 16: 223–234.
- Gaillard Y, Pépin G, Marquet P, Kintz P, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage de la benzoylcgonine, cocaïne, méthylecgonine-ester, codéine, morphine et 6-acétylmorphine dans le sang total. *Toxicorama.* 1996; 2: 17–22.
- Lacroix C. Détermination des benzodiazépines par chromatographie liquide haute performance. *Toxicorama.* 1996; 3: 35–44.
- Marquet P, Lachâtre G, Kintz P, Pépin G, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage des principales amphétamines dans le sang total par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. *Toxicorama.* 1996; 2: 23–28.
- Horvitz RA, Jatlow PI. Determination of acetaminophen concentrations in serum by high-pressure liquid chromatography. *Clin Chem.* 1977; 23(9): 1596–1598.
- Goldwirt L, Chhun S, Rey E, Launay O, Viard JP, Pons G, Jullien V. Quantification of darunavir (TMC114) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 857(2): 327–331.
- Abe E, Alvarez JC. Sensitive quantification of apomorphine in human plasma using a LC-ESI-MS-MS method. *Ther Drug Monit.* 2006; 28(3): 407–412.
- Abe E, Delamoye M, Mathieu B, Durigon M, de Mazancourt P, Advenier C, Alvarez JC. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method for determination of embutramide (a Tanax or T61 component) in human blood with photodiode-array UV detection. *J Anal Toxicol.* 2004; 28(2): 118–121.
- Abe E, Lemaire-Hurtel AS, Duverneuil C, Etting I, Guillot E, de Mazancourt P, Alvarez JC. A novel LC-ESI-MS-MS method for sensitive quantification of colchicine in human plasma: application to two case reports. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(3): 210–215.
- Lambert WE, Meyer E, Xue-Ping Y, De Leenheer AP. Screening, identification, and quantitation of benzodiazepines in post-mortem samples by HPLC with photodiode array detection. *J Anal Toxicol.* 1995; 19(1): 35–40.



14. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8): 911–917.
15. Mayer-Helm B. Method development for the determination of 52 pesticides in tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009; 1216: 8953–8959.
16. Drummer OH. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 733(1-2): 27–45.
17. Manca D, Ferron L, Weber JP. A system for toxicological screening by capillary gas chromatography with use of a drug retention index based on nitrogen-containing reference compounds. *Clin Chem.* 1989; 35(4): 601–607.
18. Menini E. The indirect analysis of 17-oxosteroid glucosiduronates and sulphates in human urine. *Biochem J.* 1966; 99(3): 747–759.
19. Duverneuil C, de la Grandmaison GL, de Mazancourt P, Alvarez JC. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs. *Ther Drug Monit.* 2003; 25(5): 565–573.
20. Kuepper U, Musshoff F, Madea B. Succinylmonocholine analyt-ics as an example for selectivity problems in high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, and resulting implications for analytical toxicology. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008; 22(12): 1965–1970.
21. Seccia S, Fidente P, Montesano D, Morrica P. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A.* 2008; 1214(1-2): 115–120.
22. Lambropoulou DA, Albanis TA. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *J Biochem Biophys Methods.* 2007; 70(2): 195–228.
23. Ksycinska H, Rudzki P, Bukowska-Kiliszek M. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 41(2): 533–539.
24. Wingfors H, Hansson M, Papke O, Bergek S, Nilsson CA, Haglund P. Sorbent-assisted liquid-liquid extraction (Chem-Elut) of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the lipid fraction of human blood plasma. *Chemosphere.* 2005; 58(3): 311–320.
25. Smink BE, Brandsma JE, Dijkhuizen A, Lusthof KJ, de Gier JJ, Egberts AC, Uges DR. Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 811(1): 13–20.
26. Martinez MA, Sanchez 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(3): 174–180.
27. Sanchez de la Torre C, Martinez 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(2-3): 193–204.
28. Jordan S, Moshiri B, Durand R. Automation of Liquid-liquid extraction using phase boundary detection. *JALA.* 2002; 7(1): 74–77.