

# Détection, identification et préconcentration de produits de dégradation d'agents de guerre chimique organophosphorés par couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse

Mélanie Lagarrigue

▶ **To cite this version:**

Mélanie Lagarrigue. Détection, identification et préconcentration de produits de dégradation d'agents de guerre chimique organophosphorés par couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse. Chemical Sciences. Chimie ParisTech, 2007. English. NNT : . pastel-00004615

**HAL Id: pastel-00004615**
**https://pastel.hal.science/pastel-00004615**

Submitted on 22 Jan 2009

**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.

UNIVERSITE PIERRE & MARIE CURIE
LA SCIENCE A PARIS

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale 387 : Inter///Bio

Spécialité : Systèmes Bio-organiques / Spectrochimie

Présentée par

**Mélanie LAGARRIGUE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

# *Détection, identification et préconcentration de produits de dégradation d'agents de guerre chimique organophosphorés par couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse*

soutenue le 5 Octobre 2007

devant le jury composé de :

| | |
|---|---|
| Pr. Philippe MORIN | Rapporteur |
| Pr. Jean-Luc VEUTHEY | Rapporteur |
| Pr. Jean-Claude TABET | Président |
| Dr. Anne BOSSEE | Examinateur |
| Dr. Anne VARENNE | Examinateur |
| Pr. Pierre GAREIL | Directeur de thèse |

*à David,*

*à ma famille*

# Remerciements

Ce travail a été réalisé au Département Analyse Chimique du Centre d'Etudes du Bouchet sous la direction du Dr. Bruno BELLIER, du Dr. Anne BOSSEE et de Arlette BEGOS et co-encadré par le Pr. Pierre GAREIL et le Dr. Anne VARENNE du Laboratoire Electrochimie et Chimie Analytique (UMR CNRS 7575) de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris. Cette thèse a été financée par une bourse DGA-CNRS.

Je suis très reconnaissante au Pr. Jean-Luc VEUTHEY et au Pr. Philippe MORIN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour le temps qu'ils y ont consacré. Je remercie le Pr. Jean-Claude TABET pour avoir accepté d'examiner ce travail, pour m'avoir fait découvrir la spectrométrie de masse et pour son aide dans la compréhension des mécanismes de fragmentation des acides phosphoniques.

Je remercie vivement le Pr. Pierre GAREIL, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant les cinq premiers mois de ma thèse afin de me former à l'électrophorèse capillaire. Je lui suis très reconnaissante d'être resté toujours disponible malgré les quelques kilomètres qui séparent le CEB et l'ENSCP, pour sa grande écoute et bien sûr pour toutes les discussions scientifiques indispensables à ce travail. Je remercie également le Dr. Anne VARENNE pour sa grande gentillesse, pour son soutien rassurant, pour le temps qu'elle a consacré à ma formation sur l'électrophorèse capillaire et sa participation à ce travail. Je les remercie également tous les deux de m'avoir communiqué leur enthousiasme pour l'électrophorèse capillaire. Un grand merci aussi au Dr. Nathalie DELAUNAY pour toutes ses discussions à propos des techniques de préconcentration, et plus particulièrement sur l'isotachophorèse.

Je suis très reconnaissante au Dr. Anne BOSSEE pour avoir fait en sorte que ce sujet de thèse puisse voir le jour, pour avoir géré toute la mise en place du couplage CE-MS au laboratoire qui aura été une vraie aventure à rebondissements ! Je la remercie aussi d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit pendant son congé de maternité. Je remercie très chaleureusement Arlette BEGOS pour ses conseils scientifiques précieux et pour son grand soutien moral et son écoute qui m'ont été d'un grand réconfort surtout dans ces derniers mois de thèse. Enfin, j'adresse un grand merci au Dr. Bruno BELLIER pour sa gentillesse et sa

bonne humeur, pour ses conseils et pour avoir continué à participer à ce travail après son départ du laboratoire pour d'autres fonctions à la DGA.

Je remercie tous mes collègues du CEB pour leur bonne humeur, leurs nombreux conseils et leur soutien continu pendant ces trois années de thèse. Nos grandes discussions autour de l'incontournable café du matin et les bonnes rigolades me laisseront un très bon souvenir de mon séjour au CEB. Je remercie ainsi Yannick JUILLET pour son humour, ses cours sur la géo, les cactus, les poissons rouges, etc., Cécile MONTAUBAN pour les super parties de badminton, Sophie LE MOULLEC pour son humour et son soutien compatissant, Cindy DUBOIS pour sa curiosité, Hamina DAFF pour sa bonne humeur, et Laurent VERDIER pour sa gentillesse. Je remercie aussi Jacky DISSARD, Laurent BOTTI et Sylvie LAIGUILLON, Huguette RENAULT et Jean-Pierre LE HARLE pour leur gentillesse, Franck GODARD pour les nombreuses extractions de sol que je lui ai demandées, Christine ALBARET et Patrick AUGE pour mes visites sur Adobe Illustrator. J'adresse un merci très spécial à Amélie DEJONGHE avec qui j'ai partagé le même bureau, et qui a donc aussi partagé les joies et les moments de doute qui ont marqué cette thèse. Ton soutien, ton amitié et nos fous rires m'auront vraiment été très précieux et je suis sûre que l'avenir te réserve de bonnes surprises. Enfin je remercie les thésards, ex-thésards et post-docs de l'ENSCP pour leur gentillesse et leur bonne humeur : Yannis FRANCOIS, Meriem MOKKADEM, Fanny D'ORLYE, Thomas LE SAUX et Marek URBANEK.

Il m'est impossible de ne pas citer dans ces remerciements la famille et les amis qui m'auront soutenue tout au long de cette thèse. Tout d'abord un immense merci à mes parents, pour m'avoir permis de réaliser ces longues études, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée dans cette voie et pour leurs réponses patientes à mes *pourquoi ?* depuis que je sais parler. Je remercie ma sœur et mon parrain pour leur présence rassurante et leur soutien indispensable, ainsi que mes grands-parents et tous mes oncles, tantes, cousins et cousines. Je remercie aussi tout particulièrement mes futurs beaux-parents pour leur écoute et leurs encouragements permanents. Un très grand merci à tous les membres de ma future belle-famille pour leur grande gentillesse et leur affection réconfortantes.

Je remercie Christophe, Carole et leur petit moussaillon, Tristan, pour nous avoir accueilli à de nombreuses reprises dans leur hôtel cinq étoiles de Chasné, pour leur grande amitié, pour les virées en bisquine sans oublier les futures régates Galway-Reder Mor. Je remercie aussi Laëtitia et Nicolas pour leur écoute et leur soutien pendant cette période. Un grand merci à Nicolas et Sabrina pour les supers barbecues au feu bois. Enfin, j'adresse un merci très particulier à Hayat et François, pour avoir confié Inès et Adam à la meilleure nounou du

monde, pour avoir fini de me convaincre de poursuivre mes études dans la recherche et surtout pour avoir eu la très bonne idée de me présenter un certain David R.

Justement, je termine ces remerciements par David qui m'aura le plus encouragée pendant ces trois années de thèse. Il m'est vraiment très difficile de trouver les mots à la hauteur de ma reconnaissance pour ton soutien infaillible, ta patience et ton écoute dans les moments plus difficiles, particulièrement ces derniers mois. Alors, le meilleur moyen que j'ai trouvé est de te dédier, en premier, ma thèse.

# Sommaire

**Remerciements** ..... **3**

**Sommaire** ..... **6**

**Abréviations** ..... **11**

**Introduction générale** ..... **13**

**CHAPITRE I** ..... **17**

**1. Les agents de guerre chimique** ..... **17**

**1.1 Historique des armes chimiques** ..... **17**

*1.1.1 De l'Antiquité au début du XX$^{ème}$ siècle* ..... *17*

*1.1.2 La Première Guerre Mondiale* ..... *18*

*1.1.3 De l'Entre-deux-guerres aux années 1990* ..... *19*

**1.2 L'interdiction des armes chimiques** ..... **19**

*1.2.1 La Convention d'Interdiction des Armes Chimiques* ..... *19*

*1.2.2 L'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC)* ..... *20*

*1.2.3 Bilan de la situation actuelle* ..... *21*

**2. La classification des agents de guerre chimique** ..... **22**

**2.1 Les agents neutralisants** ..... **22**

**2.2 Les agents incapacitants** ..... **23**

**2.3 Les agents létaux** ..... **23**

*2.3.1 Les agents suffocants* ..... *24*

*2.3.2 Les agents vésicants* ..... *24*

*2.3.3 Les agents hémotoxiques* ..... *25*

*2.3.4 Les agents neurotoxiques* ..... *26*

**2.4 Les toxines** ..... **27**

*2.4.1 Les mycotoxines* ..... *27*

*2.4.2 Les toxines marines* ..... *28*

*2.4.3 Les venins* ..... *29*

*2.4.4 Les phytotoxines* ..... *29*

*2.4.5 Les toxines bactériennes* ..... *30*

**3. Les techniques d'analyse des agents de guerre chimique ..... 31**

**3.1 L'analyse de terrain ..... 31**

*3.1.1 Les papiers détecteurs* ..... *31*

*3.1.2 Les tubes colorimétriques* ..... *32*

*3.1.3 La détection enzymatique* ..... *32*

*3.1.4 Les méthodes physiques instrumentales* ..... *33*

**3.2 La dégradation des agents de guerre chimique ..... 33**

**3.3 La chromatographie en phase gazeuse ..... 35**

*3.3.1 La dérivation chimique* ..... *35*

*3.3.2 Les techniques de détection* ..... *36*

*3.3.3 Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse* ..... *37*

**3.4 La chromatographie en phase liquide ..... 38**

*3.4.1 Les avantages de la chromatographie en phase liquide* ..... *38*

*3.4.2 Le couplage chromatographie en phase liquide–spectrométrie de masse* ..... *39*

**3.5 L'électrophorèse capillaire ..... 42**

*3.5.1 Les avantages de l'électrophorèse capillaire* ..... *42*

*3.5.2 Les techniques de détection* ..... *44*

*3.5.3 Le couplage électrophorèse capillaire–spectrométrie de masse* ..... *46*

*3.5.4 Les microsystèmes* ..... *47*

**3.6 La résonance magnétique nucléaire ..... 49**

**4. La mise en œuvre du couplage électrophorèse capillaire–spectrométrie de masse ..... 51**

**4.1 Les interfaces CE-ESI-MS ..... 51**

*4.1.1 L'interface coaxiale à liquide additionnel* ..... *51*

*4.1.2 L'interface à jonction liquide* ..... *53*

*4.1.3 L'interface sans liquide additionnel (sheathless)* ..... *53*

**4.2 Le couplage avec d'autres sources d'ionisation ..... 56**

**4.3 Les applications du couplage CE-MS ..... 57**

**5. Les méthodes de préconcentration en électrophorèse capillaire ..... 58**

**5.1 Les techniques de préconcentration électrophorétiques ..... 58**

*5.1.1 La préconcentration et l'injection par amplification du champ électrique (FASS et FASI)* ..... *58*

*5.1.2 La préconcentration de grands volumes d'échantillon (LVSS) ..... 60*
*5.1.3 La préconcentration par médiation du pH (pH mediated) ..... 61*
*5.1.4 L'isotachophorèse (ITP) ..... 62*
**5.2 Les techniques de préconcentration chromatographiques ..... 66**
*5.2.1 L'extraction sur phase solide (SPE) ..... 66*
*5.2.2 La préconcentration sur membrane (mPC) ..... 67*
*5.2.3 La préconcentration par balayage (sweeping) ..... 67*
**6. Références ..... 68**

**Chapitre II ..... 78**
**1. Introduction ..... 78**
**2. Article ..... 80**
**2.1 Introduction ..... 81**
**2.2 Experimental ..... 83**
*2.2.1 Chemicals ..... 83*
*2.2.2 CE-UV ..... 84*
*2.2.3 CE-MS ..... 84*
*2.2.4 Soil extracts ..... 86*
**2.3 Results and discussion ..... 86**
*2.3.1 Separation of a standard mixture of alkylphosphonic acids by CE-UV ..... 86*
*2.3.2 Separation and identification of a standard mixture of alkylphosphonic and alkyl alkylphosphonic acids by CE-MS ..... 88*
*2.3.3 Optimization of the CE-MS separation ..... 89*
*2.3.4 Identification by MS-MS detection ..... 91*
*2.3.5 Analysis of soil extract by CE-MS ..... 93*
**2.4 Conclusion ..... 95**
**3. Conclusion ..... 97**
**4. Références ..... 99**

**Chapitre III ..... 102**
**1. Introduction ..... 102**
**2. Article ..... 103**

**2.1 Introduction** ..... **104**
**2.2 Experimental** ..... **106**
*2.2.1 Chemicals* ..... *106*
*2.2.2 Electrolyte* ..... *106*
*2.2.3 Apparatus* ..... *107*
*2.2.4 Soil sample treatment* ..... *107*
**2.3 Results and discussion** ..... **108**
*2.3.1 Optimization of analytical conditions* ..... *108*
*2.3.2 CE-MS-MS analysis of soil extracts* ..... *109*
*2.3.3 Sensitivity enhancement in spiked water.* ..... *110*
**2.4 Conclusions** ..... **111**
**3. Conclusion** ..... **112**
**4. Références** ..... **113**

**Chapitre IV** ..... **115**
**1. Introduction** ..... **115**
**2. Article** ..... **116**
**2.1 Introduction** ..... **117**
**2.2 Experimental** ..... **119**
*2.2.1 Chemicals and sample solutions* ..... *119*
*2.2.2 Instrumentation* ..... *120*
*2.2.3 Separations conditions* ..... *120*
**2.3 Results and discussion** ..... **121**
*2.3.1 Influence of FASS on electroosmotic velocity* ..... *122*
*2.3.2 Search for a compromise between sensitivity and resolution* ..... *125*
*2.3.3 Applications to tap water and local river water* ..... *127*
*2.3.4 Reapeatability, linearity and LOD* ..... *129*
**2.4 Conclusion** ..... **130**
**3. Conclusion** ..... **132**
**4. Références** ..... **133**

**Chapitre V ..... 135**
**1. Introduction ..... 135**
**2. Article ..... 137**
**2.1 Introduction ..... 138**
**2.2 Experimental ..... 139**
*2.2.1 Chemicals and sample solutions ..... 139*
*2.2.2 Instrumentation ..... 141*
*2.2.3 Separation conditions ..... 141*
**2.3 Results and discussion ..... 142**
*2.3.1 CZE separation of the analytes ..... 142*
*2.3.2 Influence of the nature and the concentration of the LE ..... 143*
*2.3.3 Influence of loading length and initial pH of the TE on tITP-CZE-MS performances ..... 146*
*2.3.4 Application of tITP-CZE-MS for the preconcentration of analytes in rat urine 150*
**2.4 Conclusion ..... 152**
**3. Conclusion ..... 153**
**4. Références ..... 155**

**Conclusion générale et perspectives ..... 157**

**Annexe ..... 159**
**1. Théorie ..... 159**
**2. Détermination de constantes d'acidité par électrophorèse capillaire ... 160**
**3. Résultats obtenus ..... 161**
**4. Conclusion ..... 163**
**5. Références ..... 164**

**Résumé ..... 165**
**Summary ..... 165**

# Abréviations

**Techniques :**

| | |
|---|---|
| APCI | : ionisation chimique à pression atmosphérique (atmospheric pressure chemical ionization) |
| BPE | : base peak electropherogram |
| CE | : électrophorèse capillaire (capillary electrophoresis) |
| CI | : ionisation chimique (chemical ionization) |
| CIAC | : convention d'interdiction des armes chimiques |
| cITP | : isotachophorèse combinée (combined isotachophoresis) |
| CWC | : chemical weapons convention |
| CZE | : électrophorèse capillaire de zone (capillary zone electrophoresis) |
| EI | : impact électronique (electronic impact) |
| ESI | : ionisation par électronébulisation (electrospray ionization) |
| FASS | : préconcentration de l'échantillon par amplification du champ électrique (field-amplified sample stacking) |
| GC | : chromatographie en phase gazeuse (gas chromatography) |
| ITMS | : spectrométrie de masse à piège ionique (ion trap mass spectrometry) |
| ITP | : isotachophorèse (isotachophoresis) |
| LC | : chromatographie en phase liquide (liquid chromatography) |
| LIF | : fluorescence induite par laser (laser induced fluorescence) |
| MALDI | : ionisation-désorption assistée par laser (matrix-assisted laser desorption ionization) |
| MRM | : mode de réactions multiples (multiple reaction monitoring) |
| MS | : spectrométrie de masse (mass spectrometry) |
| MS-MS | : spectrométrie de masse en tandem |
| OIAC | : organisation pour l'interdiction des armes chimiques |
| OPCW | : organization for the prohibition of chemical weapons |
| RMN | : résonance magnétique nucléaire |
| SIM | : mode d'ion sélectionné (single ion monitoring) |
| tITP | : isotachophorèse transitoire (transient isotachophoresis) |
| TQ | : triple quadripôle |
| UV | : ultraviolet |

**Grandeurs :**

| | |
|---|---|
| $\mu_{eff}$ | : mobilité électrophorétique effective |
| $\mu_{ep}$ | : mobilité électrophorétique |
| $\mu_{eo}$ | : mobilité électroosmotique |
| $\mu_{ep}^{0}$ | : mobilité électrophorétique absolue |

| | |
|---|---|
| eof | : écoulement électroosmotique (electroosmotic flow) |
| $t_m$ | : temps de migration |
| $t_{eo}$ | : temps d'écoulement électroosmotique |
| κ | : conductivité |
| j | : densité de courant |

**Acides alkylphosphoniques :**

| | |
|---|---|
| EPA | : acide éthylphosphonique |
| IPA | : acide isopropylphosphonique |
| MPA | : acide méthylphosphonique |
| PhPA | : acide phénylphosphonique |
| PrPA | : acide propylphosphonique |

**Acides alkyl alkylphosphoniques :**

| | |
|---|---|
| ChMPA | : acide cyclohexyl méthylphosphonique |
| EEPA | : acide éthyl éthylphosphonique |
| EMPA | : acide éthyl méthylphosphonique |
| iBMPA | : acide isobutyl méthylphosphonique |
| IMPA | : acide isopropyl méthylphosphonique |
| MEPA | : acide méthyl éthylphosphonique |
| MPrPA | : acide méthyl propylphosphonique |
| PMPA | : acide pinacolyl méthylphosphonique |
| PrMPA | : acide propyl méthylphosphonique |

# Introduction générale

Après de très longues et difficiles négociations, la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) est entrée en vigueur en Avril 1997 pour interdire la production, l'utilisation, le stockage et le transfert d'armes chimiques mais aussi pour obliger les Etats parties à procéder à la destruction totale de leurs stocks d'armes chimiques. La CIAC prévoit un système d'inspections, administré par l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC), qui permet de contrôler le respect de ce traité international. Dans ce contexte, il est indispensable de disposer de techniques d'analyse permettant d'apporter une preuve de la présence d'agents de guerre chimique sur un site inspecté. Le développement de méthodes de détection et d'identification d'agents de guerre chimique tient une place d'autant plus importante de nos jours, en raison de l'accroissement de la menace d'utilisation d'armes chimiques par des organisations terroristes contre une population civile.

Les agents neurotoxiques constituent les plus toxiques des agents de guerre chimique mais sont généralement rapidement hydrolysés dans un environnement aqueux pour donner des acides alkyl alkylphosphoniques spécifiques puis, par une réaction plus lente, des acides alkylphosphoniques non-spécifiques. Les acides alkyl alkylphosphoniques spécifiques peuvent donc être utilisés pour identifier l'agent neurotoxique présent initialement dans l'échantillon lorsque celui-ci a été dégradé avant l'analyse.

Les techniques d'analyse les plus couramment employées pour la détection et l'identification des agents neurotoxiques et de leurs produits de dégradation impliquent une étape de séparation des constituants de l'échantillon par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou par chromatographie en phase liquide (LC), suivie d'une détection par spectrométrie de masse (MS). Cependant, l'analyse par GC-MS des produits de dégradation d'agents neurotoxiques, qui sont peu volatils et polaires, nécessite une dérivation chimique des analytes et un échange de solvant dans le cas de l'analyse d'un échantillon aqueux. Le couplage LC-MS permet d'analyser des produits de dégradation contenus dans des échantillons aqueux en évitant les étapes fastidieuses de dérivation chimique et d'échange de solvant qui augmentent de manière importante le temps d'analyse.

Lors de ce travail, l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) a été utilisée pour la détection et l'identification d'acides alkyl alkylphosphoniques et

alkylphosphoniques. Cette technique présente en effet des propriétés intéressantes pour ce type d'analyse. L'électrophorèse capillaire est une technique séparative intrinsèquement adaptée à l'analyse de composés chargés ou très polaires, tels que les produits de dégradation d'agents neurotoxiques, qui sont parfois difficilement séparables en chromatographie liquide en raison de leur élution rapide. Les principes de séparation caractéristiques de l'électrophorèse capillaire apportent des informations très complémentaires à celles qui peuvent être obtenues en chromatographie liquide. Cette technique séparative miniaturisée permet par ailleurs de bénéficier d'une très faible consommation d'échantillon et de solvant, et d'une grande efficacité de séparation. Le couplage CE-MS permet de bénéficier de ces avantages, alliés à la sensibilité et aux grandes capacités d'identification de la spectrométrie de masse. Cette technique connaît donc un développement important depuis une quinzaine d'années dans des domaines d'application très variés. Toutefois, le couplage CE-MS a été peu employé pour la détection et l'identification d'agents de guerre chimique et de leurs produits de dégradation. Ce travail a donc consisté à évaluer la sélectivité, les capacités d'identification et la sensibilité du couplage CE-MS pour l'analyse d'acides alkyl alkylphosphoniques et alkylphosphoniques contenus dans des matrices environnementales (eau potable, eau de rivière, extrait de sol) ou biologiques (urine de rat).

Une étude bibliographique a été réalisée afin de disposer des informations nécessaires à la compréhension de la problématique de ce sujet. Ce premier chapitre présente tout d'abord les éléments historiques permettant de définir le contexte dans lequel s'inscrit cette étude. Les différentes catégories d'agents de guerre chimique ont ensuite été décrites. L'exposé des techniques d'analyse de terrain et d'analyse en laboratoire des agents de guerre chimique permet de mettre en évidence l'intérêt d'étudier le couplage CE-MS pour ce type d'application. Les différents moyens de mise en œuvre du couplage CE-MS ont ensuite été présentés au travers de la description des différents types d'interface CE-MS existants. Cette partie montre l'importance des efforts de développement technologique réalisés dans ce domaine qui traduit l'intérêt grandissant porté au couplage CE-MS. Enfin, la dernière partie de cette étude bibliographique montre la variété des techniques de préconcentration disponibles pour améliorer la sensibilité de l'électrophorèse capillaire et permet de préciser le principe des méthodes de préconcentration qui ont été utilisées pendant ce travail.

La première partie de cette étude, présentée dans le chapitre II, a consisté à évaluer la sélectivité et les capacités d'identification du couplage CE-MS pour l'analyse de produits de dégradation d'agents de guerre chimique. Une méthode CE-MS a donc été développée pour analyser un mélange constitué de cinq acides alkyl alkylphosphoniques et cinq acides

alkylphosphoniques comportant des composés isomères. Le dispositif CE-MS qui a été utilisé lors de ce travail est constitué d'une électrophorèse capillaire couplée, par une interface CE-MS coaxiale à liquide additionnel, à un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation et d'un piège ionique. Les différents paramètres de séparation et de détection par CE-MS ont été optimisés en analysant un mélange constitué des dix analytes dilués dans l'eau pure. Des expériences CE-MS-MS ont ensuite été réalisées sur cet échantillon et se sont révélées particulièrement intéressantes pour identifier les acides alkyl alkylphosphoniques isomères. La méthode CE-MS développée a ensuite été appliquée à la détection des dix analytes présents dans un échantillon de sol dopé initialement à 5 $\mu g.g^{-1}$. Des résultats complémentaires à cette première étude sont présentés dans le chapitre III et démontrent que des expériences CE-MS-MS peuvent également être menées pour identifier les dix analytes contenus dans un échantillon de sol dopé initialement à 5 $\mu g.g^{-1}$, malgré la présence des interférents de la matrice.

La deuxième partie de ce travail présente le développement d'une technique de préconcentration électrophorétique permettant d'améliorer la sensibilité de détection des dix analytes contenus dans des matrices de faible conductivité (eau pure, eau potable, eau de rivière) par couplage CE-MS. Le chapitre III décrit ainsi les premières expériences qui ont été réalisées pour améliorer la sensibilité de détection des composés contenus dans l'eau, en utilisant la préconcentration de l'échantillon par amplification du champ électrique (FASS). Ces expériences ont démontré la faisabilité de cette technique mais ont aussi révélé certaines limitations, notamment pour l'obtention de résultats quantitatifs. Les performances de la méthode FASS, telle qu'elle est présentée dans le chapitre III, dépendent en effet de la concentration des analytes qui détermine la conductivité et le pH de l'échantillon. Le chapitre IV présente donc l'élaboration d'une nouvelle procédure de FASS compatible avec la réalisation d'analyses quantitatives. Le principe de cette nouvelle procédure repose sur l'addition d'une solution connue dont la composition permet de fixer la conductivité et le pH de l'échantillon indépendamment de la concentration des analytes aux valeurs optimales qui ont été déterminées expérimentalement. L'influence de différents paramètres sur les performances de la technique FASS a pu être expliquée en utilisant un modèle théorique. La nouvelle méthode FASS développée a ensuite été appliquée à l'analyse d'eau potable et d'eau de rivière locales dopées par les dix analytes, ce qui a permis de confirmer la possibilité d'utiliser cette technique pour améliorer la sensibilité et réaliser des analyses quantitatives dans ce type de matrices de faible conductivité.

La troisième partie de ce travail, exposée dans le chapitre V, a consisté à développer une méthode de préconcentration électrophorétique permettant d'améliorer la sensibilité de détection de produits de dégradation d'agents de guerre chimique dans des matrices de forte conductivité (extrait de sol et urine de rat). La méthode de préconcentration par isotachophorèse transitoire a été choisie en raison de sa facilité de mise en œuvre qui ne nécessite pas de manipulation délicate du capillaire ou de modification des instruments commerciaux. Le développement d'une telle technique nécessite cependant l'optimisation de nombreux paramètres. Pour cette partie de l'étude, un échantillon constitué de cinq acides alkyl méthylphosphoniques spécifiques, issus de la dégradation de cinq agents neurotoxiques (VX, R-VX, sarin, cyclosarin et soman), a été utilisé afin de constituer un exemple plus représentatif d'un prélèvement réel. L'échantillon qui avait été utilisé précédemment contenait en effet de nombreux composés isomères afin d'évaluer la sélectivité et les capacités d'identification du couplage CE-MS, mais était trop complexe pour pouvoir représenter un cas réaliste.

# CHAPITRE I

# Etude bibliographique

## 1. Les agents de guerre chimique

### 1.1 Historique des armes chimiques

#### *1.1.1 De l'Antiquité au début du XX$^{ème}$ siècle [1-3]*

Dès l'Antiquité, des substances chimiques toxiques ont été utilisées à des fins militaires de manière ponctuelle. Des écrits chinois datant du VII$^{ème}$ siècle av. J-C répertorient ainsi des centaines de recettes de poisons ou de fumées irritantes utilisables en cas de conflit. Pendant la guerre du Péloponnèse (de 431 à 404 av. J-C), les Spartiates utilisèrent la fumée issue de bois trempé dans un mélange de poix et de soufre ou encore des vapeurs d'arsenic pour asphyxier leurs ennemis, notamment lors des batailles de Platée et de Délium. Des fumées toxiques furent aussi employées par les Romains lors du siège d'Ambracie (127 av. J-C). En 672 ap. J-C, les Byzantins mirent au point le redoutable « feu grégeois » qui avait la particularité de brûler au contact de l'eau en dégageant une fumée très épaisse et asphyxiante et qui fut utilisé lors de batailles navales jusqu'au Moyen-Age. La Renaissance fut marquée par l'arrivée de la poudre à canon et des armes à feu. L'utilisation de substances toxiques à des fins militaires étant considérée comme contraire aux lois de la guerre, une première convention fut signée à Strasbourg en 1675 entre la France et la Prusse pour interdire la fabrication et l'usage de bombes empoisonnées. Au XIX$^{ème}$ siècle, l'essor considérable de la chimie fit resurgir la crainte de l'utilisation militaire de substances chimiques. La Convention de La Haye fut alors signée en 1899 pour interdire « l'emploi de projectiles qui ont pour but unique de répandre des gaz asphyxiants ou délétères » et fut ensuite étendue à l'interdiction d'utiliser des armes empoisonnées en 1907.

### *1.1.2 La Première Guerre Mondiale [2]*

Le terme d'arme chimique a pris réellement son sens lors de la Première Guerre Mondiale qui fut marquée par l'utilisation massive de substances chimiques toxiques. Dès le début de ce conflit, des munitions remplies de substances irritantes furent utilisées des deux côtés du front : les Français utilisaient des cartouches remplies de bromoacétate d'éthyle, qui fut ensuite remplacé par la chloroacétone en raison du manque de brome, tandis que les Allemands employaient des obus chargés de poudre à éternuer (Ni-Schrapnell, Octobre 1914) ou de molécules aromatiques bromées extrêmement irritantes (T-stoff, Janvier 1915). Les scientifiques travaillant avec les militaires furent rapidement amenés à développer des gaz plus toxiques. Dans ce domaine, les Allemands étaient largement avantagés par leur grand savoir-faire en chimie et leur grande capacité de production industrielle (BASF, IG Farben, Farbwerke Höescht, Agfa, etc.). Ainsi, le Pr. Fritz Haber, chef du service allemand des armes chimiques et futur lauréat du Prix Nobel de Chimie (1918) pour la synthèse industrielle de l'ammoniac, a personnellement conduit la première attaque au chlore le 22 Avril 1915 à Ypres en Belgique. Ce gaz, plus lourd que l'air, formait un nuage vert-jaune qui s'infiltrait dans les moindres recoins des tranchées. Il causa la panique générale et de nombreux morts parmi les soldats français. Malgré leurs pauvres ressources en chlore et leur industrie chimique faible, les Alliés déployèrent des efforts considérables pour riposter à Loos près de Lille en Septembre 1915. Pour contrer les énormes progrès réalisés par les Alliés dans le domaine des masques à gaz, les Allemands développèrent l'ypérite (ou gaz moutarde), une nouvelle arme chimique aux propriétés vésicantes. L'ypérite fut utilisée pour la première fois près de Ypres contre les Anglais en Juillet 1917. Les Alliés réussirent à produire à leur tour l'ypérite pour riposter contre les Allemands en Juin 1918.

Au total, une quarantaine d'agents chimiques fut utilisée pendant la Première Guerre Mondiale. Le nombre de victimes des armes chimiques est assez délicat à estimer en raison de la grande divergence des chiffres qui ont pu être cités, mais il semble assez probable qu'il soit compris entre 710000 et 1000000 de victimes représentant entre 2,3 % et 3,2 % du nombre total de victimes militaires [2]. Toutefois, la grande majorité des victimes des armes chimiques fut blessée plutôt que tuée. Finalement, les armes chimiques provoquèrent beaucoup moins de décès que les explosifs ou les armes à feu pendant ce conflit.

### *1.1.3 De l'Entre-deux-guerres aux années 1990*

Suite aux très vives réactions suscitées par l'usage des armes chimiques pendant la Première Guerre Mondiale, le protocole de Genève fut signé en Juin 1925 pour prohiber l'utilisation d'armes chimiques ou bactériologiques, sans pour autant interdire leur possession ou leur mise au point. Pendant l'Entre-deux-guerres, des chimistes allemands développèrent les premiers agents neurotoxiques organophosphorés, un nouveau type d'armes chimiques bien plus toxiques que celles qui avaient pu être utilisées auparavant. Ainsi, le Dr. Schrader (I.G. Farben) synthétisa le tabun en 1936 puis le sarin en 1938 à partir de travaux effectués initialement pour l'élaboration de nouveaux pesticides. Le soman fut découvert en 1944 par le Dr. Kuhn. Dans les années 50, les Anglais développèrent le VX, considéré comme le plus toxique des agents de guerre chimique. De leur côté, les Russes mirent au point le R-VX de même formule brute que le VX mais de structure différente. Malgré le développement des armes chimiques pendant toutes ces périodes, aucune ne fut utilisée lors de la Deuxième Guerre Mondiale.

Toutefois, des armes chimiques furent probablement employées durant le conflit Egypte-Yemen (1963-1967). Pendant la guerre Iran-Irak (1983-1988), l'Irak utilisa des armes chimiques contre l'Iran de manière avérée, puis contre des rebelles kurdes à Halabjah en 1988. Par la suite, l'utilisation d'armes chimiques par des organisations terroristes contre une population civile fit son apparition : l'attentat au sarin commis par des membres de la secte Aum Shinrikyo dans le métro de Tokyo en 1995 causa ainsi 12 morts et de très nombreux blessés (environ 5000) [2].

## 1.2 L'interdiction des armes chimiques

### *1.2.1 La Convention d'Interdiction des Armes Chimiques [4]*

Après de très longues et difficiles négociations, la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), signée en Janvier 1993 à Paris, est entrée en vigueur en Avril 1997. Ce traité international interdit le développement, la production, l'utilisation, le stockage et le transfert d'armes chimiques et impose la destruction totale des stocks existants et des installations de fabrication. La CIAC garantit aussi assistance et protection à tout Etat partie (Etat signataire du traité et l'ayant ratifié) qui serait attaqué ou menacé au moyen d'armes chimiques et encourage la coopération internationale. Le but ultime de cette convention est

d'éradiquer définitivement toutes les armes chimiques afin de contribuer à la stabilité et la sécurité internationales.

La CIAC autorise cependant la possession de certains composés à des fins dites « non-interdites » notamment pour l'agriculture, l'industrie, la recherche, la médecine et la pharmacie ou encore pour la protection contre les armes chimiques et le maintien de l'ordre public. Les sites industriels produisant des substances chimiques destinées à un usage légitime et pacifique, mais qui pourraient être détournées pour un usage militaire, sont également soumis à la CIAC afin d'éviter la prolifération des armes chimiques. Les produits chimiques concernés par la CIAC sont répertoriés dans trois tableaux [4,5] :

- **tableau I :** agents chimiques ou produits chimiques étroitement liés.
- **tableau II :** produits chimiques pouvant servir à fabriquer des armes chimiques mais pouvant être utilisés à des fins pacifiques dans l'industrie.
- **tableau III :** produits chimiques pouvant servir à fabriquer des armes chimiques mais qui sont produits en grande quantité dans l'industrie pour la fabrication de nombreux produits courants.

### *1.2.2 L'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC) [4]*

L'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC), dont le siège se situe à La Haye, est chargée de contrôler le respect de la CIAC. L'OIAC vérifie la destruction des armes chimiques en procédant à des inspections périodiques des sites de stockage déclarés et assure la surveillance des sites industriels. L'OIAC prévoit par ailleurs un système d'inspection par mise en demeure qui permet à tout Etat partie de déclencher l'inspection d'un site suspect sans refus possible de l'Etat concerné. Les prélèvements réalisés au cours des inspections peuvent être analysés sur place ou envoyés à un réseau de laboratoires experts désignés par l'OIAC. Il existe actuellement 18 laboratoires experts désignés dans le monde dont un en France : le Département Analyse Chimique du Centre d'Etudes du Bouchet (DGA-Ministère de la Défense). Les laboratoires désignés doivent posséder une accréditation nationale selon la norme ISO 17025 et réussir les tests d'aptitude interlaboratoires organisés chaque année par l'OIAC pour maintenir leur désignation. Enfin, l'OIAC soutient l'échange d'informations scientifiques et techniques concernant la destruction et la détection des armes chimiques, ainsi que le développement de traitements médicaux ou la recherche de composés alternatifs aux produits chimiques répertoriés dans les tableaux de la CIAC.

### *1.2.3 Bilan de la situation actuelle [4]*

La CIAC est actuellement ratifiée par 182 pays et signée mais non ratifiée par 6 pays (Bahamas, Congo, Guinée-Bissau, Israël, Myanmar et République Dominicaine). Il reste néanmoins 7 pays non signataires de cette convention : l'Angola, l'Egypte, l'Irak, le Liban, la Syrie, la République Démocratique de Corée et la Somalie. Les Etats parties ayant déclaré la possession d'armes chimiques se sont engagés à ce que la totalité de leurs stocks ait été détruite en 2007 sous la surveillance de l'OIAC. A ce jour, toutes les installations de fabrication d'armes chimiques déclarées ont été mises hors service, détruites ou converties à des activités pacifiques. Toutefois, seulement 30 % des munitions et conteneurs chimiques et 20 % des stocks mondiaux d'agents chimiques déclarés ont été détruits sous vérification. Une prolongation exceptionnelle du délai d'exécution du programme de destruction jusqu'en 2012 avait cependant été prévue lors de la ratification de la CIAC.

Depuis l'entrée en vigueur de la CIAC, l'emploi d'armes chimiques pendant un conflit est peu envisageable. Il existe cependant une menace très sérieuse d'utilisation d'armes chimiques par des organisations terroristes contre une population civile.

## 2. La classification des agents de guerre chimique [1,2,6]

Il est important de distinguer les termes « agent de guerre chimique » et « arme chimique ». Un agent de guerre chimique est un produit chimique pouvant provoquer la mort, des dommages permanents ou une incapacité temporaire par son action sur des processus biologiques. Une arme chimique désigne l'ensemble des éléments suivants : l'agent de guerre chimique, ses précurseurs ainsi que les dispositifs nécessaires à sa mise en oeuvre (obus, grenades,…) [4,5]. Les agents de guerre chimique peuvent être répartis en trois grandes catégories selon leur toxicité et leur mode d'action : les agents neutralisants, les agents incapacitants et les agents létaux. Les toxines constituent une catégorie particulière de produits chimiques toxiques puisque certaines d'entre elles sont considérées comme des agents de guerre chimique, telles que la ricine ou la saxitoxine référencées dans le tableau I de la CIAC [4,5], et d'autres comme des agents de guerre biologique (mycotoxines, venins, microcystines, etc.). Les toxines pouvant donc être assimilées à des agents de guerre chimique en raison de leur structure chimique bien définie et de leur incapacité à se multiplier, il est intéressant de les inclure dans la description des différentes catégories d'agents de guerre chimique présentées, ici, dans un ordre de toxicité croissante.

### 2.1 Les agents neutralisants

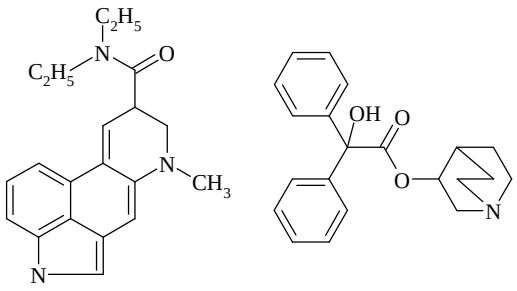
Les agents neutralisants sont des produits chimiques peu toxiques aux effets instantanés mais passagers parmi lesquels peuvent être distingués :

- les lacrymogènes (chloroacétophénone, o-chlorobenzylidène malonodinitrile, etc.)
- les sternutatoires (chlorure et cyanure de diphénylarsine, etc.)
- les urticants (dibenzoxazépine, etc.)

Des agents neutralisants ont été massivement employés pendant la Première Guerre Mondiale et sont aujourd'hui utilisés à des fins non-interdites en tant qu'agents de maintien de l'ordre public (lutte anti-émeute).

## 2.2 Les agents incapacitants

Les agents incapacitants mettent l'adversaire hors d'état de combattre sans provoquer le décès et sans laisser de séquelles. Ils peuvent agir sur l'état physique (incapacitants physiques) ou psychique (psychotropes) de l'individu avec un rétablissement généralement atteint en un à deux jours. Les incapacitants physiques peuvent provoquer des paralysies temporaires, des analgésies profondes ou de l'hypotension. Il existe cependant assez peu d'informations sur les recherches qui ont pu être menées sur les incapacitants physiques ou sur leur utilisation. Les informations disponibles sur les psychotropes sont en revanche plus précises. La diéthylamide de l'acide lysergique (Figure 1), plus connue sous l'acronyme LSD, est un psychotrope stimulant, qui entraîne une activité nerveuse excessive responsable d'hallucinations et de grandes difficultés de prise de décisions. Le LSD a été découvert en 1938 et considéré comme un agent de guerre chimique potentiel dans les années 50, qui sera finalement rejeté en raison de son action trop imprévisible et de son coût de production élevé. Le benzylate de quinuclidinyle (ou agent BZ), qui a été produit par les Etats-Unis dans les années 1960, est un psychotrope dépresseur provoquant une somnolence importante et un état de grande confusion mentale (Figure 1).




**LSD** **agent BZ**

**Figure 1:** Structure de deux agents incapacitants psychotropes (LSD et agent BZ).

## 2.3 Les agents létaux

Les agents létaux ont une toxicité bien plus élevée que celle des agents neutralisants ou incapacitants et peuvent conduire à la mort si un traitement médical adapté n'est pas délivré rapidement. La toxicité d'un agent de guerre chimique présent sous forme de gaz, de vapeurs ou d'aérosol peut être exprimée par le produit de la concentration d'agent dans l'atmosphère (C, généralement exprimée en $mg.m^{-3}$) et de la durée d'exposition (t, généralement exprimé

en min) induisant le décès de 50 % des individus au repos. Ce produit, noté $Ct_{L50}$, traduit le niveau d'exposition et non la quantité effective d'agent absorbée par l'organisme qui correspond à la dose létale. La dose létale induisant le décès de 50 % des individus au repos (notée $DL_{50}$) est généralement exprimée en $mg.min.m^{-3}$ lorsque l'agent est inhalé ou en $mg.kg^{-1}$ lorsque l'agent est ingéré ou injecté. Les valeurs des $Ct_{L50}$ et des $DL_{50}$ étant assez variables selon les sources, toutes les données répertoriées dans ce manuscrit sont issues du même document [6].

### *2.3.1 Les agents suffocants*

Les agents suffocants endommagent exclusivement les tissus pulmonaires et peuvent conduire à la formation d'un œdème. Le phosgène (ou agent CG) et le chlore (Tableau 1) ont été massivement employés pendant la Première Guerre Mondiale mais présentent des $Ct_{L50}$ élevées et une faible persistance due à leur grande volatilité. Certains agents suffocants sont encore utilisés actuellement pour de nombreuses applications industrielles ou agricoles.

| **agent suffocant** | **formule** | **état à 25°C** | **$Ct_{L50}$** ($mg.min.m^{-3}$) |
|---|---|---|---|
| **phosgène** (agent CG) | $COCl_2$ | gaz | 3200 |
| **chlore** | $Cl_2$ | gaz | 19000 |

**Tableau 1:** Formule, état à 25°C et $Ct_{L50}$ (chez l'Homme) de quelques agents suffocants [6].

### *2.3.2 Les agents vésicants [7]*

Les agents vésicants, tels que l'ypérite (ou gaz moutarde ou agent HD), les moutardes à l'azote (ou agents HN) ou la lewisite (ou agent L) (Tableau 2), détruisent la structure cellulaire de tous les types de tissus. Ils peuvent être épandus sous forme de fines gouttelettes dont la consistance huileuse permet de recouvrir le corps entier des victimes. Les agents vésicants provoquent de graves lésions oculaires et cutanées pouvant persister jusqu'à plusieurs semaines. Ces effets apparaissent dans un délai allant de quelques heures à quelques jours avec les moutardes mais sont immédiats avec la lewisite. Malgré la gravité des lésions qu'ils engendrent, les agents vésicants entraînent rarement la mort lorsque les voies respiratoires ont été protégées.

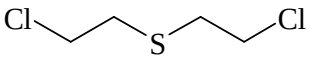
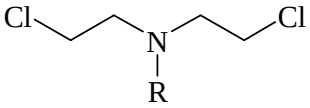
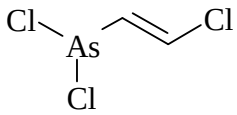
| **agent vésicant** | **structure** | **état à 25°C** | **$Ct_{L50}$** (mg.min.m$^{-3}$) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | par inhalation | par contact cutané |
| **ypérite** (agent HD) |  | liquide | 1000 | 10000 |
| **moutardes à l'azote** (agents HN) |  R=$C_2H_5$ : agent HN-1<br>R=$CH_3$ : agent HN-2<br>R=$(CH_2)_2Cl$ : agent HN-3 | liquide | 1500-3000 | 10000-20000 |
| **lewisite** (agent L) |  | liquide | 1500 | 100000 |

**Tableau 2:** Structure, état à 25°C et CtL50 par inhalation et par contact cutané (chez l'Homme) de quelques agents vésicants [6].

### *2.3.3 Les agents hémotoxiques*

Les agents hémotoxiques entravent l'oxygénation des tissus en diminuant les échanges d'oxygène entre le sang et les poumons ou en empêchant les cellules d'utiliser l'oxygène transporté par le sang. Les agents sanguins, tels que l'acide cyanhydrique (ou agent AC) ou le chlorure de cyanogène (ou agent CK) (Tableau 3), sont caractérisés par leur grande rapidité d'action et ont été utilisés lors de la Première Guerre Mondiale.

| **agent sanguin** | **formule** | **état à 25°C** | $Ct_{L50}$ (mg.min.m$^{-3}$) par inhalation |
|---|---|---|---|
| **acide cyanhydrique** (agent AC) | HCN | liquide-gaz ($T_{éb}$=25,5°C) | 2000 |
| **chlorure de cyanogène** (agent CK) | ClCN | gaz | 11000 |

**Tableau 3:** Formule, état à 25°C et $Ct_{L50}$ par inhalation (chez l'Homme) de quelques agents sanguins [6].

### *2.3.4 Les agents neurotoxiques [8]*

Les agents neurotoxiques sont des composés organophosphorés qui constituent les plus redoutables des agents de guerre chimique répertoriés (Tableau 4). Deux types d'agents neurotoxiques peuvent être distingués :

- les agents de type G (tabun, sarin, soman) qui sont des composés volatils agissant essentiellement par inhalation.
- les agents de type V (VX, R-VX) qui sont des composés peu volatils caractérisés par une toxicité très élevée par voie cutanée.

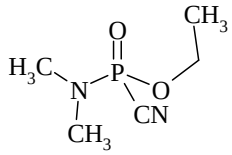
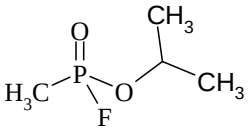
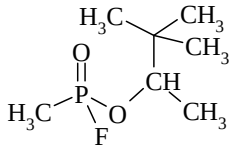
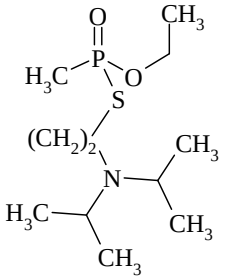
| **agent neurotoxique** | **structure** | **état à 25°C** | **$Ct_{L50}$** (mg.min.m$^{-3}$) par inhalation | **$DL_{50}$** (mg.kg$^{-1}$) par voie percutanée |
|---|---|---|---|---|
| **tabun** (agent GA) |  | liquide | 400 | 15 |
| **sarin** (agent GB) |  | liquide | 100 | 15 |
| **soman** (agent GD) |  | liquide | 100 | 15 |
| **VX** (agent VX) |  | liquide | 10 | 0,20 |

**Tableau 4:** Structure, état à 25°C, $Ct_{L50}$ par inhalation et $DL_{50}$ par voie percutanée (chez l'Homme) de quelques agents neurotoxiques [6].

Les agents neurotoxiques agissent principalement sur le système nerveux central en neutralisant le site actif de l'acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme a pour fonction d'hydrolyser l'acétylcholine qui est un neurotransmetteur libéré au niveau des synapses pour assurer la transmission de l'influx nerveux. L'inhibition de l'AChE par un agent neurotoxique

entraîne une accumulation d'acétylcholine au niveau des cellules nerveuses, ce qui provoque la saturation des récepteurs cholinergiques. Les effets sur les systèmes nerveux central, respiratoire et cardiaque sont très graves : contractions pupillaires intenses, hypersalivation, convulsions et contractions musculaires suivies d'un ralentissement progressif des activités respiratoire et cardiaque. L'injection d'un antidote composé généralement d'atropine (anticholinergique), de benzodiazépine (anticonvulsif) et d'oxime (réactivateur cholinergique) peut permettre d'éviter le décès de la victime.

## 2.4 Les toxines [9]

Les agents de guerre biologique se distinguent des agents de guerre chimique par leur capacité à se reproduire dans l'organisme attaqué. Ils se composent essentiellement de bactéries et de virus. Les toxines sont des produits chimiques toxiques, protéiques ou non-protéiques, naturellement sécrétés par des organismes vivants. Les toxines ont une structure chimique bien définie et ne possèdent pas la capacité de se multiplier : elles devraient donc appartenir à la classe des agents de guerre chimique. Cependant, seules la ricine et la saxitoxine sont référencées dans le tableau I de la CIAC. Les toxines sont en effet souvent considérées comme des agents de guerre biologique en raison de leurs effets analogues : activité à très faible concentration, temps de latence prolongé, déclenchement de réponses immunitaires, etc. La plupart des toxines possèdent une toxicité bien plus élevée que celle des agents de guerre chimique mais elles agissent moins rapidement et sont plus difficiles à produire à grande échelle. Les toxines présentées ci-dessous sont classées selon leur origine et dans un ordre de toxicité croissante : les mycotoxines, les toxines marines, les venins, les phytotoxines et les toxines bactériennes.

### *2.4.1 Les mycotoxines*

Les mycotoxines sont des toxines sécrétées par des champignons. Deux types de mycotoxines peuvent être cités : les aflatoxines et les trichothécènes. Les aflatoxines sont des toxines non-protéiques issues d'*Aspergillus flavus* ou d'*Aspergillus parasiticus* agissant sur le foie (hépatotoxines) parmi lesquelles l'aflatoxine B1 (Figure 2) est la plus toxique ($DL_{50}$=7,2 $mg.kg^{-1}$ chez la souris [10]). Des aflatoxines ont été produites pour équiper l'arsenal chimique irakien sans que l'on puisse réellement expliquer le choix de ces produits dont la toxicité reste modérée par rapport aux autres toxines citées ici [11].

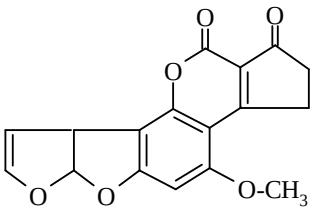
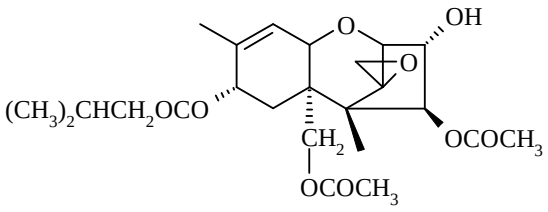
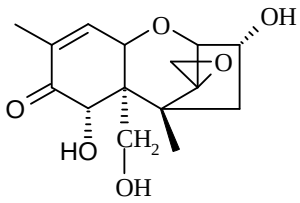


**Figure 2 :** Structure de l'aflatoxine B1.

Les trichothécènes sont des mycotoxines issues de *Fusarium*, *Myrothecium*, ou *Stachybotrys* affectant le système gastro-entérique (entérotoxines). Des trichothécènes ont peut être été utilisés comme agents de guerre en Asie du Sud et en Afghanistan dans les années 1970 [12]. La toxine T-2 et le déoxynivalénol (Figure 3) possèdent, respectivement, des $DL_{50}$ de 1,21 $mg.kg^{-1}$ [13] et 70 $mg.kg^{-1}$ [10] chez la souris.



**toxine T-2**

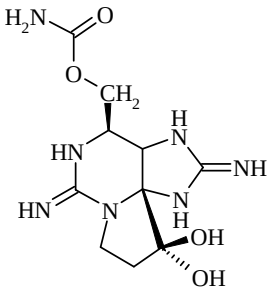


**déoxynivalénol**

**Figure 3 :** Structure de deux trichothécènes : la toxine T-2 et le déoxynivalénol.

### *2.4.2 Les toxines marines [14]*

La saxitoxine (Figure 4) est une toxine aux propriétés paralysantes produite par des dinoflagellés (*Saxidomus giganteus*). Cette neurotoxine bloque le passage des ions sodium à travers les canaux ioniques des cellules nerveuses et possède une $DL_{50}$ de 10 $\mu g.kg^{-1}$ par voie orale chez la souris [13].



**saxitoxine**

**Figure 4 :** Structure de la saxitoxine.

Les microcystines sont des hépatotoxines produites par des cyanobactéries (ou algues bleues). Ce sont des heptapeptides cycliques variant de deux acides aminés nommés X et Z (Figure 5) selon les microcystines. Les $DL_{50}$ des microcystines sont d'environ 50 $\mu g.kg^{-1}$ chez la souris [14].

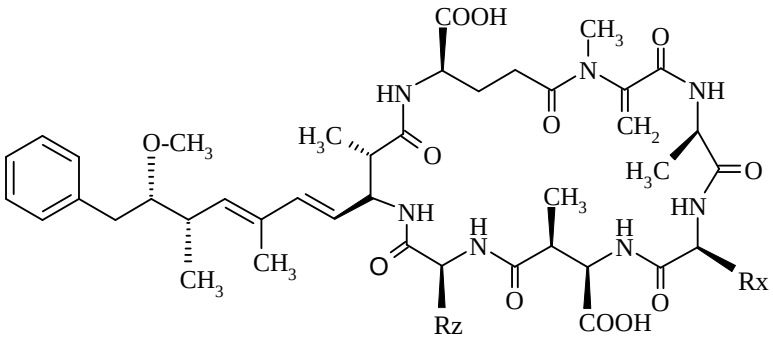



**Figure 5 :** Structure commune des microcystines. Rx et Rz correspondent aux chaînes latérales des deux acides aminés X et Z (de configuration L) variant selon les microcystines.

### *2.4.3 Les venins*

La plupart des venins d'animaux contiennent des neurotoxines qui inhibent les récepteurs de neurotransmetteurs ou qui bloquent les canaux ioniques $Na^+$ et $K^+$ pour entraîner la paralysie de la proie. Les venins sont souvent des toxines protéiques telles que l'α-tityustoxine (issue du scorpion, $DL_{50}$=9 $\mu g.kg^{-1}$ chez la souris [15]) ou la taipoxine (issue d'un serpent, $DL_{50}$=5 $\mu g.kg^{-1}$ chez la souris [15]). La tetrodotoxine est une neurotoxine non-protéique sécrétée par des poissons parmi lesquels le fugu, très apprécié au Japon ($DL_{50}$=8 $\mu g.kg^{-1}$ chez la souris [15]).

### *2.4.4 Les phytotoxines*

Certaines toxines issues de plantes (phytotoxines) inhibent la synthèse protéique des cellules eucaryotes. Les toxines les plus étudiées en tant qu'agents potentiels du risque chimique sont la ricine et l'abrine. Ce sont des glycoproteines d'environ 60 kDa constituées de deux sous-unités appelées chaîne A et chaîne B et liées par un pont disulfure (Figure 6). La chaîne B assure la liaison de la toxine aux récepteurs de la cellule ciblée, tandis la chaîne A possède l'activité toxique. La ricine (Figure 6) est une phytotoxine issue du ricin (*Ricinus communis*) dont l'action dépend de la voie d'administration : l'inhalation entraîne des

maladies respiratoires aiguës, l'ingestion provoque des hémorragies gastro-intestinales, l'injection conduit à une nécrose des muscles qui peut affecter les organes vitaux. La $DL_{50}$ de la ricine par ingestion est estimée de 3 $\mu g.kg^{-1}$ chez la souris [13]. L'exemple le plus connu de l'usage de ricine est l'assassinat du dissident bulgare Georgi Markov commis en 1978 [16]. La ricine peut être facilement extraite des graines de ricin et représente donc une menace terroriste très sérieuse. L'abrine, une phytotoxine issue de *Abrus precatorius*, possède une action très proche de la ricine mais sa toxicité est beaucoup plus élevée ($DL_{50}$=0,04 $\mu g.kg^{-1}$ chez la souris [13].

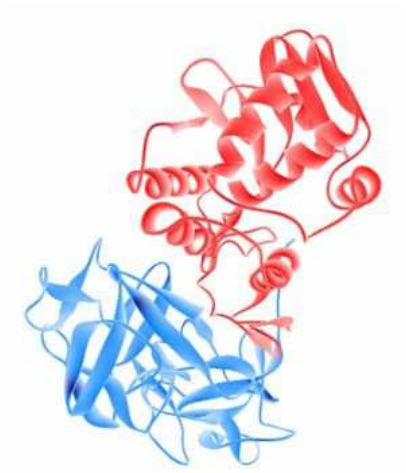


**Figure 6 :** Structure de la ricine : la chaîne A est représentée en rouge, la chaîne B en bleu.

### *2.4.5 Les toxines bactériennes*

Certaines bactéries pathogènes responsables de graves maladies telles que le botulisme, le tétanos ou la diphtérie sécrètent des toxines protéiques (Tableau 5). La toxine tétanique et plus particulièrement la toxine botulique sont des neurotoxines extrêmement toxiques provoquant des paralysies musculaires. La toxine diphtérique inhibe la synthèse protéique et affecte le système respiratoire.

| **toxine** | **$DL_{50}$** ($\mu g.kg^{-1}$) | **source** (bactérie) | **maladie associée** |
|---|---|---|---|
| toxine botulique A | $3.10^{-4}$ | *Clostridium botulinum* | botulisme |
| toxine tétanique | $1.10^{-3}$ | *Clostridium tetani* | tétanos |
| toxine diphtérique | 0,10 | *Corynebacterium diphteriae* | diphtérie |

**Tableau 5 :** Toxine protéique bactérienne, toxicité chez la souris [13], bactérie productrice de la toxine et maladie associée.

# 3. Les techniques d'analyse des agents de guerre chimique

Les techniques d'analyse permettant de détecter et identifier des agents de guerre chimique jouent un rôle essentiel lors des inspections de sites militaires ou industriels menées par l'OIAC ou lors de la survenue d'un accident ou d'un attentat chimique touchant une population civile. Dans ces circonstances, les méthodes d'analyse de terrain sont indispensables pour déterminer rapidement la nature des produits chimiques présents afin de déclencher la mise en place des dispositifs de protection adaptés à la situation. Ces techniques d'analyse sont généralement peu spécifiques et souvent limitées aux produits chimiques appartenant au tableau I de la CIAC [17]. Elles présentent également un risque notable de faux positifs mais excluent, en principe, les faux négatifs [18]. Les prélèvements réalisés sur le terrain doivent donc être analysés en laboratoire avec un appareillage plus complet pour obtenir un résultat sans équivoque, en suivant des procédures de transport, de traitement, d'analyse et d'identification des composés imposées par l'OIAC. La mise en évidence de la présence d'agents de guerre chimique repose généralement sur des analyses qualitatives plutôt que quantitatives.

## 3.1 L'analyse de terrain [18-20]

### *3.1.1 Les papiers détecteurs*

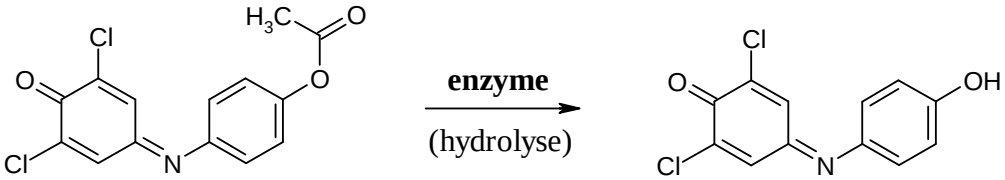
Les papiers détecteurs, comme par exemple les modèles PD F1 utilisés par l'armée française, sont imprégnés de colorants qui réagissent avec trois catégories d'agents de guerre chimique : l'ypérite, les agents neurotoxiques de type V et les agents neurotoxiques de type G. La présence de chacune de ces catégories d'agents de guerre chimique est révélée par un changement caractéristique de la coloration du papier détecteur. Cette méthode détecte la classe d'agents de guerre chimique présente mais ne permet pas d'identifier l'agent. Par ailleurs, les papiers détecteurs sont restreints à l'analyse de substances liquides et peuvent conduire à de nombreux faux positifs par réaction avec des produits aminés ou phosphorés, avec du gasoil ou du dichlorométhane.

### *3.1.2 Les tubes colorimétriques*

La trousse de détection chimique de contrôle (TDCC modèle 1 bis) est constituée d'un assortiment de tubes colorimétriques. Ces tubes contiennent des réactifs immobilisés sur un adsorbant solide permettant de détecter des agents de guerre chimique présents à l'état de gaz ou de vapeurs. Le protocole d'analyse consiste à introduire un échantillon d'atmosphère suspectée d'être contaminée dans les différents tubes colorimétriques au moyen d'une pompe. La présence d'un agent ou d'une classe d'agents de guerre chimique se traduit par l'apparition d'une coloration caractéristique dans le tube correspondant. Les différents tubes colorimétriques disponibles permettent de détecter une gamme assez large d'agents de guerre chimique.

### *3.1.3 La détection enzymatique*

La méthode de détection enzymatique exploite les propriétés d'inhibition de l'acétylcholinestérase caractéristiques des agents neurotoxiques. Cette détection est réalisée au moyen d'un support (modèle DETINDIV F1) contenant une enzyme (butyrylcholinestérase) et un substrat chromophore (acétate de 2,6-dichloroindophényl). En absence d'agent neurotoxique, l'enzyme hydrolyse le substrat, ce qui conduit à un changement de coloration (Figure 7). En présence d'un agent neurotoxique, l'action de l'enzyme représentée en Figure 7 est inhibée et aucun changement de coloration n'est observé. La détection enzymatique ne permet cependant pas d'identifier l'agent neurotoxique présent.




**coloration rouge** **coloration bleue**

**Figure 7 :** Action de l'enzyme sur le substrat chromophore conduisant au changement de coloration observé en absence d'agent neurotoxique.

### *3.1.4 Les méthodes physiques instrumentales*

Les méthodes physiques instrumentales utilisées sur le terrain font intervenir des principes analytiques souvent identiques à ceux utilisés en laboratoire. Les appareils employés doivent cependant être adaptés aux contraintes particulières imposées par un déplacement sur le terrain. Ils doivent ainsi remplir des critères de robustesse, de tolérance au transport, de consommation d'énergie, d'exploitation simplifiée et de facilité d'utilisation. Des dispositifs portatifs de spectrométrie à mobilité d'ions (système CHEMPRO) ou de détection par photométrie de flamme (système AP2C) font ainsi partie de la panoplie d'appareils utilisés pour les analyses de terrain. La spectrométrie à mobilité d'ions (IMS) permet de séparer des ions selon leur mobilité en phase gazeuse qui dépend du rapport volume/charge [21]. Cette technique est rapide et sensible mais son faible pouvoir résolutif conduit à un risque élevé de faux positifs. Le couplage de l'IMS avec la spectrométrie de masse semble cependant très prometteur pour améliorer les capacités d'identification sur le terrain [22,23]. La détection par photométrie de flamme (FPD) est capable de révéler la présence de produits volatils phosphorés et/ou soufrés tels que les agents neurotoxiques ou l'ypérite. D'autres instruments d'analyse plus sophistiqués, tels que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [24,25] ou à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (GC-FTIR) [26] peuvent être présents dans les laboratoires mobiles utilisés sur le terrain.

## 3.2 La dégradation des agents de guerre chimique

Les agents neurotoxiques et vésicants sont des composés volatils et peu polaires qui se dégradent assez facilement dans un environnement aqueux pour donner des produits de dégradation généralement non toxiques, peu volatils, plus polaires et plus stables que l'agent initial [27]. Le chemin de dégradation des agents neurotoxiques et vésicants, présenté en Figure 8**,** indique la présence de produits de dégradation spécifiques à chaque agent. Les produits de dégradation spécifiques peuvent représenter le seul moyen d'identifier l'agent présent initialement lorsque celui-ci a été dégradé avant l'analyse. Une grande variété d'outils analytiques peut être employée lors des analyses hors site pour détecter et identifier des agents de guerre chimique et leurs produits de dégradation [17,28,29].

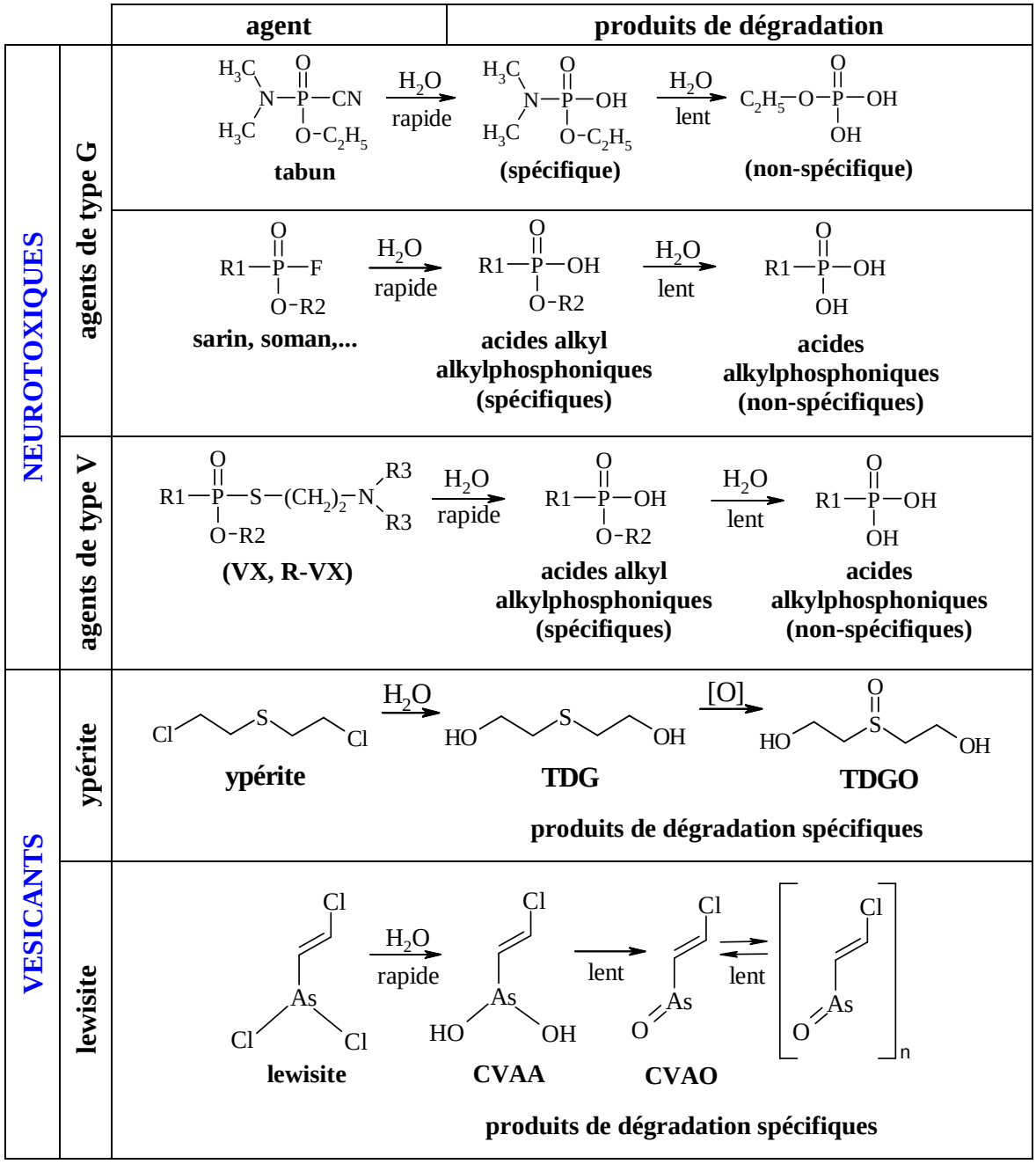



**Figure 8 :** Chemin de dégradation des agents neurotoxiques (de types G et V) et vésicants (ypérite et lewisite). TDG : thiodiglycol ; TDGO : thiodiglycolsulfoxyde ; CVAA : acide arsénieux de chlorovinyl; CVAO : oxyde arsénieux de chlorovinyl.

## 3.3 La chromatographie en phase gazeuse

### *3.3.1 La dérivation chimique [30-33]*

La plupart des agents de guerre chimique sont des composés volatils et thermiquement stables. La chromatographie en phase gazeuse (GC) est donc la technique séparative la plus couramment employée pour leur analyse [27]. Cette technique procure une grande efficacité de séparation, une bonne résolution et la possibilité d'utiliser des techniques de détection très variées. Toutefois, les produits de dégradation des agents neurotoxiques et vésicants, représentant parfois le seul moyen d'identifier l'agent présent initialement, sont des composés généralement plus polaires que les agents initiaux et peu volatils. Différentes procédures de dérivation chimique des produits de dégradation peuvent alors être réalisées pour générer des espèces plus volatiles et analysables en GC [34]. Les réactifs les plus couramment employés sont indiqués dans le Tableau 6.

| | **acides phosphoniques** | **TDG** | **lewisite, CVAA** |
|---|---|---|---|
| **méthylation** | **X** | | |
| - *diazométhane* (méthanol) | X | | |
| - *(triméthylsilyl) diazométhane* (hexane) | X | | |
| - *TMPAH* (méthanol) | X | | |
| **silylation** | **X** | **X** | |
| - *BSTFA (+TMSCl 1 %)* (hexane) | X | X | |
| - *MTBSTFA (+TBDMSCl 1 %)* (acétonitrile) | X | X | |
| *TBDMSCl/imidazole* (diméthylformamide) | X | X | |
| **pentafluorobenzylation** | **X** | | |
| - *PFBBr* (acétonitrile) | X | | |
| **acylation** | | **X** | |
| - *HFBA* (acétate d'ethyle) | | X | |
| **thiolation** | | | **X** |
| - *monothiols :* éthanethiol ou propanethiol ou butanethiol (acétone) | | | X |
| - *dithiols :* 1,2-éthanedithiol ou 1,3-propanedithiol ou dimercaptol (acétone) | | | X |

**Tableau 6 :** Présentation des réactifs (en italique) les plus couramment utilisés pour la dérivation chimique des produits de dégradation des agents neurotoxiques et vésicants et les solvants généralement employés pour la réaction (entre parenthèses). TMPAH : hydroxyde de triméthylphénylammonium, BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide, TMSCl : chlorure de triméthylsilyle, MTBSTFA : N,méthyl-N-(tert.-butyldiméthylsilyl) trifluoroacétamide, TBDMSCl : chlorure de tert.-butyldiméthylsilyle, PFBBr : bromure de pentafluorobenzyle, HFBA : heptafluorobutyryle anhydre.

La dérivation chimique peut aussi être utilisée pour améliorer les performances chromatographiques obtenues pour certaines espèces volatiles telles que la lewisite, le phosgène ou l'agent BZ [34].

### *3.3.2 Les techniques de détection*

La GC offre la possibilité d'utiliser une grande variété de techniques de détection. La détection par ionisation de flamme (FID) est une technique très répandue pour la détection d'agents de guerre chimique et leurs produits de dégradation [28]. Cette technique très sensible utilise une flamme air-hydrogène à travers laquelle passe l'effluent de la colonne GC pour provoquer l'ionisation des espèces présentes. La détection par photoionisation (PID) permet d'ioniser des molécules par l'absorption de photons dont l'énergie est supérieure au potentiel d'ionisation de la molécule. La réponse est proportionnelle à l'efficacité d'ionisation des composés : un signal plus intense est ainsi obtenu pour les composés soufrés (ypérite) ou contenant des insaturations (lewisite). La PID est cependant très sensible aux interférents aromatiques qui peuvent être présents dans l'échantillon. La détection par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge permettant d'identifier les fonctions chimiques du composé analysé grâce à la détection de vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. L'identification est réalisée par comparaison du spectre IR obtenu avec ceux compilés dans une base de données de référence [26].

Les détecteurs sélectifs, tels que la photométrie de flamme (FPD) ou l'émission atomique (AED), sont particulièrement intéressants pour la détection des composés liés à la CIAC qui sont des espèces riches en hétéroatomes (O, F, N, S, P, Cl et As). La détection FPD consiste à exciter les atomes du composé analysé au moyen d'une flamme. Le retour à l'état fondamental est accompagné d'une émission de photons, caractéristique de chaque élément présent. La technique FPD peut être sélective au soufre (mode S) ou au phosphore (mode P) grâce à l'utilisation de filtres optiques. Cette technique est donc particulièrement appropriée à la détection des agents neurotoxiques et de l'ypérite. Le détecteur azote-phosphore (NPD) apporte une sensibilité particulièrement élevée pour les composés contenant du phosphore et/ou de l'azote, ce qui permet de détecter des agents neurotoxiques présents à l'état de traces. L'AED permet de détecter n'importe quel élément chimique de manière sélective avec une grande sensibilité. Les molécules analysées sont introduites dans un plasma d'hélium

hautement énergétique induit par micro-ondes, ce qui permet de dissocier totalement la molécule en atomes excités. Le retour à l'état fondamental est caractérisé par une émission de photons de longueurs d'ondes caractéristiques. L'AED permet de déterminer une formule empirique approximative, très utile pour identifier les composés détectés [35,36]. L'AED est une technique très utilisée pour la détection des composés liés à la CIAC [27].

### *3.3.3 Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse*

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique très employée pour l'analyse des produits liés à la CIAC. Elle est souvent considérée comme la méthode de choix pour obtenir une identification sans équivoque des composés [37-40]. Deux types de sources d'ionisation procurant des informations très complémentaires peuvent être utilisés : l'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI). La source EI, où règne un vide poussé ($10^{-4}$ Pa), est constituée d'un filament chauffé émettant des électrons accélérés vers une anode [41]. Lorsqu'une molécule (M) présente en phase gazeuse dans la source d'ionisation entre en collision avec un électron dont l'énergie cinétique est supérieure à son potentiel d'ionisation, l'espèce ionisée $M^{+\bullet}$ (ion moléculaire) est formée par expulsion d'un électron :

$$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$$

Une énergie cinétique des électrons égale à 70 eV permet d'ioniser la plupart des molécules organiques.

Les spectres de masse obtenus avec une source EI présentent généralement de nombreux ions fragments. L'ion moléculaire $M^{+\bullet}$ est souvent indétectable et ne permet pas d'accéder à la masse moléculaire du composé. Cependant, les ions fragments obtenus en EI constituent une véritable empreinte de la molécule et permettent d'identifier le composé détecté par comparaison avec les nombreux spectres EI compilés dans la base de données de l'OIAC et enregistrés en conditions standard (énergie cinétique des électrons=70 eV, courant d'émission=100-200 µA et température de la source=150-200°C).

Le principe de l'ionisation chimique (CI) repose sur l'utilisation d'un gaz réactif (GH) remplissant la source [41]. Dans un premier temps, ce gaz réactif est ionisé par impact électronique au moyen d'électrons issus d'un filament chauffé pour générer l'espèce $GH^{+\bullet}$ qui entre rapidement en collision avec d'autres molécules de gaz réactif pour former l'espèce $GH_2^+$ :

$$GH + e^- \rightarrow GH^{+\bullet} + 2e^-$$

$$GH^{+\bullet} + GH \rightarrow GH_2^+ + G^\bullet$$

Ces ions de gaz réactif vont ensuite entrer en collision avec les molécules de l'échantillon (M) et engendrer une réaction ion-molécule permettant la formation de l'ion pseudo-moléculaire $MH^+$ par le transfert d'un proton :

$$GH_2^+ + M \rightarrow MH^+ + GH$$

Cette réaction n'est possible que si l'affinité protonique de M, définie comme le négatif de l'enthalpie standard de la réaction $M + H^+ \rightarrow MH^+$, est supérieure à celle de GH. L'énergie transmise au cours de l'ionisation correspond à la différence d'affinité protonique entre le gaz réactif et la molécule. La fréquence des collisions dépend de la pression régnant dans la source (de l'ordre de $10^{-3}$ Pa). Les gaz réactifs les plus utilisés sont l'ammoniac, le méthane et l'isobutane. La CI génère généralement peu d'ions fragments et préserve l'ion pseudo-moléculaire. Cette technique d'ionisation permet donc d'obtenir la masse moléculaire du composé et complète ainsi les informations obtenues en EI.

## 3.4 La chromatographie en phase liquide

### *3.4.1 Les avantages de la chromatographie en phase liquide*

La chromatographie en phase liquide (LC), impliquant le plus souvent des conditions de polarité de phases inversée, est une autre technique séparative très employée pour la séparation des composés liés à la CIAC. Le principal atout de la LC par rapport à la GC concerne l'analyse des produits de dégradation d'agents de guerre chimique qui peut être réalisée sans dérivation chimique, évitant ainsi les inconvénients suivants :

- un temps d'analyse long.
- le manque de sélectivité des réactifs de dérivation qui peuvent aussi réagir avec des interférents issus de la matrice et conduire à une source d'erreur importante lors d'analyses quantitatives.
- le large excès de réactif de dérivation, souvent nécessaire pour obtenir une dérivation complète, peut générer un important bruit de fond et réduire la durée de vie de la colonne de séparation.

- la réaction de dérivation devant se dérouler dans un solvant organique, il est nécessaire d'effectuer un échange de solvant pour analyser des échantillons aqueux.

La chromatographie liquide permet donc de réaliser un criblage rapide des produits de dégradation d'agents de guerre chimique contenus dans des échantillons aqueux en évitant des étapes fastidieuses de dérivation chimique et d'échange de solvant [42]. La majorité des phases stationnaires utilisées sont de type silice greffée ($C_8$ ou $C_{18}$). Les micro-colonnes (diamètre interne de 1 à 2 mm avec un débit de 50 à 200 $\mu L.min^{-1}$) et les colonnes capillaires (diamètre interne de 150 à 500 µm avec un débit de 1 à 10 $\mu L.min^{-1}$) sont les plus employées. Les agents de guerre chimique et leurs produits de dégradation étant dépourvus de groupement chromophore ou fluorophore, les techniques de détection UV ou par fluorescence sont impossibles (sans dérivation). La détection évaporative par diffusion de lumière (ELSD) ou la spectrométrie de masse (présentée en détail dans le paragraphe I.3.4.2) constituent donc des techniques alternatives intéressantes. L'ELSD consiste à nébuliser puis évaporer l'éluant arrivant de la colonne. Les résidus solides contenant les analytes moins volatils que l'éluant passent à travers un faisceau laser et entraînent la diffusion de ce faisceau. Cette technique de détection est sensible et universelle et a été utilisée en couplage avec la chromatographie liquide pour la détection de produits de dégradation d'agents neurotoxiques (acides phosphoniques) [43]. Par ailleurs, le couplage avec la détection FPD (en mode P ou S) permet d'effectuer un criblage rapide des produits de dégradation d'agents neurotoxiques et d'ypérite [44,45].

### *3.4.2 Le couplage chromatographie en phase liquide–spectrométrie de masse*

Le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS) est une technique largement employée pour l'analyse d'agents de guerre chimique et leurs produits de dégradation [46-49] ou de toxines [50-53]. Le couplage LC-MS implique l'utilisation de sources d'ionisation fonctionnant à pression atmosphérique. En effet, si l'éluant de la colonne LC était transféré de la phase liquide à la phase gazeuse dans une source d'ionisation à pression réduite, le volume de gaz généré serait considérable. Les sources d'ionisation les plus couramment employées en LC-MS sont l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation par électronébulisation (ESI).

La source APCI fonctionne selon un principe analogue à celui de la source CI utilisée en GC-MS (cf. partie I.3.3.3). L'éluant liquide arrivant de la colonne LC est introduit dans la source APCI sous forme d'un nébulisat au moyen d'un flux de gaz nébulisant (air ou $N_2$). Le nébulisat est ensuite conduit dans une chambre de désolvatation chauffée (entre 400°C et 500°C) où la chaleur transférée aux gouttelettes du nébulisat permet la vaporisation de la phase mobile et de l'échantillon. La phase mobile et l'échantillon, présents en phase gazeuse, entrent ensuite dans la région de réaction où ils sont ionisés. La phase mobile vaporisée joue généralement le rôle de gaz réactif. Contrairement à la source CI utilisée en GC-MS, les ions de gaz réactif ne sont pas formés à partir d'électrons issus d'un filament chauffé mais par des décharges Corona. Les étapes de désolvatation et de vaporisation sont généralement suffisamment rapides pour éviter la décomposition thermique des composés.

Le principe de la source ESI repose sur la formation d'ions en phase gazeuse directement à partir d'espèces présentes en solution. L'éluant arrivant de la colonne LC est introduit dans la source ESI à pression atmosphérique et à température ambiante au moyen d'un capillaire d'introduction. Une différence de potentiel de 2 à 6 kV est appliquée entre le capillaire d'introduction et une contre-électrode. Sous l'action du gradient de champ électrique résultant, les charges sont attirées vers la contre-électrode, ce qui conduit à la déformation de la surface du liquide situé à l'extrémité du capillaire d'introduction pour former le cône de Taylor [54] (Figure 9).

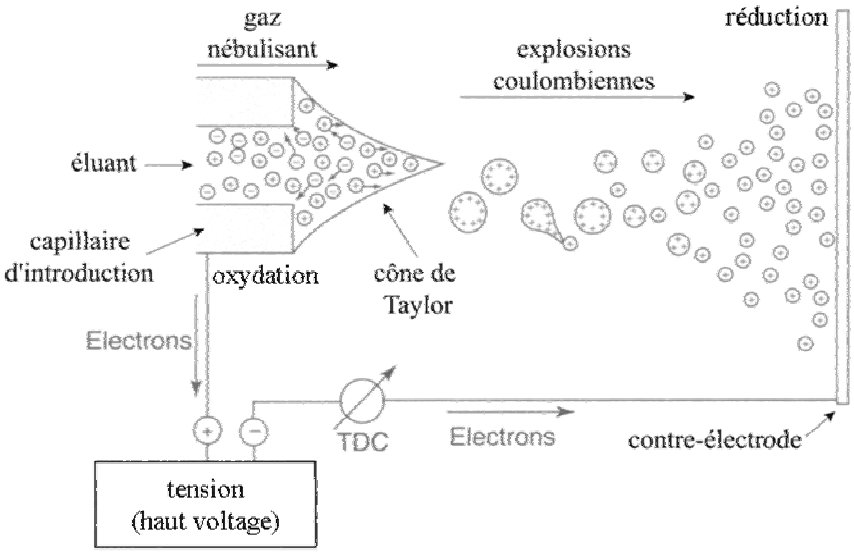



**Figure 9 :** Représentation du mécanisme de formation des gouttelettes chargées par électronébulisation en mode d'ions positifs [55].

L'extrémité du cône de Taylor se rompt pour former un nébulisat de gouttelettes multichargées. Selon leur polarité, les charges se répartissent préférentiellement à la surface de la gouttelette. La formation de ce nébulisat peut être assistée par un flux concentrique de gaz nébulisant ($N_2$) (Figure 9), ce qui autorise des débits d'éluant plus élevés et compatibles avec la LC. Cette source d'ionisation par électronébulisation assistée pneumatiquement (ou « ionspray ») est la source la plus couramment employée de nos jours mais est souvent appelée source d'ionisation par électronébulisation (ou source ESI) par abus de langage.

Un flux de gaz neutre séchant ($N_2$) chauffé entre 100°C et 400°C arrive à contre courant avec un débit compris entre 1 $L.min^{-1}$ et 12 $L.min^{-1}$ pour évaporer le solvant et réduire ainsi la taille des gouttelettes. Les charges de surface des gouttelettes deviennent alors plus proches et les forces de répulsion augmentent. Lorsque la force de répulsion coulombienne devient égale à la tension de surface (limite de Rayleigh), la gouttelette explose et produit des gouttelettes plus petites. Ce processus de fission (explosions coulombiennes) se répète et forme des gouttelettes de très forte densité de charges de surface. Le mécanisme exact par lequel les ions sont transférés en phase gazeuse est encore sujet à de nombreuses recherches. Deux principaux modèles peuvent être cités (Figure 10). Le modèle de la charge résiduelle de Dole [56] propose que les fissions se répètent jusqu'à ce que les gouttelettes chargées deviennent si petites (1 nm de rayon) qu'elles ne contiennent plus qu'une seule molécule d'analyte. Lorsque les dernières molécules de solvant s'évaporent, la molécule retient la charge résiduelle de la gouttelette et forme ainsi un ion en phase gazeuse totalement désolvaté. Le modèle d'évaporation ionique de Iribarne et Thomson [57] suggère que des ions solvatés peuvent être directement émis à partir de gouttelettes d'un rayon de 10 nm, même si celles-ci contiennent plusieurs analytes.

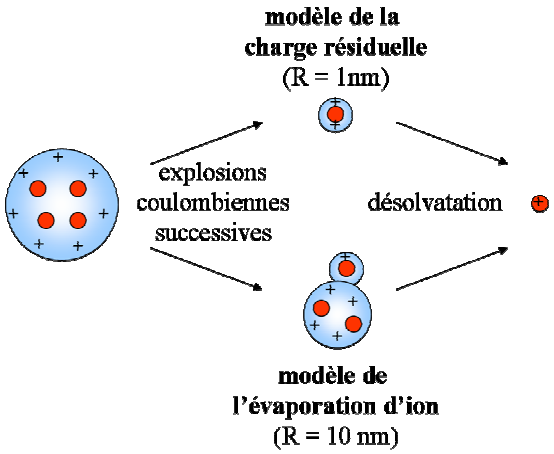



**Figure 10 :** Représentation des modèles de la charge résiduelle (Dole) et de l'évaporation d'ion (Iribarne et Thomson) proposés pour expliquer la formation des ions en phase gazeuse à partir des gouttelettes chargées en ESI.

Le processus d'ionisation par électronébulisation est favorisé si les analytes sont préalablement chargés en solution. Ainsi, l'ajout d'un acide ou d'une base dans la phase mobile est couramment effectué pour favoriser la protonation en mode d'ions positifs ou la déprotonation des composés en mode d'ions négatifs.

L'APCI est souvent considérée comme une technique d'ionisation plus adaptée que l'ESI pour l'analyse de composés neutres et de faible masse, et autorise des débits d'éluant légèrement plus élevés allant jusqu'à 2 $mL.min^{-1}$ contre 1 $mL.min^{-1}$ maximum en ESI. Néanmoins, l'ESI procure souvent une meilleure sensibilité pour les espèces polaires ou chargées et de masse plus élevée [42]. Ces deux techniques d'ionisation sont donc très complémentaires. Les sources ESI et APCI sont des méthodes d'ionisation douce c'est-à-dire qu'elles transmettent peu d'énergie aux composés lors du processus d'ionisation. Elles produisent donc généralement peu de fragmentations en source et procurent en conséquence peu d'informations structurales. Il est donc nécessaire de réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS) permettant de fragmenter les analytes selon des procédés qui dépendent du type de spectromètre de masse utilisé. Les expériences de spectrométrie de masse en tandem fournissent des informations structurales très précieuses permettant d'identifier les composés présents.

## 3.5 L'électrophorèse capillaire

### *3.5.1 Les avantages de l'électrophorèse capillaire*

L'électrophorèse capillaire (CE) permet de séparer des espèces ionisées (ou ionisables) par différences de vitesses de migration électrophorétique sous l'action d'un champ électrique régnant dans un capillaire de diamètre interne compris entre 25 µm à 100 µm, généralement en silice vierge, et rempli d'un électrolyte. La vitesse de migration électrophorétique d'une espèce i ($v_{ep}^{i}$) dépend de sa mobilité électrophorétique ($\mu_{ep}^{i}$) et du champ électrique appliqué (E) :

$$v_{ep}^{i}=\mu_{ep}^{i}.E$$

Sous l'action du champ électrique appliqué, l'existence d'une double couche électrostatique à l'interface paroi du capillaire-électrolyte engendre un écoulement électroosmotique dont le profil de vitesse est plan (Figure 11). Les phénomènes de dispersion radiale rencontrés en chromatographie en phase liquide en raison de l'écoulement parabolique

de la phase mobile sont alors évités, ce qui procure à l'électrophorèse capillaire une efficacité de séparation bien supérieure. La vitesse de migration apparente ($v_{app}^{i}$) d'un composé tient compte de la vitesse de migration électrophorétique ($v_{ep}^{i}$) et de la vitesse de l'écoulement électroosmotique ($v_{eo}$) (Figure 11):

$$v_{app}^{i} = v_{ep}^{i} + v_{eo}$$

Par ailleurs, les très faibles débits (10-100 nL.min$^{-1}$) et volumes injectés (de l'ordre du nL) intervenant en électrophorèse capillaire permettent de consommer très peu d'échantillon et d'électrolyte.

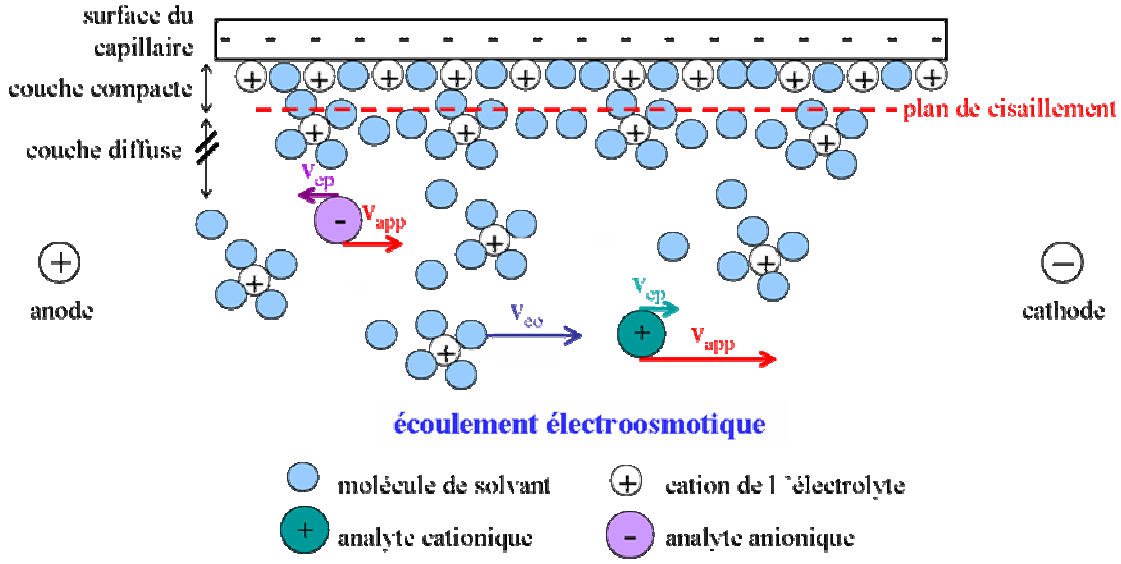



**Figure 11 :** Représentation du principe de l'électroosmose et des vitesses de migration apparentes d'analytes anioniques et cationiques, dans le cas d'un capillaire en silice vierge.

L'électrophorèse capillaire est donc une technique particulièrement adaptée à l'analyse de composés chargés ou très polaires qui peuvent être difficilement séparables en chromatographie en raison de leur élution très rapide. Grâce à son principe de séparation caractéristique, l'électrophorèse capillaire apporte des informations très complémentaires à celles obtenues en chromatographie. L'électrophorèse capillaire a ainsi été appliquée à l'analyse de produits de dégradation d'agents neurotoxiques et de toxines en utilisant différentes techniques de détection [58].

Les composés neutres, dépourvus de mobilité électrophorétique, peuvent toutefois être séparés en utilisant une technique appelée chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MEKC). Le principe de la MEKC consiste à introduire dans l'électrolyte de séparation un tensioactif tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS) à une concentration

supérieure à sa concentration micellaire critique afin de former des micelles. Les composés neutres vont alors être distribués entre l'électrolyte et la pseudo-phase constituée par les micelles chargées. Lorsqu'ils sont incorporés dans les micelles, les composés neutres migrent à la même vitesse que les micelles (Figure 12). Les composés neutres peuvent ainsi migrer à différentes vitesses selon leur affinité pour la pseudo-phase micellaire qui dépend de leur hydrophobie. La MEKC a ainsi pu être appliquée à la séparation de composés neutres liés à la CIAC tels que les produits de dégradation d'agents vésicants [59,60].

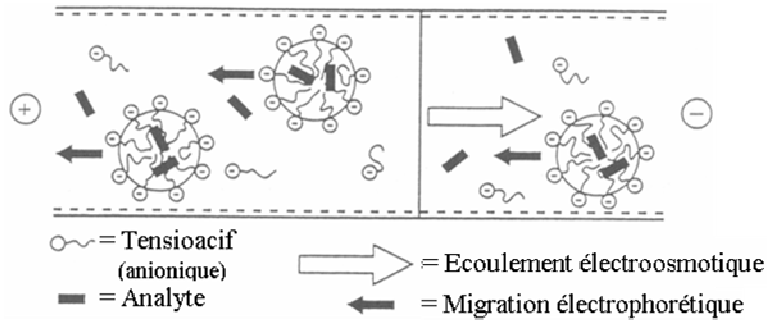



**Figure 12 :** Principe de la MEKC [61].

### *3.5.2 Les techniques de détection*

Les produits de dégradation d'agents de guerre chimique sont dépourvus de groupement chromophore. La détection UV, technique la plus couramment employée en électrophorèse capillaire, peut cependant être réalisée en utilisant un électrolyte contenant un chromophore qui permet de détecter les analytes par diminution de l'absorbance. Cette technique de détection UV indirecte a ainsi été très utilisée pour la détection de produits de dégradation d'agents neurotoxiques ou vésicants [60,62-70]. Plusieurs paramètres sont importants pour réaliser une détection UV indirecte : l'agent chromophore employé doit posséder un coefficient d'absorptivité molaire ($\varepsilon$) élevé et une mobilité électrophorétique ($\mu_{ep}$) proche de celle des analytes pour obtenir des pics fins et symétriques. Pianetti *et al.* [62] ont testé plusieurs agents chromophores pour la séparation de produits de dégradation d'agents neurotoxiques et ont démontré que l'acide phénylphosphonique ($\mu_{ep}$=-30,9 $10^{-5}$ $cm^2.V.s^{-1}$ à 25°C, $\varepsilon$=10000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ à $\lambda_{max}$=200 nm [62]) était le plus adapté. Cet agent chromophore a donc été utilisé dans la majorité des cas bien que de bons résultats aient aussi été obtenus par Mercier *et al.* [64,65] avec l'acide sorbique ($\mu_{ep}$=-30,5 $10^{-5}$ $cm^2.V.s^{-1}$, $\varepsilon$=25000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ à $\lambda_{max}$=254 nm [62]). Toutefois, l'absorbance importante de l'électrolyte chromophore

remplissant le capillaire induit un bruit de fond relativement élevé. La concentration du chromophore doit donc être la plus basse possible pour obtenir de meilleures limites de détection. En effet, la concentration minimale détectable ($C_{min}$) en détection UV indirecte est proportionnelle à la concentration de chromophore ($C_C$) et inversement proportionnelle à la réserve dynamique correspondant au rapport entre le signal d'absorbance du chromophore et le bruit de fond qui lui est associé ($R_D$) et au rapport de transfert défini comme le nombre d'ions chromophores déplacés par un ion-analyte ($R_T$) :

$$C_{min} = \frac{C_c}{R_D.R_T}$$

La sensibilité obtenue en détection UV indirecte est généralement inférieure à celle obtenue en détection UV directe. La détection UV des acides phosphoniques issus de la dégradation des agents neurotoxiques peut être réalisée de manière directe mais nécessite la complexation des analytes avec un composé chromophore tel que le borate de sodium [71]. Enfin, la détection UV directe a aussi été utilisée pour l'analyse de toxines telles que la saxitoxine [72,73], la ricine [74] ou les microcystines [75].

L'absorbance (A) est proportionnelle au coefficient d'absorption molaire (ε) et à la concentration du chromophore (C) mais aussi au trajet optique (ℓ) (loi de Beer-Lambert) :

$$A=\varepsilon.\ell.C$$

Le très court trajet optique correspondant au diamètre interne du capillaire (compris entre 25 et 100 µm) explique donc le manque de sensibilité souvent constaté en CE-UV. Le trajet optique peut être augmenté de 3 à 5 fois en employant des cellules de détection UV particulières : les cellules en Z [76] ou les cellules à bulle [77] (Figure 13).

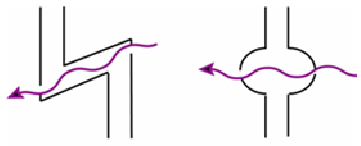



**Figure 13 :** Représentation des cellules en Z et à bulle utilisées pour améliorer la sensibilité de la détection UV.

La sensibilité obtenue en électrophorèse capillaire peut être améliorée en utilisant des techniques de détection plus sensibles telles que la fluorescence induite par laser (LIF). Les

composés liés aux armes chimiques ne possédant pas de groupement fluorophore, il est nécessaire d'adopter une démarche similaire à la détection UV en réalisant soit une détection indirecte au moyen d'un électrolyte fluorophore, soit une détection directe grâce à la dérivation des composés. Ainsi, Melanson *et al.* [78] ont réalisé une détection LIF indirecte d'acides phosphoniques en utilisant un électrolyte contenant un fluorophore (tetrakis(4-sulfophenyl)porphine) et atteint des limites de détection de 9 $ng.mL^{-1}$ dans l'eau, représentant un gain en sensibilité d'un facteur 20 environ par rapport aux meilleurs résultats obtenus avec une détection UV indirecte [69]. Jiang *et al.* ont réalisés la détection LIF directe d'acides alkylphosphoniques dérivés avec du bromure de panacyle dans du N,N-diméthylformamide pour atteindre des limites de détection comprises entre 12 et 17 $ng.mL^{-1}$ [79]. La détection par conductimétrie a aussi été testée en tant que méthode alternative à la détection UV mais conduit à une sensibilité similaire [66,67,80]. Toutes ces techniques de détection ne sont cependant pas sélectives. Kientz *et al.* ont ainsi utilisé un dispositif CE-FPD (mode P) pour réaliser la détection sélective d'acides alkylphosphoniques avec des limites de détection comprises entre 0,1 et 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ [81].

### *3.5.3 Le couplage électrophorèse capillaire–spectrométrie de masse*

Le couplage électrophorèse capillaire–spectrométrie de masse (CE-MS) est une technique en plein développement depuis une quinzaine d'années dans un large domaine d'application [82-85] dont quelques exemples sont cités dans le paragraphe I.4.3. Cette technique permet en effet de bénéficier à la fois des avantages de l'électrophorèse capillaire (efficacité, faible consommation d'échantillon, principes de séparation caractéristiques à l'électrophorèse, etc.) et des grandes capacités d'identification de la spectrométrie de masse. Toutefois, très peu d'articles rapportent l'utilisation du couplage CE-MS pour la détection de composés liés à la CIAC. Ainsi, Kostiainen *et al.* [86] ont utilisé l'électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse équipé d'une source ESI fonctionnant en mode d'ions négatifs et d'un analyseur triple quadripolaire (TQ) pour la détection d'acides alkyl méthylphosphoniques ($CH_3$-P(O)(OH)(OR)) issus de la dégradation d'agents neurotoxiques. Des limites de détection d'environ 5 $\mu g.mL^{-1}$ ont ainsi pu être obtenues en CE-MS dans l'eau pure avec un mode d'acquisition qui repose sur la détection d'ions sélectionnés (selected ion monitoring, SIM) correspondant, dans ce cas, aux ions pseudomoléculaires des composés analysés. L'analyseur ne balaye ainsi que les rapports m/z sélectionnés au lieu de balayer toute une gamme de rapports m/z ce qui permet d'augmenter significativement la sensibilité. Cette

technique n'est cependant intéressante que dans le cas de la recherche de composés connus dans un échantillon. Mercier *et al.* [87,88] ont aussi employé un dispositif CE-ESI-TQ pour détecter des acides alkyl méthylphosphoniques ($CH_3$-P(O)(OH)(OR)), alkyl éthylphosphoniques ($C_2H_5$-P(O)(OH)(OR)) et alkylphosphoniques (R-P(O)$(OH)_2$) dans l'eau pure et l'eau potable avec des limites de détection de 5 µg.mL$^{-1}$ en mode d'acquisition SIM. La réalisation d'expériences de spectrométrie de masse en tandem (ou MS-MS) en couplage avec l'électrophorèse capillaire (CE-MS-MS) a permis d'améliorer les limites de détection d'acides alkyl méthylphosphoniques à 0,1 µg.mL$^{-1}$ en utilisant le mode d'acquisition SIM permettant de ne détecter que l'ion fragment spécifique aux acides alkyl méthylphosphoniques.

### *3.5.4 Les microsystèmes [89]*

Les avancées technologiques réalisées dans le domaine de la microfluidique et de la microfabrication depuis une dizaine d'années ont permis de développer des systèmes analytiques miniaturisés (microsystèmes) utilisables pour un large domaine d'application [90]. La miniaturisation des systèmes analytiques permet de bénéficier d'une grande rapidité d'analyse, d'une très faible consommation d'échantillon, d'un haut niveau d'automatisation simplifiant l'utilisation et d'un faible coût.

Les microsystèmes sont généralement constitués d'une plaque de verre ou de polymère de quelques centimètres carrés sur laquelle des microcanaux de quelques dizaines de micromètres de côté ont été gravés par photolithographie ou par moulage dans le cas des matériaux polymériques. Une deuxième plaque plane permet de fermer les microcanaux disposés le plus souvent en forme de T ou de croix. L'électroosmose est le mode de transport des fluides le plus adapté aux microsystèmes. Il est en effet techniquement plus facile d'imposer une différence de potentiel entre deux extrémités d'un microcanal que d'appliquer une différence de pression nécessitant l'utilisation de vannes et de pompes plus difficilement miniaturisables. Pour les mêmes raisons, le mode d'injection électrocinétique (par différence de potentiel) est beaucoup plus couramment employé que le mode d'injection hydrodynamique (par pression) (Figure 14).

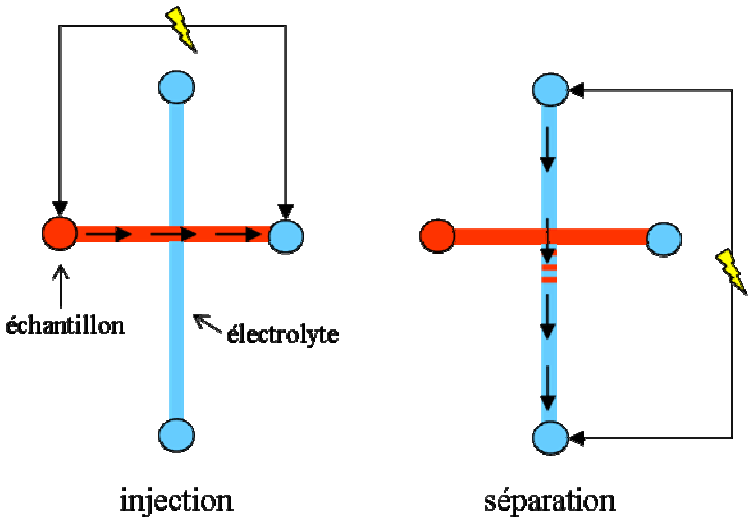



**Figure 14 :** Exemple de procédé utilisé pour l'injection et la séparation de composés dans des microsystèmes.

La majorité des microcanaux sont rectilignes mais il est possible d'utiliser des microcanaux en serpentin [91] ou en spirale [92]. Une sélectivité supplémentaire peut être introduite dans les microsystèmes de différentes manières : par fonctionnalisation de la paroi des microcanaux, par utilisation de particules, par synthèse d'un monolithe *in situ*. Les microsystèmes offrent la possibilité de coupler plusieurs étapes de l'analyse (filtration, dérivation, préconcentration, digestion enzymatique, etc.) et de réaliser des expériences bi-dimensionelles. Compte tenu des très faibles dimensions des microsystèmes, les techniques de détection par fluorescence ou par électrochimie [93-95] sont souvent préférées à la détection UV.

Les faibles dimensions et les performances analytiques des microsystèmes sont intéressantes pour les analyses de terrain. Le développement des microsystèmes pour l'analyse des composés liés à la CIAC est donc particulièrement actif [96,97]. Plusieurs articles rapportent ainsi l'utilisation de microsystèmes pour l'analyse de produits de dégradation d'agents neurotoxiques [98-101].

### 3.6 La résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique très puissante pour la détermination de structures et fournit des informations très complémentaires à celles obtenues par spectrométrie de masse. Le principe de la RMN est illustré dans la Figure 15 et permet d'observer la relaxation des moments magnétiques des noyaux.

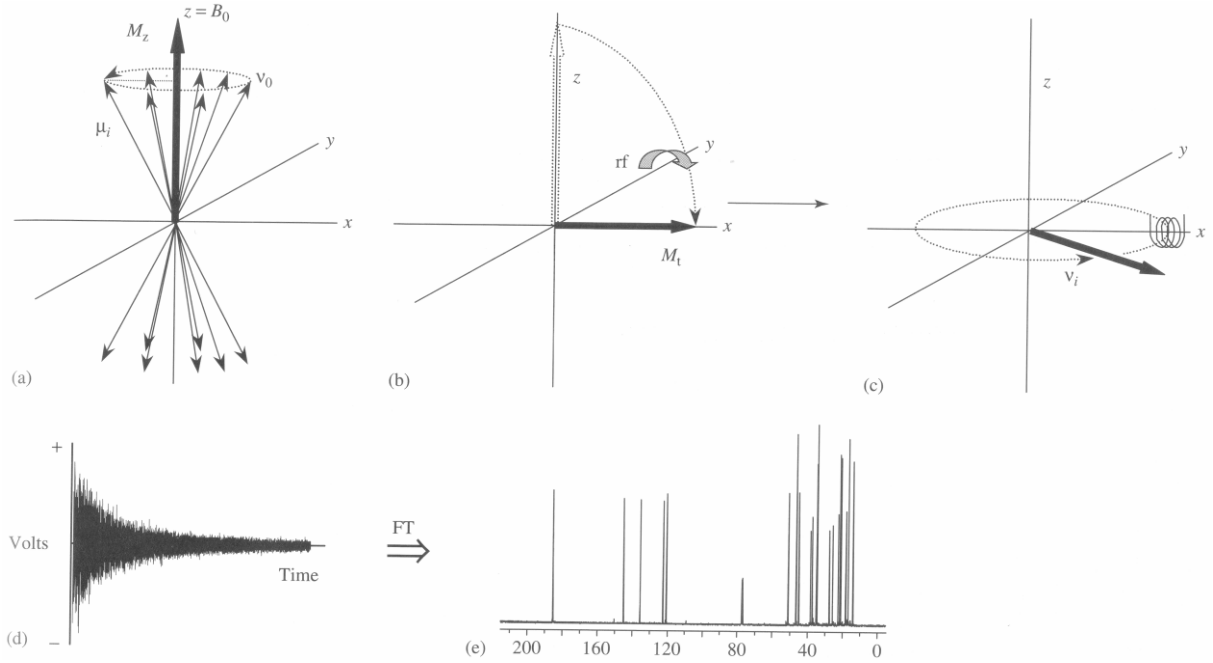



**Figure 15 :** Représentation du principe d'une expérience RMN : (a) précession des moments magnétiques individuels, $\mu_i$, à la fréquence de Larmor, $\upsilon_0$, autour du champ magnétique statique, $B_0$ (b) une impulsion radiofréquence génère le champ magnétique $B_1$, perpendiculaire à $B_0$, de fréquence $\upsilon_0$ et incline le moment magnétique net, $M_z$, pour devenir le moment $M_x$ observable (c) $M_x$ précesse ensuite autour de $B_0$ à sa fréquence spécifique $\upsilon_i$ (d) cette oscillation induit un voltage dans la bobine RMN qui est mesuré en fonction du temps (e) l'application de la transformée de Fourier permet de convertir ce signal temporel en un signal de fréquence (déplacement chimique) conduisant au spectre RMN [102].

Des séquences d'excitation plus complexes permettent de réaliser des expériences bidimensionnelles très utiles pour affiner la détermination de structure. La RMN est cependant moins utilisée que les techniques d'analyse présentées précédemment en raison de sa sensibilité limitée (généralement comprise entre 1 et 10 $\mu g.mL^{-1}$) pour la majorité des composés liés à la CIAC. Par ailleurs, le volume d'échantillon nécessaire à une analyse RMN est relativement important (500 µL au minimum) mais cette technique n'est pas destructive. Les noyaux $^{1}H$, $^{31}P$, $^{19}F$ et $^{13}C$ sont les plus couramment observés pour l'analyse des agents de guerre chimique [102]. Les expériences RMN $^{31}P$ et $^{19}F$ sont des techniques de détection sélectives, particulièrement utiles pour réaliser un criblage des agents neurotoxiques.

Le traitement des échantillons liquides nécessaire avant une analyse par RMN est simple. Pour éviter une résonance trop importante du noyau $^{1}H$, les solvants protonés sont souvent échangés avec un solvant deutéré ($CDCl_3$, $D_2O$, $CD_2Cl_2$). Lorsque l'évaporation du solvant protoné nécessaire à l'échange de solvant n'est pas désirable, le solvant deutéré peut être simplement ajouté à l'échantillon pour stabiliser le champ magnétique. Une référence de déplacement chimique doit ensuite être ajoutée à l'échantillon (tétraméthylsilane pour $^{1}H$ et $^{13}C$, $CFCl_3$ pour $^{19}F$ et triphénylphosphate pour $^{31}P$) qui est finalement filtré avant l'analyse par RMN. L'identification des composés est réalisée par comparaison avec des spectres RMN de référence. La RMN peut être utilisée lors des tests d'aptitudes imposés par l'OIAC aux laboratoires experts désignés. Dans l'avenir, l'utilisation de la RMN pour l'analyse des composés liées aux agents de guerre chimique pourrait se développer grâce aux dernières avancées technologiques telles que le couplage avec la chromatographie en phase liquide (LC-RMN) [103] ou avec la chromatographie supercritique (SFC-RMN) [104]. L'augmentation de la fréquence du champ magnétique appliqué et l'utilisation des micro-sondes et des cryosondes permettent d'améliorer la sensibilité.

# 4. La mise en œuvre du couplage électrophorèse capillaire–spectrométrie de masse

## 4.1 Les interfaces CE-ESI-MS

La source d'ionisation par électronébulisation (ESI) permet l'ionisation en phase gazeuse de composés polaires ou chargés initialement présents en solution (cf. partie 3.4.2). Cette technique d'ionisation est donc particulièrement bien adaptée à un couplage avec l'électrophorèse capillaire et constitue la source d'ionisation la plus largement employée en CE-MS. Le transfert des analytes du capillaire jusqu'à la source d'ionisation ESI est assuré par l'interface CE-MS. Cette interface doit aussi permettre d'établir le contact électrique nécessaire à la fois à l'application du champ électrique dans le capillaire de séparation et à l'application du champ électrique requis pour le processus d'électronébulisation dans la source d'ionisation. L'interface joue donc un rôle primordial dans la mise en œuvre du couplage CE-MS. Il existe trois grands types d'interface : l'interface coaxiale à liquide additionnel, l'interface à jonction liquide et l'interface sans liquide additionnel.

### *4.1.1 L'interface coaxiale à liquide additionnel*

Le débit de l'électrophorèse capillaire, correspondant à une centaine de $nL.min^{-1}$ au maximum, est insuffisant pour permettre la formation d'un nébulisat stable avec une source ESI classique. En 1989, Smith *et al.* [105] ont développé une interface CE-ESI-MS permettant de délivrer un liquide additionnel de manière concentrique au flux arrivant de l'électrophorèse capillaire, avec un débit compris entre 3 et 6 $\mu L.min^{-1}$ et compatible avec la formation d'un nébulisat stable. Une arrivée concentrique de gaz nébulisant favorise la formation du nébulisat (Figure 16). Le liquide additionnel permet par ailleurs d'assurer le contact électrique entre la pointe du capillaire de séparation et le capillaire d'introduction. Cette interface coaxiale à liquide additionnel est la plus couramment employée actuellement.

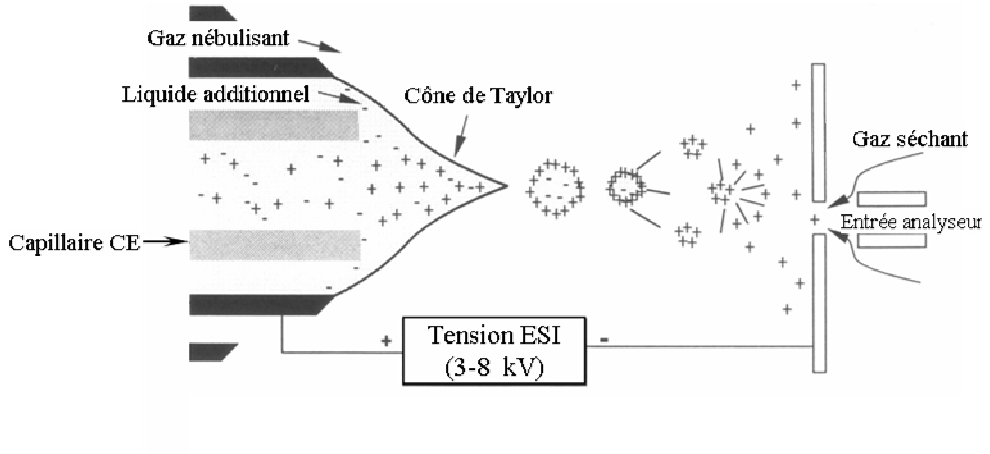



**Figure 16 :** Représentation d'une interface CE-ESI-MS coaxiale à liquide additionnel.

Il est important de noter qu'il est préférable d'utiliser des électrolytes de séparation volatils afin d'éviter des problèmes de bouchage ou de pollution de la source d'ionisation. Le choix des électrolytes de séparation utilisables en couplage CE-MS est donc assez limité. Ainsi, la majorité des applications CE-MS fait intervenir des électrolytes constitués d'anion formiate ou acétate et d'un contre-ion volatil tel que la cation ammonium.

Les propriétés physico-chimiques du liquide additionnel ont une forte influence sur l'ionisation des composés en phase gazeuse et, en conséquence, sur l'intensité du signal obtenu. Ainsi, la formation du cône de Taylor est facilitée par l'utilisation de solvants possédant une faible tension de surface. La diminution de la viscosité du solvant utilisé conduit à la diminution de la taille des premières gouttelettes formées qui est associée à une meilleure efficacité d'ionisation [106]. Le liquide additionnel est donc généralement constitué d'un solvant organique ou d'un mélange solvant organique/eau. L'ajout d'acide pour favoriser la protonation en mode d'ions positifs ou l'ajout de base pour favoriser la déprotonation en mode d'ions négatifs est souvent pratiqué.

Le débit de liquide additionnel joue aussi un rôle important sur la sensibilité. Kirby *et al.* ont ainsi réalisé des expériences montrant que l'intensité du signal diminue avec l'augmentation du débit de liquide additionnel et ont expliqué ce résultat par une augmentation de la dilution de l'échantillon [107]. Il est en effet admis que le signal obtenu en ESI dépend de la concentration et non du débit massique d'analytes pour des débits volumiques conventionnels de l'ordre de quelques $\mu L.min^{-1}$ [108]. L'augmentation du débit de liquide additionnel pourrait cependant avoir un autre effet négatif sur la sensibilité. Il a en effet été montré que le rayon des premières gouttelettes formées en ESI augmente avec le débit et conduit à une diminution de l'efficacité d'ionisation [106,108].

### *4.1.2 L'interface à jonction liquide*

En 1988, Henion *et al.* [109,110] ont développé l'interface CE-MS à jonction liquide dans laquelle le capillaire et le nébuliseur sont connectés par un petit espace de 10 à 20 µm rempli par un liquide de contact (Figure 17).

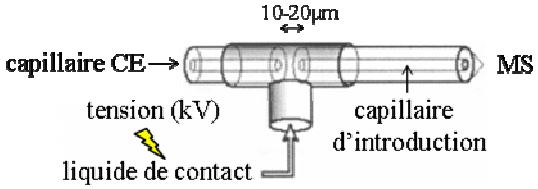



**Figure 17 :** Représentation de l'interface à jonction liquide [85].

L'interface à jonction liquide est délicate à construire, moins robuste et fournit des résultats moins reproductibles que l'interface coaxiale à liquide additionnel [111]. Une perte d'efficacité de séparation et un élargissement des pics sont souvent observés [85]. De nos jours, l'interface à jonction liquide est peu utilisée.

### *4.1.3 L'interface sans liquide additionnel (sheathless)*

L'interface sans liquide additionnel, développée en 1987 par Olivares *et al.* [112,113], permet d'éviter la dilution de l'échantillon par le liquide additionnel et implique l'utilisation de systèmes d'électronébulisation miniaturisés de types « microspray » ou « nanospray ». Ces sources fonctionnent en effet avec des débits d'environ une centaine de $nL.min^{-1}$ pour la source « microspray » et d'environ 20-40 $nL.min^{-1}$ pour la source nanospray, qui sont compatibles avec le faible débit de l'électrophorèse capillaire. La réduction du débit de solution arrivant dans la source d'ionisation nécessite la réduction du diamètre interne du capillaire d'introduction (10-20 µm pour la source « microspray » et 1-5 µm pour la source « nanospray ») ce qui permet de réduire la dispersion du nébulisat responsable d'une perte d'ions et d'améliorer ainsi la transmission des ions jusqu'à l'analyseur. La réduction du débit de solution arrivant dans la source d'ionisation conduit par ailleurs à la formation de gouttelettes de plus petites tailles associées à une meilleure efficacité d'ionisation se traduisant par une amélioration de la sensibilité [55]. Kelly *et al.* ont montré que, pour une même quantité injectée, l'interface sans liquide additionnel permet d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 par rapport à l'interface coaxiale à liquide additionnel [114]. L'établissement du contact électrique, permettant d'établir le champ électrique nécessaire à la séparation et le

champ électrique nécessaire à l'électronébulisation, constitue la principale difficulté rencontrée avec les interfaces sans liquide additionnel. Une grande variété de dispositifs a ainsi été développée [115].

Plusieurs systèmes utilisent un seul capillaire pour assurer la séparation et la nébulisation de l'échantillon. Un capillaire de séparation classique est affiné à son extrémité pour former une pointe de quelques micromètres de diamètre interne qui peut ensuite être recouverte d'un métal (or [114,116] ou argent [117,118]), de carbone [119-121] ou d'un polymère conducteur (mélange de polypropylène et de graphite [122]) pour assurer le contact électrique (Figure 18-a). Malheureusement, le manque de stabilité mécanique des dépôts conducteurs limite la durée d'utilisation de ce type d'interface à quelques heures [115]. La stabilité des dépôts métalliques peut toutefois être améliorée par l'ajout de silane [116], d'oxydes de silicium [123] ou de chrome [124] sous le dépôt. Cao *et al.* ont utilisé une fine électrode de platine (25 µm) insérée dans le capillaire à 2 cm de son extrémité (Figure 18-b) pour assurer le contact électrique [125]. La présence de l'électrode dans le capillaire engendre cependant des turbulences pouvant affecter la résolution [115].

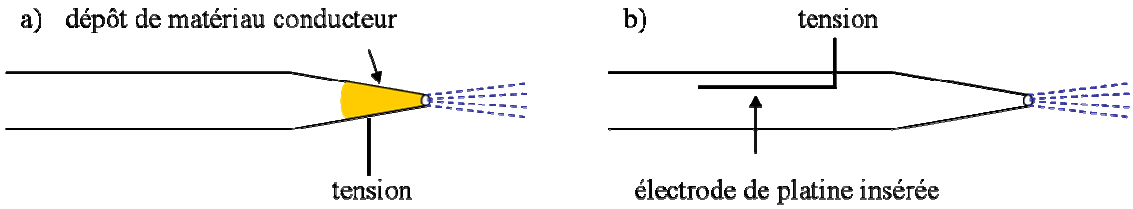



**Figure 18 :** Représentation d'interfaces sans liquide additionnel impliquant un seul capillaire où le contact électrique est assuré (a) par un dépôt de matériau conducteur à la point du capillaire ou (b) par une électrode insérée dans le capillaire.

Le contact électrique peut aussi être établi au moyen d'un fil d'or de 25 µm reliant la pointe du capillaire au nébuliseur mais ce système ne fonctionne qu'avec des capillaires de diamètre interne de 100 µm au minimum (Figure 19) [126].

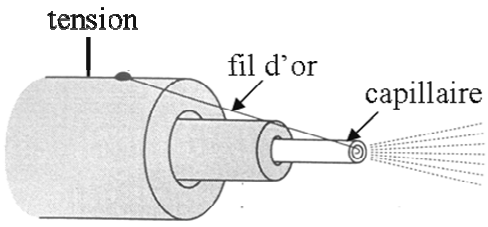



**Figure 19 :** Représentation d'une interface sans liquide additionnel impliquant un seul capillaire où le contact électrique est assuré par un fil d'or reliant la pointe du capillaire au nébuliseur [115].

Janini *et al.* ont développé une interface utilisable pendant deux semaines dans laquelle le contact électrique est assuré par une jonction de verre poreux de 3-4 mm (Figure 20) [127].

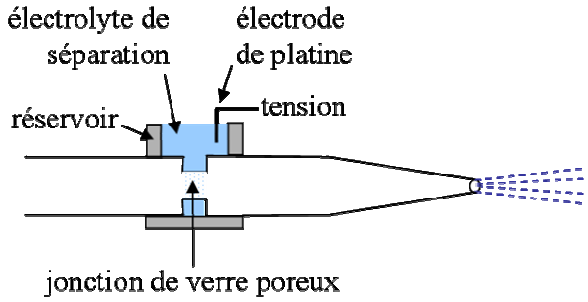



**Figure 20 :** Représentation d'une interface sans liquide additionnel impliquant un seul capillaire où le contact électrique est assuré par une jonction de verre poreux de 3-4 mm de large et située à 5 cm de la pointe du capillaire.

D'autres interfaces sans liquide additionnel utilisent deux capillaires distincts pour la séparation et la nébulisation. Les deux capillaires peuvent être reliés par un tube en acier [128], un tube de microdialyse (Figure 21) [129] ou un tube en T [130]. Cependant, la construction des interfaces à deux capillaires est très délicate : les deux capillaires doivent notamment être parfaitement alignés. La jonction entre les deux capillaires génère souvent un élargissement des pics.

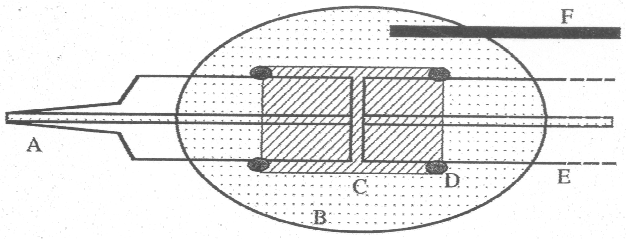



**Figure 21 :** Représentation de l'interface CE-MS à microdialyse. (A) capillaire assurant la nébulisation, (B) électrolyte de séparation, (C) tube de microdialyse (polysulfone), (D) résine époxy fixatrice, (E) capillaire de séparation, (F) générateur de haute tension [129].

D'autres systèmes utilisent trois capillaires : un pour la séparation, un pour la jonction électrique et un pour la nébulisation. Settlage *et al.* ont ainsi utilisé une jonction en verre poreux immergée dans une solution d'acide acétique 1 % [131]. Les systèmes à trois capillaires sont très délicats à construire, sont généralement peu robustes et ont une durée de vie généralement limitée à cause de la fragilité de la jonction en verre poreux.

Toutes ces interfaces sans liquide additionnel sont prometteuses mais nécessitent encore des améliorations importantes, notamment sur leur facilité de fabrication, leur robustesse et leur durée de vie.

### 4.2 Le couplage avec d'autres sources d'ionisation

Les différentes sources d'ionisation existantes présentent des propriétés souvent très complémentaires. Il est donc intéressant de développer le couplage de l'électrophorèse capillaire avec d'autres sources d'ionisation que l'électronébulisation [85]. Takada *et al.* [132] ont ainsi présenté une interface CE-APCI développée selon le principe de l'interface coaxiale à liquide additionnel. L'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI) est une technique particulièrement intéressante pour l'analyse de molécules de haute masse qui est devenue, avec l'ESI, une source d'ionisation incontournable pour l'analyse de protéines. L'échantillon à analyser est incorporé dans une matrice constituée de petites molécules organiques, présente en large excès et possédant une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Le mélange matrice-échantillon doit être déposé sur une cible MALDI. Le dépôt solide obtenu par évaporation du solvant est ensuite soumis à des irradiations laser (UV) répétées et de courte durée (quelques nanosecondes) dans la source d'ionisation où règne une pression réduite. L'irradiation laser provoque un transfert d'énergie important par excitation électronique des molécules de la matrice qui induit la désorption des ions formés par transfert de proton entre la matrice photoexcitée et les analytes. Des articles rapportent l'utilisation hors ligne de l'électrophorèse capillaire et de la source MALDI [133-136] consistant à collecter les fractions arrivant du capillaire sur une cible MALDI puis à incorporer la matrice sur la cible avant de procéder à l'analyse. Récemment, des systèmes ont été développés pour automatiser toutes les étapes de l'analyse (collecte des fractions, dépôt, incorporation de la matrice, ionisation, détection) permettant de parler de couplage CE-MALDI en ligne [137-139].

### 4.3 Les applications du couplage CE-MS

Depuis une quinzaine d'années, le couplage CE-MS est devenu une technique très complémentaire aux techniques plus classiquement couplées à la spectrométrie de masse et possède un domaine d'application très large allant de l'analyse de petits ions à l'analyse de macromolécules [82,85]. Le couplage CE-MS est ainsi très utilisé pour l'analyse des médicaments et de leurs métabolites [84,140,141] et permet la séparation de composés énantiomères [142] représentant un aspect particulièrement important de l'analyse pharmaceutique. Ainsi le couplage CE-MS a pu être utilisé pour séparer des énantiomères de différents médicaments en utilisant des sélecteurs chiraux tels que des cyclodextrines [143-147], des éthers-couronnes [148] ou de la vancomycine [149]. De nombreux articles rapportent l'utilisation du couplage CE-MS pour l'analyse de peptides et de protéines [150-153]. Les microsystèmes permettent de nos jours d'intégrer différentes étapes de l'analyse de protéines telles que la séparation ou la digestion enzymatique [154-157]. Le couplage CE-MS est aussi particulièrement intéressant pour l'analyse de métabolites polaires [158-160]. Enfin, le couplage CE-MS est très utilisé pour l'analyse des composés liés à l'ADN [161-165], des saccharides [166-169] ou pour l'analyse environnementale [170-175].

# 5. Les méthodes de préconcentration en électrophorèse capillaire

La sensibilité obtenue en électrophorèse capillaire est limitée par les très faibles volumes d'injection impliqués. Il est en effet recommandé que celui-ci ne dépasse pas 1 % du volume du capillaire pour éviter une détérioration de la forme des pics et une perte de résolution. Une grande variété de techniques de préconcentration est néanmoins utilisable en électrophorèse capillaire pour augmenter la quantité d'échantillon injectée [176-180]. Ces méthodes de préconcentration peuvent être divisées en deux grandes catégories : les techniques simplement basées sur la manipulation des phénomènes de migration électrophorétique et les techniques impliquant l'utilisation d'effets chromatographiques.

## 5.1 Les techniques de préconcentration électrophorétiques

### *5.1.1 La préconcentration et l'injection par amplification du champ électrique (FASS et FASI)*

La technique de préconcentration par amplification du champ électrique (FASS, field-amplified sample stacking) a été introduite en 1979 par Mikkers *et al.* [181]. Cette méthode de préconcentration consiste à introduire l'échantillon par injection hydrodynamique dans un capillaire rempli d'un électrolyte de séparation de plus forte conductivité que l'échantillon. Le champ électrique régnant dans une zone ($E_i$) est inversement proportionnel à sa conductivité ($\kappa_i$) :

$$E_i = \frac{j}{\kappa_i}$$

où j représente la densité de courant dans le capillaire. Les analytes migrent donc rapidement dans la zone échantillon de haut champ électrique ( $v_{ep}^i = \mu_{ep} E_i$ ) et sont ensuite fortement ralentis lorsqu'ils pénètrent dans l'électrolyte où règne un faible champ électrique. A la fin du processus de FASS, les analytes sont rassemblés dans une zone étroite et concentrée à la frontière entre la zone injectée et l'électrolyte, ce qui permet d'injecter de plus grands volumes d'échantillon (Figure 22).

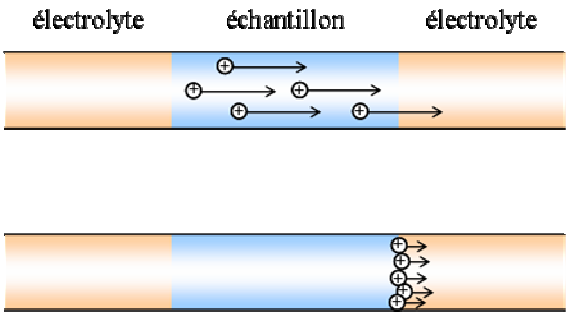



**Figure 22 :** Représentation du principe de la préconcentration par amplification de champ (FASS).

Cependant, Burgi et Chien ont montré que le volume d'injection est limité à environ 10 % du capillaire et que la différence de conductivité entre l'électrolyte et l'échantillon devait être, idéalement, d'un facteur 10 environ [182,183]. Pour des volumes d'injection ou des rapports de conductivité plus élevés, les écoulements laminaires, qui résultent de la différence de vitesse électroosmotique locale entre la zone échantillon et l'électrolyte, deviennent en effet trop importants et entraînent une détérioration de la forme des pics et une perte de résolution. Les perturbations dues aux écoulements laminaires peuvent être réduites en supprimant l'écoulement électroosmotique mais cette approche est susceptible d'augmenter la durée de l'analyse [184]. Généralement, la technique de FASS permet d'améliorer la sensibilité d'un facteur 5-10 [185].

La technique d'injection de l'échantillon par amplification du champ électrique (FASI, field-amplified sample injection) diffère de la technique FASS par le mode d'injection électrocinétique qui est employé [186]. Lors d'une injection électrocinétique, les analytes sont introduits dans le capillaire selon leur mobilité apparente par application d'une tension. Contrairement au mode d'injection hydrodynamique, la quantité d'analytes introduits par injection électrocinétique n'est pas limitée par le volume d'échantillon qui peut être injecté dans le capillaire. Cela explique pourquoi les facteurs de préconcentration obtenus en FASI sont généralement plus élevés qu'en FASS [178,187]. Cependant, le mode d'injection électrocinétique est très sensible aux variations de conductivité de l'échantillon et moins reproductible que le mode d'injection hydrodynamique. De plus, l'injection électrocinétique discrimine les analytes selon leur mobilité puisque les analytes les plus mobiles (en mobilité apparente) sont introduits en plus grande quantité dans le capillaire que les analytes les moins mobiles. Les performances de la technique FASI peuvent être améliorées en injectant, avant l'échantillon, une zone très peu conductrice généralement constituée d'eau pure pour augmenter l'amplification du champ électrique [188,189].

Les techniques FASS et FASI sont simples à mettre en œuvre mais sont limitées à la préconcentration d'analytes présents dans une matrice de faible conductivité. En effet, la préconcentration d'analytes présents dans une matrice de forte conductivité nécessite soit l'utilisation d'électrolytes très concentrés conduisant à des courants élevés et un effet Joule important qui diminue l'efficacité de séparation et la résolution, soit la dilution de l'échantillon dans un solvant organique (acétonitrile par exemple) dans lequel la conductivité de l'échantillon est réduite [190-197].

### *5.1.2 La préconcentration de grands volumes d'échantillon (LVSS)*

La technique de préconcentration de grands volumes d'échantillon (LVSS, large volume sample stacking) a été développée par Burgi et Chien et permet d'injecter un volume d'échantillon de faible conductivité pouvant représenter jusqu'à 95 % du volume du capillaire [198,199]. Un écoulement électroosmotique dirigé vers l'entrée du capillaire est généré par l'application d'une tension de polarité appropriée (Figure 23-a, 1). Les espèces de vitesses électrophorétiques opposées à la direction de l'écoulement électroosmotique sont concentrées à la frontière entre l'électrolyte et la zone échantillon tandis que la matrice est progressivement éliminée du capillaire qui se remplit d'électrolyte (Figure 23-a, 2). Cette étape se traduit par une augmentation du courant mesuré. Lorsque le courant atteint 80-95 % de la valeur mesurée quand le capillaire est totalement rempli par l'électrolyte, la polarité de la tension est inversée pour permettre la séparation des analytes préconcentrés (Figure 23-a, 3) [200].

Cette technique nécessite de suivre attentivement l'évolution du courant pour déclencher l'inversion de la polarité au moment adéquat afin d'éviter une perte d'analytes. L'inversion de polarité peut être évitée dans le cas où la mobilité électrophorétique des espèces est supérieure en valeur absolue à la mobilité électroosmotique ou en introduisant un modificateur d'écoulement électroosmotique (inverseur [201] ou suppresseur [202,203]) dans l'électrolyte (Figure 23-b). L'écoulement électroosmotique régnant dans la zone échantillon dépourvue de modificateur d'écoulement électroosmotique doit être dirigé vers l'entrée du capillaire pour permettre l'élimination de la matrice (Figure 23-b, 2). L'électrolyte, qui contient le modificateur d'écoulement électroosmotique, remplit progressivement le capillaire (Figure 23-b, 2). Lorsque la quasi-totalité du capillaire est remplie par l'électrolyte (Figure 23-b, 3), l'écoulement électroosmotique s'inverse et entraîne la migration et la séparation des analytes vers le détecteur. La technique LVSS permet donc d'augmenter la quantité d'échantillon

injectée et d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 [204] à 300 [205] par rapport à une injection hydrodynamique classique. Cependant, seuls des anions ou des cations peuvent être efficacement préconcentrés durant une même analyse.

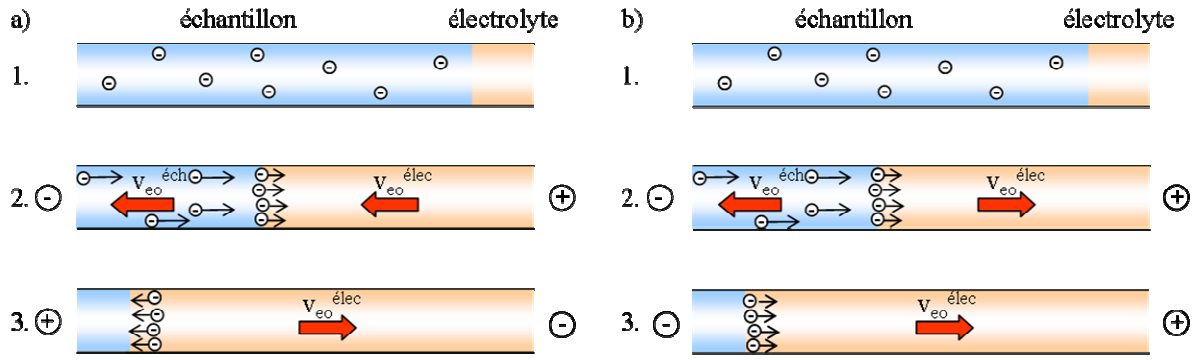



**Figure 23 :** Représentation du principe de la technique LVSS a) avec inversion de polarité : 1. un grand volume d'échantillon est injecté par pression 2. une tension de polarité négative est appliquée, la zone échantillon migre vers l'entrée du capillaire, les analytes sont concentrés à la frontière entre l'échantillon et l'électrolyte, la matrice est éliminée 3. lorsque le courant atteint la valeur optimale, la polarité est inversée et les analytes sont séparés ; b) sans inversion de polarité : 1. un grand volume d'échantillon est injecté par pression, 2. une tension de polarité négative est appliquée, la zone échantillon migre vers l'entrée du capillaire, les analytes sont concentrés à la frontière entre l'échantillon et l'électrolyte, la matrice est éliminée 3. lorsque le courant atteint la valeur optimale, les analytes migrent vers le détecteur et sont séparés.

### *5.1.3 La préconcentration par médiation du pH (pH mediated)*

La méthode de préconcentration par médiation du pH (pH mediated) permet de préconcentrer des analytes contenus dans des matrices de conductivité élevée [206-208]. Le principe de cette technique pour la préconcentration d'anions est illustrée en Figure 24. L'échantillon est introduit par injection électrocinétique dans un électrolyte contenant des ions ammonium. Les cations contenus dans l'échantillon ($Na^+$ par exemple) sont alors remplacés par les cations ammonium de l'électrolyte. Des ions hydroxyde (base forte très mobile) sont ensuite introduits par injection électrocinétique. Ces ions migrent très rapidement à travers la zone échantillon et neutralisent les ions ammonium ce qui permet de réduire fortement la conductivité de l'échantillon. La préconcentration par amplification du champ électrique peut alors avoir lieu. Le même principe peut être appliqué à la préconcentration de cations en utilisant un électrolyte composé de la base conjuguée d'un acide faible (acide acétique par exemple), puis une solution d'acide fort contenant des ions $H^+$ très mobiles (HCl par exemple). Les zones d'échantillon et de solution utilisée pour la neutralisation représentent souvent un volume important du capillaire. La longueur de

capillaire disponible pour la séparation est alors réduite, ce qui peut conduire à une perte de résolution. Des facteurs de concentration jusqu'à 100 fois [208] peuvent être obtenus.

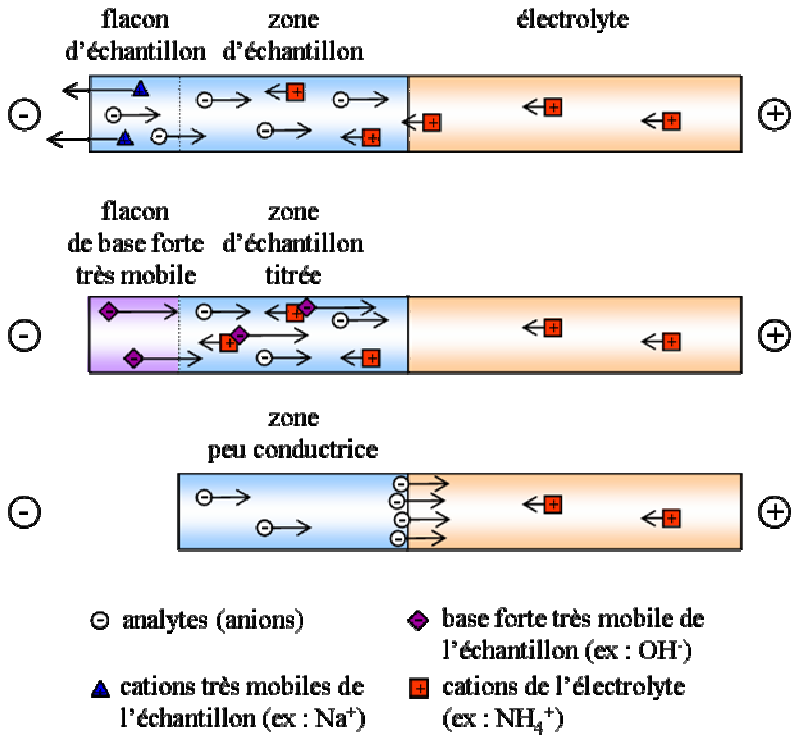



**Figure 24 :** Représentation du principe de la préconcentration d'anions par médiation du pH.

### *5.1.4 L'isotachophorèse (ITP) [209,210]*

L'isotachophorèse (ITP) permet de préconcentrer des composés, même lorsqu'ils sont présents dans des matrices de forte conductivité (eau de mer [211-213], urine [214-217], sérum [214,218,219], plasma [215] etc.). Contrairement à l'électrophorèse capillaire classique (ou CZE, capillary zone electrophoresis), l'isotachophorèse se déroule dans un milieu de séparation discontinu constitué d'un électrolyte meneur et d'un électrolyte terminal qui contiennent un ion meneur et un ion terminal respectivement. Les ions meneur et terminal doivent avoir une mobilité électrophorétique respectivement supérieure et inférieure à celles des analytes à préconcentrer et doivent posséder une charge de même signe que celle des analytes. Lorsque la tension est appliquée, les analytes commencent à se répartir en zones ordonnées selon leur mobilité (état transitoire, Figure 25). Lorsque l'état stationnaire de l'ITP est atteint, les zones d'analytes sont distinctes et migrent toutes à la même vitesse $v_{ITP}=\mu_M E_M=\mu_l E_l=\mu_k E_k=\mu_j E_j=\mu_T E_T$. Les champs électriques locaux diminuent de zone en zone depuis la zone d'ion terminal jusqu'à la zone d'ion meneur (Figure 25).

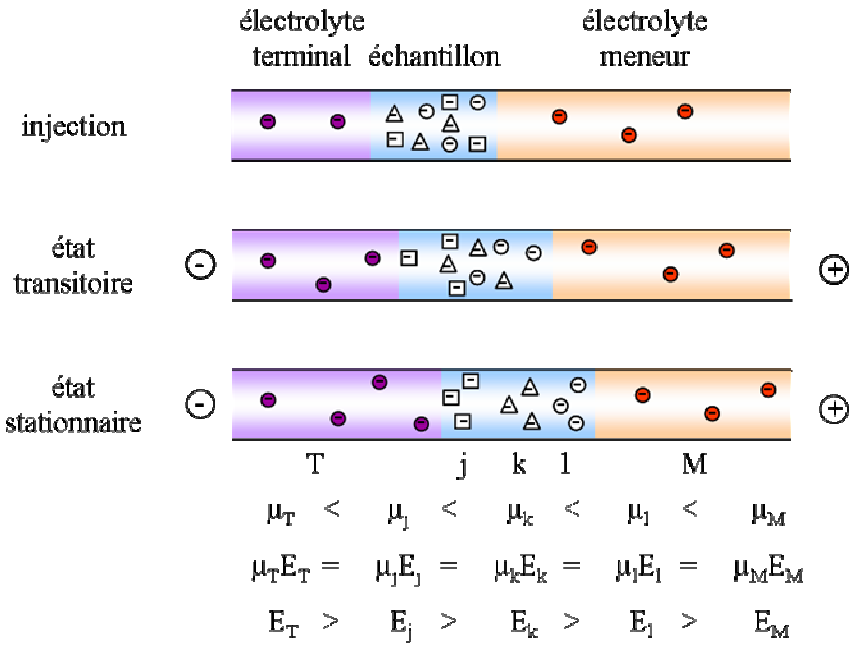



**Figure 25 :** Représentation du principe de l'isotachophorèse.

La concentration d'un analyte i qui est atteinte à l'état stationnaire ($[i]_{stat}$) est fixée par la concentration de l'ion meneur ([M]) selon la relation suivante [220]:

$$[i]_{stat} = [M]\frac{\mu_i\,(\mu_M + \mu_C)}{\mu_M\,(\mu_i + \mu_C)}$$

où $\mu_i$, $\mu_M$ et $\mu_C$ correspondent, respectivement, aux mobilités (en valeurs absolues) de l'analyte i, de l'ion meneur M et du contre-ion de l'ion meneur C. La longueur de la zone d'analyte i de concentration ajustée à $[i]_{stat}$ dépend de la quantité d'analyte injectée. Contrairement aux expériences réalisées en CZE, les zones d'analyte obtenues en ITP ne sont pas séparées par des zones d'électrolyte. Les zones d'analytes sont donc adjacentes et détectées sous forme de créneaux dont la longueur est proportionnelle à la quantité d'analyte injectée. Les facteurs de concentration obtenus en ITP peuvent être très importants mais l'ITP permet de ne préconcentrer que des anions ou que des cations pendant une analyse.

L'étape de préconcentration par ITP peut être suivie d'une étape de séparation par CZE en utilisant un système à deux capillaires couplés (cITP-CZE, combined isotachophoresis-capillary zone electrophoresis) ou en utilisant un seul capillaire. Dans les systèmes à deux capillaires, un capillaire de préconcentration de diamètre interne important (200-500 µm) permettant d'injecter un grand volume d'échantillon est couplé à un capillaire de séparation de dimensions classiques au moyen d'une pièce en T. L'échantillon est injecté dans le

capillaire de préconcentration entre les électrolytes meneur et terminal, puis préconcentré par ITP. Les zones d'échantillon concentrées sont ensuite transférées à l'entrée du deuxième capillaire rempli par l'électrolyte de séparation. Le premier capillaire est vidé puis rempli par l'électrolyte de séparation pour permettre la séparation des composés en CZE. Trois cas de figures sont alors possibles [221] :

- l'électrolyte de séparation, l'électrolyte meneur et l'électrolyte terminal sont distincts comme dans le cas représenté en Figure 26.
- l'électrolyte meneur est utilisé comme électrolyte de séparation.
- l'électrolyte terminal est utilisé comme électrolyte de séparation.

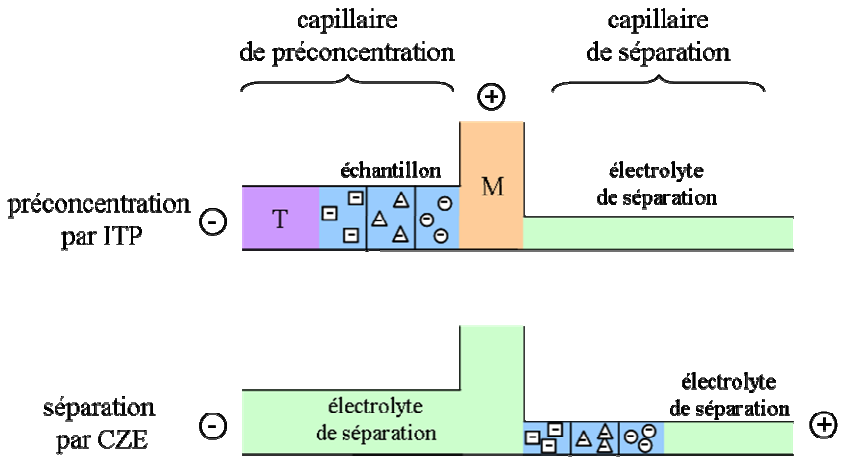



**Figure 26** : Représentation d'une expérience de cITP-CZE : cas où l'électrolyte de séparation, l'électrolyte meneur et l'électrolyte terminal sont distincts.

Les étapes d'ITP et de CZE peuvent aussi être réalisées dans un seul capillaire où le mode de migration par ITP est progressivement remplacé par un mode de migration par CZE : on parle alors d'isotachophorèse transitoire (tITP, transient isotachophoresis). Ce dispositif est beaucoup plus simple à mettre en œuvre que le système à deux capillaires puisqu'il peut être réalisé avec n'importe quel instrument commercial sans modification. La Figure 27 présente les différentes étapes d'une expérience tITP-CZE où l'échantillon est injecté dans un capillaire rempli avec l'électrolyte de séparation qui est aussi utilisé comme électrolyte meneur. L'électrolyte terminal est ensuite injecté, puis l'entrée du capillaire est plongée dans l'électrolyte de séparation (électrolyte meneur). Après l'application de la tension, les analytes sont préconcentrés par tITP. L'interface entre l'électrolyte terminal et l'électrolyte meneur devient diffuse, et l'électrolyte meneur pénètre progressivement dans la zone d'électrolyte terminal. Lorsque les ions meneurs rattrapent les analytes, le mode ITP permettant la

préconcentration cesse pour laisser place au mode CZE qui assure la séparation des composés. Une expérience de tITP-CZE peut aussi être réalisée avec un électrolyte de séparation utilisé comme électrolyte terminal et un électrolyte meneur injecté devant la zone échantillon. Il est aussi possible d'utiliser une espèce présente naturellement dans l'échantillon ou introduite volontairement en tant qu'ion meneur ou ion terminal.

En raison de la plus faible quantité d'échantillon injectée, la sensibilité obtenue en tITP-CZE (avec un seul capillaire) est plus faible que celle obtenue en cITP-CZE (avec deux capillaires couplés) [222] : des facteurs de concentration compris entre 2 [213] et 400 environ [209] sont rapportés en tITP-CZE et peuvent aller jusqu'à 10000 en cITP-CZE [223]. La technique tITP-CZE est cependant beaucoup plus simple à mettre en œuvre.

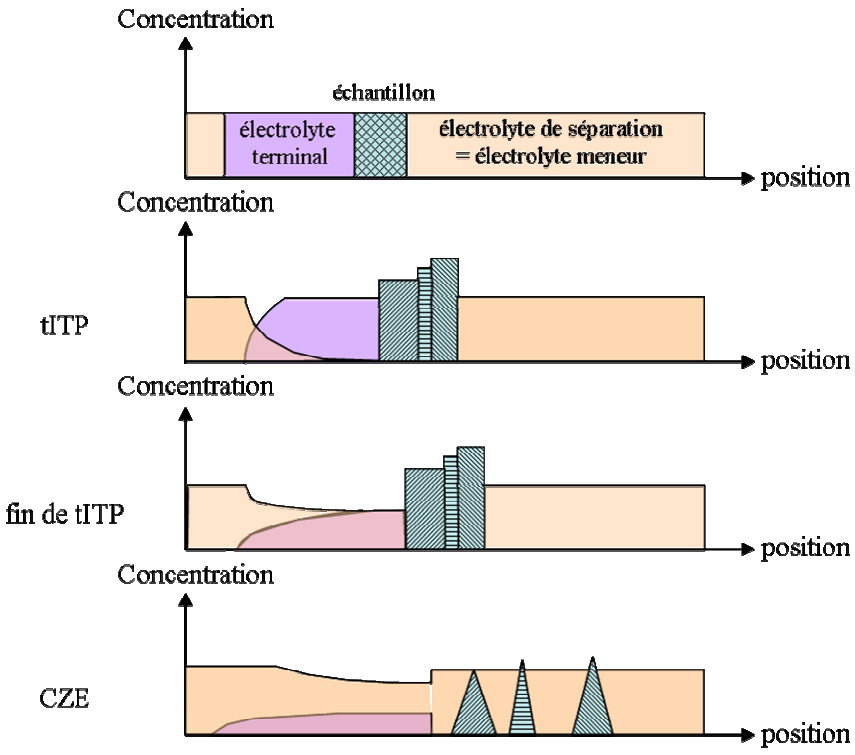



**Figure 27 :** Représentation des différentes étapes de tITP-CZE réalisée dans un seul capillaire.

## 5.2 Les techniques de préconcentration chromatographiques

La préconcentration des analytes peut aussi être assurée par des méthodes chromatographiques telles que l'extraction sur phase solide (SPE) ou sur membrane (mPC) [224,225]. Ces techniques permettent d'injecter de très grands volumes d'échantillon et d'éliminer les composés issus de la matrice qui ne sont pas retenus sur la phase stationnaire, ce qui peut être particulièrement intéressant pour l'analyse d'échantillons biologiques riches en interférents (sels, protéines, etc.). Une technique différente, appelée préconcentration par balayage (sweeping), repose sur l'extraction des analytes par une pseudo-phase constituée de micelles de tensioactif qui migrent rapidement.

### *5.2.1 L'extraction sur phase solide (SPE)*

La préconcentration de l'échantillon par extraction sur phase solide (SPE) peut être réalisée en ligne avant une séparation par électrophorèse capillaire [226]. Les phases stationnaires apolaires de type silice greffée ($C_8$ ou $C_{18}$) sont les plus couramment employées. Un volume important d'échantillon est introduit par injection hydrodynamique. Les composés de l'échantillon qui ne sont pas retenus sur la phase stationnaire peuvent être éliminés par un rinçage avec l'électrolyte de séparation. Les analytes retenus sur la phase stationnaire sont élués au moyen d'un solvant organique jusqu'à l'entrée du capillaire de séparation rempli par l'électrolyte de séparation. La tension est alors appliquée pour permettre la séparation des composés. La phase stationnaire peut être insérée sur une courte section (quelques millimètres) d'un capillaire couplé au capillaire de séparation [227-229]. De plus grands facteurs de préconcentration peuvent être obtenus en utilisant un capillaire greffé avec la phase stationnaire sur une longueur de 20 cm [230]. Ces méthodes permettent d'augmenter la quantité d'analytes injectée dans le capillaire mais altèrent les performances de séparation par électrophorèse capillaire. En effet, la présence de la phase stationnaire et l'utilisation d'un solvant organique pour éluer les composés peuvent fortement perturber les écoulements électroosmotiques, ce qui peut conduire à une mauvaise reproductibilité des temps de migration et à un élargissement des pics [224,225]. Par ailleurs, la préparation de ces dispositifs non commerciaux est délicate.

### *5.2.2 La préconcentration sur membrane (mPC)*

La section de capillaire contenant la phase stationnaire, qui est utilisée pour la préconcentration SPE, peut être remplacée par une fine membrane de polymère imprégnée d'une phase stationnaire (Figure 28). La préconcentration sur membrane (mPC) procure une grande capacité d'adsorption et permet de diminuer le volume de solvant organique utilisé pour éluer les composés. La reproductibilité des temps de migration est ainsi améliorée [224,225,231,232].

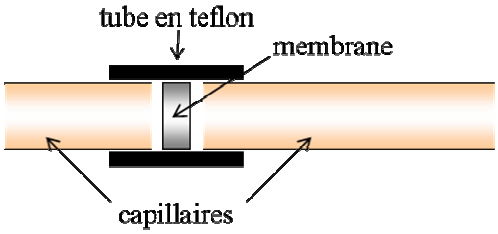



**Figure 28 :** Représentation d'un dispositif de préconcentration sur membrane.

### *5.2.3 La préconcentration par balayage (sweeping)*

Cette technique repose sur l'extraction et l'accumulation des analytes dans une pseudo-phase constituée de micelles de tensioactif qui traverse la zone échantillon dépourvue de micelle (Figure 29) [233,234]. Les facteurs de préconcentration dépendent de l'affinité des analytes pour les micelles [235-239]. Quirino *et al* ont ainsi rapporté un facteur de préconcentration supérieur à 5000 en utilisant cette technique [233]. Différentes configurations d'expériences de préconcentration par balayage sont réalisables selon la charge des analytes, la charge des micelles, la présence ou l'absence d'écoulement électroosmotique. Ce principe peut aussi être utilisé avec des agents complexants ou des molécules de haute affinité pour les analytes.

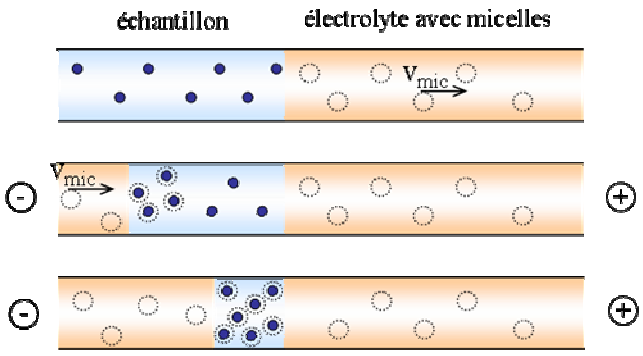



**Figure 29 :** Représentation d'une expérience de préconcentration par balayage dans le cas d'analytes neutres et d'un électrolyte composé de micelles de tensioactif anionique migrant à la vitesse $v_{mic}$.

## 6. Références

[1] R.E. Langford, *Introduction to weapons of mass destruction*, Wiley, Hoboken, 2004.

[2] O. Lepick, *Que sais-je ? Les armes chimiques*, Puf, Paris 1999.

[3] O. Lepick, *La Grande Guerre Chimique 1914-1918*, Puf, Paris 1998.

[4] http://www.opcw.org/ (dernière mise à jour : 7 Mars 2007).

[5] M. Mesilaakso, M. Rautio, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 899-909, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[6] Défense B. et C., *Journées nationales science et défense*, Avril 1983, Ecole Polytechnique

[7] Thèse de doctorat de S. Salle, *Absorption et toxicité cutanées de l'ypérite. Prévalidation d'un modèle ex vivo d'étude de la pénétration percutanée*, Lyon : Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques, 13 Octobre 2006.

[8] Thèse de doctorat de Y. Trescoc, *Absorption percutanée des composes organophosphorés : méthodes et modèles d'études. Application à des simili des agents neurotoxiques de guerre*, Lyon : Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques, 20 Octobre 2005.

[9] J. Patočka, L. Středa, *Acta Medica* 49 (2006) 3-11.

[10] R.J. Cole, R.H. Cox, *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York 1981.

[11] J.M Madsen, *Encyclopedia of Toxicology, 2nd edition*, pp. 273-279, Ed. P. Wexler, Academic Press, New York 2005.

[12] C.-C. Hsueh, Y. Liu, M.S. Freund, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4075-4080.

[13] H. Bigalke, A. Rummel, *Toxicology* 214 (2005) 210-220.

[14] *Seafood and freshwater toxins*, Ed. L.M. Botana, Marcel Dekker, New York 2000.

[15] D.R. Franz, *Medical aspects of chemical and biological warfare* 30 (1997) 603-19.

[16] R Crompton, D. Gall, *Med. Leg. J.* 48 (1980) 51-62.

[17] M.S. Nieuwenhuizen, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 923-940, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[18] T. de Revel, *Menace terroriste approche médicale : Nucléaire, Radiologique, Biologique, Chimique*, John Libbey Eurotext, Montrouge 2006.

[19] *Connaissance et entretien des matériels (TTA 150 Titre 17)*, Ministère de la défense-Etat major de l'armée de terre-Cofat, 2001.

[20] D.B. Cooper, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1071-1083, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[21] G.A. Eiceman, Z. Karpas, *Ion Mobility Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton 1994.

[22] W.E. Steiner, B.H. Clowers, L.M. Matz, W.F. Siems, H.H. Hill Jr., *Anal. Chem.* 74 (2002) 4343-4352.

[23] G. Reid Asbury, C. Wu, W.F. Siems, H.H. Hill Jr., *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 273-283.

[24] V.M.A. Häkkinen, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1001-1007, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[25] G.L. Hook, C. Jackson Lepage, S.I. Miller, P.A. Smith, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1017-1022.

[26] M.T. Söderström, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 943-963, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[27] R. Kostiainen, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 963-979, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[28] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 177-200.

[29] B. Papoušková, P Bednář, P.Barták, P. Fryčák, J.Sevčik, Z. Stránský, K. Lemr, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1531-1538.

[30] J.M. Halket, V.G. Zaikin, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 1-21.

[31] V.G. Zaikin, J.M. Halket, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 421-434.

[32] V.G. Zaikin, J.M. Halket, *Eur. J. Mass Spectrom.* 10 (2004) 555-568.

[33] J.M. Halket, V.G. Zaikin, *Eur. J. Mass Spectrom.* 11 (2005) 127-160.

[34] R.M. Black, B. Muir, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 253-281.

[35] Y. Juillet, E. Gibert, A. Bégos, B. Bellier, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 848-856.

[36] P.L. Wylie, J.J. Sullivan, B.D. Quimby, *J. High. Res. Chromatogr*. 13 (1990) 499-506.

[37] E.R.J. Wils, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 979-1001, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[38] J.R. Stuff, R.L. Cheicante, K.M. Morrissey, H. Dupont Durst, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 87-92.

[39] J. Riches, I. Morton, R.W. Read, R.M. Black, *J. Chromatogr. B* 816 (2005) 251-258.

[40] D.K. Rohrbaugh, *J. Chromatogr. A* 809 (1998) 131-139.

[41] E. de Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse, 2ème édition*, Dunod, Paris 1999.

[42] R.M. Black, R.W. Read, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1007-1025, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[43] J.-P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 197-207.

[44] E.W.J. Hooijschuur, Ch. E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 165-172.

[45] E.W.J. Hooijschuur, Ch. E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 187-199.

[46] P.A. D'Agostino, L.R. Provost, J.R. Hancock, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 177-184.

[47] P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, C.L. Chenier, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 97-105.

[48] P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, L.R. Provost, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 289-294.

[49] P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, L.R. Provost, *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 93-105.

[50] J.R. Hancock, P.A. D'Agostino, *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 71-82.

[51] J. Carol, M.C.J.K. Gorseling, C.F. de Jong, H. Lingeman, C.E. Kientz, B.L.M. van Baar, H. Irth, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 150-157.

[52] J. Meriluoto, *Anal. Chim. Acta* 352 (1997) 277-298.

[53] T. Tuomi, L. Saarinen, K. Reijula, *The Analyst* 123 (1998) 1835-1841.

[54] G.I. Taylor, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 280 (1964) 383-397.

[55] M.A. Tarr, J. Zhu, R.B. Cole, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 11597-11630, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[56] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobbey, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.* 52 (1970) 4977-4986.

[57] J.V. Iribarne, B.A. Thomson, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287-2289.

[58] C.A. Boulet, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 909-923, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[59] R.L. Cheicante, J.R. Stuff, H.D. Durst, *J. Cap. Elec.* 2 (1995) 157-163.

[60] R.L. Cheicante, J.R. Stuff, H.D. Durst, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 347-352.

[61] K. Otsuka, S. Terabe, *Capillary Electrophoresis Guidebook*, pp. 125-155, Ed. K.D. Altria, Humana Press, Totowa 1996.

[62] G.A. Pianetti, M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, *J. Chromatogr.* 630 (1993) 371-377.

[63] S.A. Oehrle, P.C. Bossle, *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 247-252.

[64] J.-P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 279-285.

[65] J.-P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 245-252.

[66] A.E.F.Nassar, S.V. Lucas, C.A. Myler, A.R. Jones, M. Campisano, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3598-3604.

[67] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, A.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1085-1091.

[68] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1285-1292.

[69] J.E. Melanson, B.L.Y. Wong, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 920 (2001) 359-365.

[70] M. Zi-Hui, L. Qin, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 121-127.

[71] W.H. Robins, B.W. Wright, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 667-673.

[72] P. Thibault, S. Pleasance, M.M. Laycock, *J. Chromatogr.* 542 (1991) 483-501.

[73] C.J. Sciacchitano, B. Mopper, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 2081-2088.

[74] H.B. Hines, E.E. Brueggemann, *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 199-208.

[75] H. Siren, M. Jussila, H. Liu, S. Peltonieme, K. Sivonen, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 203-215.

[76] S.R. Moring, C. Pairaud, M. Albin, S. Locke, P. Thibault, G.W. Tindall, *Am. Lab.* (1993) 32-32.

[77] D.N. Heiger, P. Kaltenbach, H.-J.P. Sievert, *Electrophoresis* 15 (1994) 1234-1247.

[78] J.E. Melanson, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1809-1813.

[79] J. Jiang, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 239-244.

[80] T.E. Rosso, P.C. Bossle, *J. Chromatogr. A* 824 (1998) 125-134.

[81] C.E. Kientz, E.W.J. Hooijschuur, U.A.Th. Brinkman, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997) 253-259.

[82] Special Issue: Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry, *Electrophoresis* 28 (2007) 1303-1473.

[83] A. von Brocke, G. Nicholson, E. Bayer, *Electrophoresis* 22 (2001) 1251-1266.

[84] W.F. Smyth, *Electrophoresis* 26 (2005) 1334-1357.

[85] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3837-3867.

[86] R. Kostiainen, A.P. Bruins,V.W.A. Häkkinen, *J. Chromatogr.* 634 (1993) 113-118.

[87] J.-P. Mercier, P. Chaimbault, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 71-80.

[88] J.-P. Mercier, P. Morin, M. Dreux, *Chimia* 53 (1999) 511-514.

[89] N. Delaunay-Bertoncini, M. Blas, J.-L. Rocca, *Spectra Analyse* 243 (2005) 31-36.

[90] V. Dolnik, S. Liu, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1994-2009.

[91] A.W. Moore, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4184-4189.

[92] C.T. Culbertson, S.C Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5814-5819.

[93] J.-J. Xu, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 125-132.

[94] M. Pumera, J. Wang, F. Opekar, I. Jelinek, J. Feldman, H. Löwe, S. Hardt, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1968-1971.

[95] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5774-5778.

[96] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 3-10.

[97] M. Pumera, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 5-13.

[98] J. Wang, M. Pumera, G.E. Collins, A. Mulchandani, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6121-6125.

[99] J. Wang, G. Chen, A. Muck Jr., G.E. Collins, *Electrophoresis* 24 (2003) 3728-3734.

[100] J. Wang, J. Zima, N.S. Lawrence, M.P. Vhatrathi, A. Mulchandani, G.E. Collins, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4721-4726.

[101] V. Heleg-Shabtai, N. Gratziany, Z. Liron, *Electrophoresis* 27 (2006) 1996-2001.

[102] M. Mesilaakso, A. Niederhauser, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1026-1055, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[103] M. Godejohann, A. Preiss, C. Mügge, G. Wünsch, *Anal. Chem*. 69 (1997) 3832-3837.

[104] U. Braumann, H. Händel, K. Albert, R. Ecker, M. Spraul, *Anal. Chem.* 67 (1995) 930-935.

[105] R.D. Smith, C.J. Barinaga, H.R. Udseth, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948-1952.

[106] R.B. Cole, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000)763-772.

[107] D.P. Kirby, J.M. Thorne, W.K. Götzinger, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4451-4457.

[108] A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345-357.

[109] E.D. Lee, W. Muck, J.D. Henion, T.R. Covey, *J. Chromatogr.* 458 (1988) 313-321.

[110] E.D. Lee, W. Muck, J.D. Henion, T.R. Covey, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18 (1989) 844-850.

[111] S. Pleasance, P. Thibault, J. Kelly, *J. Chromatogr.* 591 (1992) 325-339.

[112] J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.

[113] R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, H.R. Udseth, *Anal. Chem.* 60 (1988) 436-441.

[114] J.F. Kelly, L. Ramaley, P. Thibault, *Anal. Chem.* 69 (1997) 51-60.

[115] H.J. Issaq, G.M. Janini, K.C. Chan, T.D. Veenstra, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 37-42.

[116] M. Scott Kriger, K.D. Cook, R.S. Ramsey, *Anal. Chem.* 67 (1995) 385-389.

[117] Y.-R. Chen, G.-R. Her, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 437-441.

[118] J.H. Wahl, D.C. Gale, R.D. Smith, *J. Chromatogr. A* 659 (1994) 217-222.

[119] S. Nilsson, M. Wetterhall, J. Bergquist, L. Nyholm, K.E. Markides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1997-2000.

[120] Y.Z. Chang, G.R. Her, *Anal.Chem*. 72 (2000) 626-630.

[121] Y.Z. Chang, G.R. Her, *Anal.Chem*. 73 (2001) 5083-5087.

[122] M. Wetterhall, S. Nilsson, K.E. Markides, J. Bergquist, *Anal. Chem*. 74 (2002) 239-245.

[123] G.A. Valaskovic, F.W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 1270-1272.

[124] D.R. Barnidge, S. Nilsson, K.E. Markides, H. Rapp, K. Hjort, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 994-1002.

[125] P. Cao, M. Moini, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8 (1997) 561-564.

[126] L. Fang, R. Zhang, E.R. Williams, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3696-3701.

[127] G.M. Janini, T.P. Conrads, K.L. Wilkens, H.J. Issaq, T.D. Veenstra, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1615-1619.

[128] D. Figeys, A. Ducret, J.R. Yates, R. Aebersold, *Nat. Biotech.* 14 (1996) 1579-1583.

[129] J.C. Severs, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2154-2158.

[130] W. Tong, A. Link, J.K. Eng, J.R. Yates, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2270-2278.

[131] R.E. Settlage, P.R. Russo, J. Shabaniwitz, D.F. Hunt, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 281-285.

[132] Y. Takada, M. Salairi, H. Koizumi, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1474-1476.

[133] S.I. Snovida, V.C. Chen, O. Krokhin, H. Perreault, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6556-6563.

[134] D.H. Na, C.K. Cho, Y.S. Youn, Y. Choi, K.R. Lee, S.D. Yoo, K.C. Lee, *Toxicon* 43 (2004) 329-335.

[135] S. McLeod, J. Axelsson, R. Self, P.J. Derrick, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 214-218.

[136] T. Johnson, J. Bergquist, R. Ekman, E. Nordhoff, M. Schürenberg, K.-D. Klöppel, M. Müller, H. Lehrach, J. Gobom, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1670-1675.

[137] H.K. Musyimi, D.A. Narcisse, X. Zhang, W. Stryjewski, S.A. Soper, K.K. Muray, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5968-5973.

[138] J. Preisler, F. Foret, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5278-5287.

[139] H. Ornes, T. Graf, H. Degn, K.K. Murray, *Anal. Chem.* 72 (2000) 251-254.

[140] A.J. Tomlinson, L.M. Benson, S. Jameson, D.H. Johnson, S. Naylor, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8 (1997) 15-24.

[141] S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 23 (2002) 442-448.

[142] S.A. Shamsi, *Electrophoresis* 23 (2002) 4036-4051.

[143] S. Grard, Ph. Morin, M. Dreux, J.P. Ribet, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 3-10.

[144] S. Rudaz, S. Cherkaoui, P. Dayer, S. Fanali, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 295-303.

[145] Y. Tanaka, Y. Kishimoto, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 83-88.

[146] A.M. Jäverfalk, A. Amini, D. Westerlund, P.E. Andrén, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 183-186.

[147] S. Rudaz, E. Calleri, L. Geiser, S. Cherkaoui, J. Prat, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 24 (2003) 263-2641.

[148] Y. Tanaka, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 323-330.

[149] S. Fanali, C. Desiderio, G. Schulte, S. Heitmeier, D. Strickmann, D. Chankvetadze, G. Blaschke, *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 69-76.

[150] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Electrophoresis* 28 (2007) 1319-1326.

[151] M. Pelzing, C. Neusüβ, *Electrophoresis* 26 (2005) 2717-2728.

[152] A.J. Tomlinson, S. Naylor, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 5674-5699, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[153] M. Herold, G.A. Ross, R. Grimm, D.N. Heiger, *Capillary Electrophoresis Guidebook*, pp. 285-308, Ed. K.D. Altria, Humana Press, Totowa 1996.

[154] T. Laurell, G. Marko-Varga, S. Ekström, M. Bengtsson, J. Nilsson, *J. Biotechnol*. 82 (2001) 161-175.

[155] J. Li, J.F. Kelly, I. Chernushevich, D.J. Harrison, P. Thibault, *Anal. Chem.* 72 (2000) 599-609.

[156] B. Zhang, F. Foret, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1015-1022.

[157] R.M. Schoenherr, M. Ye, M. Vannatta, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2230-2238.

[158] R. Ramautar, A. Demirci, G.J. de Jong, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 455-466.

[159] K.B. Elgstoen, J.Y. Zhao, J.F. Anacleto, E. Jellum, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 265-275.

[160] T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Narakoa, M. Tomita, T. Nishioka, *J. Proteom. Res.* 2 (2003) 488-494.

[161] D.L.D. Deforce, F. Lemière, E.L. Esmans, A. De Leenheer, E.G. Van de Eeckhout, *Anal. Biochem.* 258 (1998) 331-338.

[162] J. Ding, T. Barlow, A. Dipple, P. Vouros, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 823-829.

[163] Y.-L. Feng, J. Zhu, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6608-6613.

[164] D.L.D. Deforce, F.P.K. Ryniers, E.G. Van den Eeckhout, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3575-3584.

[165] S.M. Wolf, P. Vouros, *Anal. Chem.* 67 (1995) 891-900.

[166] J. Li, P. Thibault, A. Martin, J.C. Richards, W.W. Wakarchuk, W. Van der Wilp, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 325-336.

[167] S. Auriola, P. Thibault, I. Sadovskaya, E. Altmann, *Electrophoresis* 19 (1998) 2665-2676.

[168] D.-D. Ju, C.-C. Lai, G.-R. Her, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 195-203.

[169] G. Tuffal, A. Tuong, C. Dhers, F. Uzabiaga, M. Riviere, C. Picard, G. Puzo, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1853-1858.

[170] G.W. Sovocool, W.C. Brumley, J.R. Donnelly, *Electrophoresis* 20 (1999) 3297-3310.

[171] K. Otsuka, C.J. Smith, J. Grainger, J.R. Barr, D.G. Patterson Jr., N. Tanaka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 75-81.

[172] I.M. Lazar, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 117-123.

[173] X. Song, W.L. Budde, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 327-340.

[174] C.-Y. Tsai, Y.-R. Chen, G.-R. Her, *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 379-386.

[175] S. Duteil, P. Gareil, S. Girault, A. Mallet, C. Feve, L. Siret, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1889-1898.

[176] Z. Malá, L. Křivánková, P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 28 (2007) 243-253.

[177] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768-2779.

[178] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 119-135.

[179] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466-485.

[180] M.C. Breadmore, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 22 (2001) 2464-2489.

[181] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 11-20.

[182] D.S. Burgi, R.-L. Chien, *Anal. Chem*. 63 (1991) 2042-2047.

[183] R.-L. Chien, J.C. Helmer, *Anal. Chem*. 63 (1991) 1354-1361.

[184] T. Soga, Y. Inoue, G.A. Ross, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 421-428.

[185] Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 107-117.

[186] R.-L. Chien, D.S. Burgi, *J. Chromatogr.* 559 (1991) 141-152.

[187] C.-X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2523-2532.

[188] M.R.N. Monton, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 203-211.

[189] R.-L. Chien , D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 489A-496A.

[190] M.A. Friedberg, M. Hinsdale, Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 35-42.

[191] D. Figeys, H. Ahmadzedeh, E. Arriaga, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 325-331.

[192] M. Unger, J. Stöckigt, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 323-331.

[193] A.K. Lalloo, S.C. Chattaraj, I. Kanfer, *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 333-341.

[194] Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 231-240.

[195] Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 3-9.

[196] S. Sentellas, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *Electrophoresis* 24 (2003) 3075-3082.

[197] S. Sentellas, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 193-201.

[198] R.-L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1046-1050.

[199] D.S. Burgi, R.-L. Chien, *Anal. Biochem.* 2 (1992) 308-309.

[200] Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 281-289.

[201] J.P. Quirino, S. Terabe, *Electrophoresis* 21 (2000) 355-359.

[202] J.P.Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 339-344.

[203] D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3726-3729.

[204] A.R. Timerbaev, K. Fukushi, T. Miyado, N. Ishio, K. Saito, S. Motomizu, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 309-319.

[205] Y. He, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 71 (1999) 995-1001.

[206] Y. Zhao, K. McLaughlin, C.E. Lunte, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4578-4585.

[207] S. Park, C.E. Lunte, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 511-517.

[208] Y. Zhao, C.E. Lunte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3985-3991.

[209] A.R Timerbaev, T. Hirokawa, *Electrophoresis* 27 (2006) 323-340.

[210] P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 21 (2000) 3898-3904.

[211] Z. Huang, K. Ito, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A* 1055 (2004) 229-234.

[212] T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, A.R. Timerbaev, *Electrophoresis* 24 (2003) 2328-2334.

[213] K. Fukushi, N. Ishlo, M. Sumida, S. Takeda, S.-I. Wakida, K. Hiro, *Electrophoresis* 21 (2000) 2866-2871.

[214] T. Hirokawa, M. Yoshioka, H. Okamoto, A.R. Timerbaev, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 165-170.

[215] M. Mazereeuw, V. Spikmans, U.R. Tjaden, J. van der GReef, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 219-233.

[216] A. Riaz, B. Kim, D.S. Chung, *Electrophoresis* 24 (2003) 2788-2795.

[217] A. Riaz, D.S. Chung, *Electrophoresis* 26 (2005) 668-673.

[218] H. Okamoto, .R. Timerbaev, T. Hirokawa, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 522-528.

[219] L. Křivánková, P. Pantuckova, P. Gebauer, P. Boček, J. Caslavska, W. Thormann, *Electrophoresis* 24 (2003) 505-517.

[220] D.S. Burgi, R.-L. Chien, *Capillary Electrophoresis Guidebook*, pp. 211-226, Ed. K.D. Altria, Humana Press, Totowa 1996.

[221] L. Křivánková, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 35-48.

[222] L. Křivánková, A. Vrana, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 772 (1997) 283-295.

[223] T. Hirokawa, A. Ohmori, Y. Kiso, *J. Chromatogr.* 634 (1993) 101-106.

[224] A.J Tomlinson, L.M. Benson, N.A. Guzman, S. Naylor, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 3-15.

[225] A.J. Tomlinson, N.A. Guzman, S. Naylor, *J. Cap. Elec.* 2 (1995) 247-265.

[226] E. Bonneil, K.C. Waldron, *J. Cap. Elec. and Microchip Tech.* 6 (1999) 61-73.

[227] D. Figeys, A. Ducret, R. Aebersold, *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 295-306.

[228] M.A. Strausbauch, J.P. Landers, P.J. Wettstein, *Anal. Chem.* 68 (1996) 306-314.

[229] M. Petersson, K.-G. Wahlund, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 249-261.

[230] J. Cai, Z. El Rassi, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 1179-1192.

[231] Q. Yang, A.J. Tomlinson, S. Naylor, *Anal. Chem.* 71 (1999) 183A-189A.

[232] S. Naylor, A.J. Tomlinson, *Talanta* 45 (1998) 603-612.

[233] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science* 282 (1998) 465-468.

[234] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1638-1644.

[235] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1023-1030.

[236] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1893-1901.

[237] J.P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, J.B. Vincent, G. Vigh, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 3-10.

[238] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 255-267.

[239] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 119-128.

# Chapitre II

# Développement d'une méthode CE-MS pour la détection et l'identification d'acides alkylphosphoniques et alkyl alkylphosphoniques isomères

## 1. Introduction

La première étape de ce travail a consisté à développer une méthode de détection et d'identification d'acides alkylphosphoniques et alkyl alkylphosphoniques dans l'eau pure et dans des extraits de sol par couplage CE-MS. Contrairement à Mercier *et al.* et Kostiainen *et al.*, des composés isomères ont été introduits dans l'échantillon afin d'évaluer la sélectivité de l'électrophorèse capillaire et les capacités d'identification de la spectrométrie de masse. Le dispositif CE-MS qui a été utilisé est constitué d'une électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) et d'un analyseur à piège ionique (ITMS), couplés par une interface coaxiale à liquide additionnel (cf. paragraphe I.4.1.1). Mercier *et al.* et Kostiainen *et al*. avaient utilisé un spectromètre de masse différent, équipé d'une source ESI couplée à un triple quadripôle (TQ).

Dans un premier temps, un mélange de cinq acides alkylphosphoniques dilués dans l'eau pure, comportant les acides propylphosphonique et isopropylphosphonique isomères, a été analysé par électrophorèse capillaire en utilisant une détection UV indirecte. Ces expériences réalisées en CE-UV ont permis la détermination des principaux paramètres de la séparation (composition de l'électrolyte, milieu de séparation, pH, etc). L'électrolyte de séparation qui a été utilisé est constitué d'anion sorbate et d'éthanolamine dans un milieu hydro-organique méthanol-eau (40:60, v/v).

Avant de réaliser des expériences en couplage CE-MS, les paramètres de détection des analytes par spectrométrie de masse, tels que les conditions d'ionisation et de piégeage des ions ou le choix du mode d'ionisation, ont été optimisés en procédant à l'introduction directe des composés. Les conditions de séparation déterminées en CE-UV ont dû ensuite être adaptées à la détection par spectrométrie de masse : un électrolyte de séparation plus volatil,

constitué d'anion acétate et de cation ammonium, a ainsi été employé pour les expériences CE-MS. La composition et le débit du liquide additionnel constituent des paramètres importants pour la sensibilité de détection des analytes.

La méthode CE-MS développée a ensuite été utilisée pour analyser des échantillons plus complexes, constitués d'eau pure ou d'extraits de sol dopés avec les cinq acides alkylphosphoniques étudiés précédemment, auxquels cinq acides alkyl alkylphosphoniques comportant des composés isomères ont été ajoutés. Enfin, des expériences CE-MS-MS ont été réalisées pour obtenir une identification univoque des acides alkyl alkylphosphoniques isomères présents dans l'eau.

## 2. Article

### SEPARATION AND IDENTIFICATION OF ISOMERIC ACIDIC DEGRADATION PRODUCTS OF ORGANOPHOSPHORUS CHEMICAL WARFARE AGENTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS-ION TRAP MASS SPECTROMETRY

Mélanie Lagarrigue[1], Anne Bossée[1], Arlette Bégos[1], Anne Varenne[2], Pierre Gareil[2], Bruno Bellier[1]

*Journal of Chromatography A* 1137 (2006) 110-118.

[1] Département Analyse Chimique, Centre d'Etudes du Bouchet (DGA), 5 rue Lavoisier, BP 3, 91710 Vert-le-Petit

[2] Laboratoire Electrochimie et Chimie Analytique, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (UMR CNRS 7575), 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05

**Abstract**

Capillary electrophoresis (CE) coupled to ion trap mass spectrometry (MS) was evaluated for the separation and identification of chemical warfare agent degradation products (alkylphosphonic acids and alkyl alkylphosphonic acids). Different analytical parameters were optimized in negative ionization mode such as electrolyte composition (15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8), sheath liquid composition ((75:25:2, v/v/v) $MeOH/H_2O/NH_4OH$), nebulization and ion trapping conditions. A standard mixture of five alkylphosphonic (di)acids and five alkyl alkylphosphonic (mono)acids containing isomeric compounds was used in order to evaluate CE selectivity and MS identification capability. The obtained electropherograms revealed that CE selectivity was very limited in the case of alkyl alkylphosphonic acid positional isomers, whereas isomeric isopropylphosphonic and propylphosphonic acids were baseline separated. CE-MS-MS experiments provided an unambiguous identification of each isomeric co-migrating alkyl alkylphosphonic acids thanks to the presence of specific fragment ions. On the other hand, CE separation was mandatory for the identification of isomeric alkylphosphonic acids, which led to the same fragment ion and could not be differentiated by MS-MS. The developed method was applied to the analysis of soil extracts spiked with the analytes (before or after extraction treatment) and appeared to be very promising since resolution and sensitivity were similar to those observed in purified water. Especially, analytes were detected and identified in soil extract spiked at 5 $\mu g.g^{-1}$ with each compound before extraction treatment.

**Key words:** capillary electrophoresis, electrospray ionization, ion trap mass spectrometry, CE-MS-MS, chemical warfare agent degradation products, phosphonic acids, isomers, soil extracts.

## 2.1 Introduction

Since implementation of the Chemical Weapons Convention (April 1997), prohibiting the development, production, stockpiling and use of chemical warfare agents, efficient analytical techniques have been developed for detection and identification of chemical warfare agents and their degradation products in order to verify the compliance with this convention [1]. The most lethal chemical warfare agents are nerve agents such as sarin, soman, tabun or VX [2]. Most of these toxic chemicals are generally easily degraded by hydrolysis to first produce alkyl alkylphosphonic acids and, secondly, alkylphosphonic acids, as illustrated in Figure 1 [3].

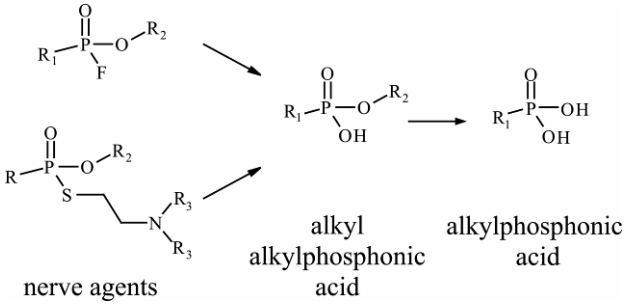



**Figure 1:** Hydrolysis pathway of nerve agent.

Because of the volatility and thermal stability of chemical warfare agents, gas chromatography (GC), which provides high separation efficiency [4], has been a widely used separation technique. Several selective and/or sensitive detection techniques can be used with GC such as flame photometric detection (FPD), flame ionization detection (FID) or atomic emission detection (AED) [5,6]. Mass spectrometric (MS) detection has been also widely used [7,8] and typically performed with electron impact (EI) or chemical ionization (CI) sources. EI generates very reproducible mass spectra, displaying abundant fragment ions, which can be compared to those compiled in a library to provide an unambiguous identification of the compounds. On the other hand, CI reduces the fragmentations and gives complementary information on the molecular mass. However, the major drawback of GC concerns the analysis of chemical warfare agent degradation products (e.g. alkylphosphonic

acids). Indeed, the analysis of these polar and non-volatile compounds by GC, generally requires a time-consuming chemical derivatization [4].

Reversed-phase liquid chromatography (RPLC) has been a method of choice for the analysis of phosphonic acids, since neither preliminary chemical derivatization, nor the transfer of the analytes in organic solvents is necessary. This has made RPLC a very suitable technique for the rapid screening of aqueous samples or extracts [9-11]. The absence of UV-absorbing groups in most of the chemical warfare agents and their degradation products precludes usual UV detection. Therefore, mass spectrometric detection involving, in most cases, electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) sources, has been widely used. Nevertheless, mass spectra obtained with these kinds of ionization sources do not produce enough diagnostic ions to allow unambiguous identification of degradation products by comparison with mass spectra compiled in a database as in GC-EI-MS. MS-MS experiments are therefore required.

Capillary electrophoresis (CE) appears to be an interesting method for the analysis of chemical warfare agent degradation products [12]. Indeed, CE intrinsically allows powerful separation of charged or very polar compounds, which are rapidly eluted and thus hardly separated by RPLC. Moreover, CE provides high separation efficiency, very low sample consumption (in the nL range) and specific separation principles, thus appearing as an attractive complementary technique to LC [13]. Because the majority of phosphonic acids emerging from chemical warfare agent degradation are not UV-absorbing, indirect UV detection has been the most used technique [14-21]. Nevertheless, direct UV detection can also be performed by complexation of these products with borate ion [22,23], but this generally leads to poor detection sensitivity. Laser induced fluorescence (LIF) is a very sensitive detection technique but requires prior derivatization of the compounds of interest [24-26]. Flame photometric detection (FPD) [27] and conductivity detection [28,29] have also been reported for the detection of chemical warfare degradation products. Mass spectrometry offers high sensitivity, without the need for sample derivatization and is also a very powerful technique for identification and structural analysis of the compounds. Nevertheless, as already mentioned by Hooijschuur et al. [4] and despite the growing interest for the hyphenation of mass spectrometry with CE since the last decade in various application fields, very few articles have reported the use of CE-MS for the detection of phosphonic acids [30,31].

The aim of this work was to develop an analytical method using CE-MS for detection and identification of isomeric chemical warfare agent degradation products in soil extracts. Prior

to CE-MS experiments, a standard mixture of five alkylphosphonic acids was analyzed by CE using indirect UV detection, in order to set the main electrolyte conditions (electrolyte composition, medium, pH, etc). These conditions were then adapted to provide compatibility with MS detection. Isomeric alkyl alkylphosphonic acids were then introduced in the sample to further evaluate CE selectivity. Collision-induced dissociations, generated in the ion trap (MS-MS experiments), were next investigated to identify alkyl alkylphosphonic acids that were not electrophoretically separated. Finally, soil extracts spiked with the studied phosphonic acids (before or after extraction treatment) were analyzed by CE-MS.

## 2.2 Experimental

### *2.2.1 Chemicals*

Methylphosphonic acid (MPA), ethylphosphonic acid (EPA), propylphosphonic acid (PrPA), and phenylphosphonic acid (PhPA) were purchased from Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Isopropylphosphonic acid (IPA), methyl ethylphosphonic acid (MEPA), ethyl methylphosphonic acid (EMPA), ethyl ethylphosphonic acid (EEPA), methyl propylphosphonic acid (MPrPA) and propyl methylphosphonic acid (PrMPA) were synthesized at the Centre d'Etudes du Bouchet and were >98 % purity ($^{31}$P NMR). Isopropylphosphonic acid, which is not commercially available, was synthesized by the reaction of isopropylphosphonic dichloride with two equivalents of benzylic alcohol. The obtained bisbenzyl isopropylphosphonate was then subjected to catalytic hydrogenation ($H_2$ with 10 % palladium on charcoal) in ethanol to produce isopropylphosphonic acid (melting point: 64-67°C, purity >99 %). The structures of the studied phosphonic acids are presented in Table 1. Sorbic acid (>99 %) was purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium), ammonium carbonate and ammonium acetate were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Methanol (HPLC grade), 25 % ammonium hydroxide solution and 1 M sodium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and ethanolamine from Aldrich. Formamide (Aldrich) was used as electroosmotic flow marker. Purified water used throughout was obtained from an alpha-Q system (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Electrolytes were filtered through a 0.2 µm PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane filters (Pall Life Sciences, MI, USA) before use.

| **Migration order** | **Compound** (M) | **$R_1$** | **$R_2$** | **Mw** ($g.mol^{-1}$) | **$[M-H]^-$** | **Main fragment ion** | **Assignment** (loss of) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | EEPA | $C_2H_5$ | $C_2H_5$ | 138 | m/z 137 | m/z 109 | $[CH_2=CH_2]$ |
| 2 | MPrPA | $(CH_3)(CH_2)_2$ | $CH_3$ | 138 | m/z 137 | m/z 105 | $[CH_3-OH]$ |
| 3 | PrMPA | $CH_3$ | $(CH_3)(CH_2)_2$ | 138 | m/z 137 | m/z 95 | $[CH_3-CH=CH_2]$ |
| 4 | MEPA | $C_2H_5$ | $CH_3$ | 124 | m/z 123 | m/z 91 | $[CH_3OH]$ |
| 5 | EMPA | $CH_3$ | $C_2H_5$ | 124 | m/z 123 | m/z 95 | $[CH_2=CH_2]$ |
| 6 | IPA | $(CH_3)_2CH$ | H | 124 | m/z 123 | m/z 79 | $[CH_3-CH_2-CH_3]$ |
| 7 | PrPA | $(CH_3)(CH_2)_2$ | H | 124 | m/z 123 | m/z 79 | $[CH_3-CH_2-CH_3]$ |
| 8 | EPA | $C_2H_5$ | H | 110 | m/z 109 | m/z 79 | $[CH_3-CH_3]$ |
| 9 | PhPA | $C_6H_5$ | H | 158 | m/z 157 | m/z 79 | $[C_6H_6]$ |
| 10 | MPA | $CH_3$ | H | 96 | m/z 95 | m/z 79 | $[CH_4]$ |

**Table 1 :** Structures, migration orders and main fragment ion observed on MS-MS spectra obtained by direct introduction of samples containing one of the studied phosphonic acids.

### *2.2.2 CE-UV*

Capillary electrophoresis experiments were performed with a $HP^{3D}CE$ (Agilent technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a UV absorbance diode array detector. Separations were realized in 50 µm i.d. x 35 cm (26.5 cm effective length) bare fused-silica capillaries (Agilent Technologies, Massy, France). Indirect UV detection was carried out with separation electrolytes composed of 10 mM sorbate as chromophore ion and different concentrations of ethanolamine to adjust the electrolyte pH to desired values. pH values reported throughout are those measured for the aqueous part of the electrolyte. Electrolytes were prepared in a (40:60, v/v) $MeOH/H_2O$ medium. Temperature was set to 25°C. Analytes were hydrodynamically injected (50 mbar, 3 s) and separation voltage was set to +20 kV. Prior to first use, bare fused silica capillaries were washed with 1 M NaOH for 10 min, 0.1 M NaOH for 10 min. After storage, capillaries were flushed with 0.1 M NaOH for 5 min, water for 10 min. Between runs, capillaries were rinsed with electrolyte for 3 min.

### *2.2.3 CE-MS*

An Esquire 3000 ion trap mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray ionization (ESI) source was used in the negative ion mode for the detection of the phosphonic acids. Nitrogen was used as nebulizing gas at a pressure of 7 psi (1 psi=6894.76 Pa) and as drying gas at a temperature of 200°C and a flow rate of 5 $L.min^{-1}$. Optimized ESI source voltages were as follows: spray needle at +3.5 kV, end plate offset at

-500 V, capillary exit offset at -40 V, skimmer 1 at -20 V, skimmer 2 at -10V, low mass cut-off [32] (LMCO) at 50 Th. Ion accumulation time was automatically set with ion charge control (ICC) with a target of 10000 to avoid space charge effects. The analytical scan range for mass spectra was m/z 50-160 Th. CE-MS coupling was carried out using a sheath liquid coaxial interface (Agilent Technologies). The sheath liquid ((75:25:2, v/v/v) MeOH/$H_2O$/$NH_4OH$) was delivered by a syringe pump (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) at a flow-rate of 4 µL.min$^{-1}$.

CE-MS experiments were realized in 50 µm i.d. x 85 cm (21.5 cm effective length to UV detector and 85 cm effective length to MS detector) bare fused-silica capillaries (Agilent Technologies). A schematic drawing of the CE-MS coupling is presented in Figure 2. Polyimide coating was removed from the outlet of the capillary (1 cm) to favor the formation of a stable electrospray. A CE column cutter (Agilent Technologies) was used to obtain a very sharp and orthogonal cut of the capillary ends which is mandatory for the stability of the spray. The quality of the capillary ends was often checked and, if necessary, the capillary was replaced. Separation electrolyte was composed of 15 mM ammonium acetate adjusted to pH 8.8 by ammonium hydroxide solution. Analytes were hydrodynamically injected (50 mbar, 10 s) and separation voltage was set to +20 kV. Nebulizing and drying gas were turned off during injection step.

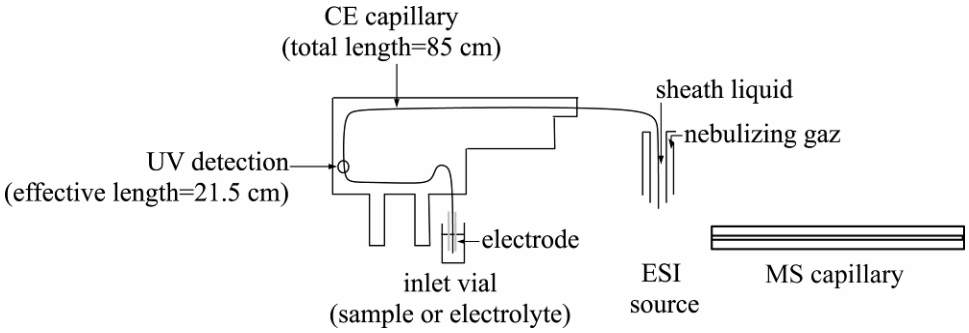



**Figure 2 :** Schematic drawing of the CE-MS system using a sheath liquid coaxial interface.

### *2.2.4 Soil extracts*

Local soil samples were spiked with analytes at a concentration of 5 µg.g$^{-1}$. Pressure-assisted solvent extraction was realized with water for 10 g of soil at 150 bar and 100°C [33] in a Dionex ASE 200 instrument (Dionex, Voisins le Bretonneux, France). Soil extracts were next percolated through a cation exchange cartridge (AG50WX8 resin, Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), then concentrated by partial evaporation to a volume of 1 mL and finally filtered through 0.45 µm nylon membrane filters before analysis. The same treatment was also applied to blank local soil sample devoid of phosphonic acids, and the obtained aqueous extract was subsequently spiked with controlled concentrations of analytes (50 µg.mL$^{-1}$).

## 2.3 Results and discussion

### *2.3.1 Separation of a standard mixture of alkylphosphonic acids by CE-UV*

The first step of this study was to develop a method for the separation and identification of alkylphosphonic (di)acids by CE-UV, in view of setting the main separation conditions. The selected sample was a standard mixture constituted of five alkylphosphonic acids MPA, EPA, PrPA, IPA and PhPA (Table 1) diluted in pure water at a concentration of 50 µg.mL$^{-1}$. The isomeric isopropylphosphonic (IPA) and propylphosphonic (PrPA) acids were introduced in the sample to evaluate CE selectivity.

Since the majority of the selected alkylphosphonic acids did not contain UV-absorbing group, indirect UV detection was set up. Sorbate anion (pKa=4.77) was selected as chromophore for its high molar absorbance coefficient (ε=25 000 mol$^{-1}$ cm$^{-1}$ at 254 nm) and its electrophoretic mobility close to those of the analytes [17]. Thus, analyses were performed with a separation electrolyte composed of 10 mM sorbate and 9 mM ethanolamine at pH 5.7 in a purely aqueous medium. At this pH value, all analytes were mainly singly negatively charged, according to their acidity constants ($1.3<pKa_2<2.5$ and $6.7<pKa_1<8.2$ [34]). However, under these conditions, the alkylphosphonic acids IPA, PrPA and PhPA were not separated (data not shown).

Consequently, the separation electrolyte was next prepared in water-methanol media in view of modifying selectivity. Indeed, the presence of organic solvents in separation electrolytes alters the pKa and the solvation of analytes, thus modifying their electrophoretic

mobilities [35-38]. Moreover, the electroosmotic flow is also strongly influenced by the addition of organic solvents [39-41], due to variations of viscosity, dielectric constant and zeta potential. For instance, addition of methanol in the aqueous electrolyte in proportions varying from 0 % to about 60 % markedly reduces the electroosmotic flow, which led to an extended separation window [42]. However, employing an electrolyte composed of 10 mM sorbate and 9 mM ethanolamine in a (40:60, v/v) MeOH/$H_2O$ medium did not enhance the resolution between IPA, PrPA and PhPA (Figure 3a), although analysis time was dramatically increased up to 50 min.

As electrolyte pH can strongly influence the resolution between acidic analytes [43], additional experiments were carried out by varying ethanolamine concentrations in the preceding electrolyte to adjust pH to desired values. The obtained electropherograms are reported in Figures 3a-c. As expected, analysis time significantly decreased when pH value increased from 5.7 to 8.8, due to an increase in electroosmotic mobility. It can be noted that the electropherogram obtained at pH 8.8 displays a fronting peak for PhPA and a tailing peak for MPA (Figure 3c) which testifies for the pertinency of sorbate as chromogenic co-ion, the electrophoretic mobility of which being bracketed by those of PhPA and MPA [44]. Moreover, a significant resolution enhancement was achieved as the pH value increased. In effect, the five alkylphosphonic acids and, particularly, isomers IPA and PrPA, were baseline-separated at pH 8.8 within 15 min. These results can be explained by considering the variation in charge states of the five alkylphosphonic acids ($pKa_1$ between 6.7 and 8.2) resulting from the variation of pH. The reversal of migration orders of EPA and PhPA between pH 7.4 and 8.8 (Figures 3b and 3c) can also be explained by a variation in charge state. Concerning the successful separation of isomers IPA and PrPA at pH 8.8 (Figure 3c), it appeared that the effective mobility of PrPA (linear isomer) was higher than that of IPA (branched isomer), which is contrary to current expectation of migration orders based on the simplest electrophoretic mobility models [45] and previous experimental observation [46]. This migration order can be rather explained by a slight difference in the first acidity constants ($pKa_1$) of isomers IPA and PrPA or by different solvations of these isomers in the hydro-organic medium.

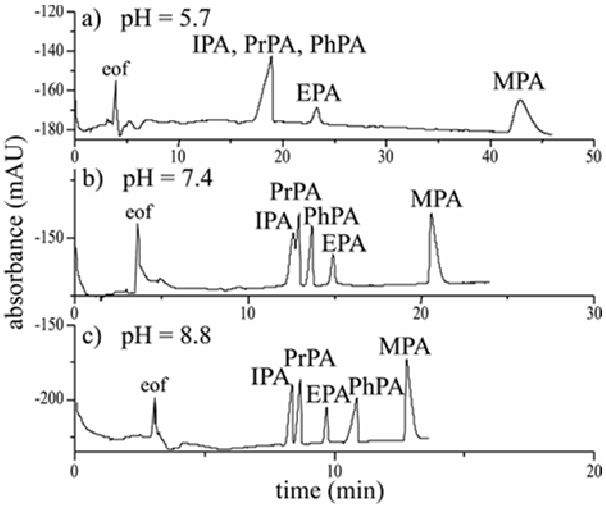



**Figure 3:** CE-UV analysis of a standard mixture of alkylphosphonic acids in hydro-organic media at various pH. Bare fused-silica capillary, 50 µm i.d. x 35 cm (UV detection at 26.5 cm). Background electrolytes: 10 mM sorbate and (a) 9 mM ethanolamine (pH 5.7), (b) 10 mM ethanolamine (pH 7.4) or (c) 12 mM ethanolamine (pH 8.8) in (40:60, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture. Temperature, 25°C. Applied voltage: +20 kV. Hydrodynamic injection, 50 mbar 3 s. Indirect UV detection at 254 nm. Analyte concentration: 250 µg.mL$^{-1}$ each in pure water. Analyte abbreviations: see Table 1.

### *2.3.2 Separation and identification of a standard mixture of alkylphosphonic and alkyl alkylphosphonic acids by CE-MS*

The preceding CE-UV method appeared limited to the identification of a rather restricted mixture of chemical warfare agent degradation products and its sensitivity may not be enough for real matrices. Consequently, the development of a CE-MS method was then studied, keeping in mind that the optimal CE-UV electrolyte conditions are not fully compatible with CE-MS coupling because of the poor volatility of sorbate ion. Thus, more volatile electrolytes such as ammonium carbonate or ammonium acetate had to be tested. In these conditions, only phenylphosphonic acid (PhPA) could be UV-detected at a wavelength of 200 nm (corresponding to the maximum absorbance of PhPA) and was used as an indicator of the separation progress. As the CE-MS analysis of these degradation products has been reported in very few articles [30,31], the study was first conducted with the previously used standard mixture separation of five alkylphosphonic acids. Next, five alkyl alkylphosphonic acids were added to the previous mixture to test the capacity of this new methodology to discriminate a large number of chemical warfare agent degradation products and especially, their positional isomers.

### *2.3.3 Optimization of the CE-MS separation*

The electrospray ionization source was used in negative ion mode, since deprotonated forms of phosphonic acids ($[M-H]^-$) are known to give better signal than protonated forms ($[M+H]^+$) [10,30,47] and addition of formic or acetic acid, required to enhance protonation of the analytes in positive ion mode, leads to the formation of abundant backgrounds ions at low m/z ratios, which are very inconvenient for the analysis of small compounds [48]. In negative ion mode, ion trapping conditions, providing the most abundant $[M-H]^-$ pseudo-molecular ions, were determined by infusing the standard mixture of five phosphonic acids diluted at equal concentrations in a (1:1, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture (see experimental section). Exception concerns the nebulizing gas pressure, which was directly adjusted during CE-MS experiments because of the resulting suction effect which influences separation resolution [49] (data not shown). The choice of the sheath liquid noticeably influences the sensitivity in CE-MS [50,51]. Sheath liquids composed of water and different proportions of methanol, acetonitrile or isopropanol were tested. The best results were obtained with a (75:25, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture. In order to favor the formation of deprotonated $[M-H]^-$ species, 2 % $NH_4OH$ were added to the sheath liquid [52]. The sheath liquid flow rate, optimized at 4 $\mu L.min^{-1}$, enabled a good compromise between the dilution of the analytes and the formation of a stable spray. Interestingly, the mass spectrum, obtained by infusing this alkylphosphonic acid mixture displayed decreasing abundances of pseudo-molecular $[M-H]^-$ species as their molecular mass decreased, which reveals that ionization efficiency significantly decreases with analyte size [30,47,53].

Concerning the composition of the separation electrolyte, varying concentrations of ammonium carbonate or ammonium acetate were tested in purely aqueous media. The best signal-to-noise ratios were obtained at pH 8.8 in a 15 mM ionic strength ammonium acetate buffer and were better than the signal-to-noise ratios observed with indirect UV detection. Satisfactory resolution and reproducible electroosmotic and electrophoretic mobilities were obtained without methanol addition to the electrolyte (Figure 4). The migration orders of the five model alkylphosphonic acids observed with this MS-compatible electrolyte were identical to those previously observed with the 10 mM sorbate, 12 mM ethanolamine, pH 8.8 electrolyte in (40:60, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture (Figure 3c). This result allows to exclude possible influence of IPA and PrPA solvation by methanol on selectivity and resolution (discussed in section 3.1) and confirms that their electrophoretic separation is governed by the difference in their acidity constants.

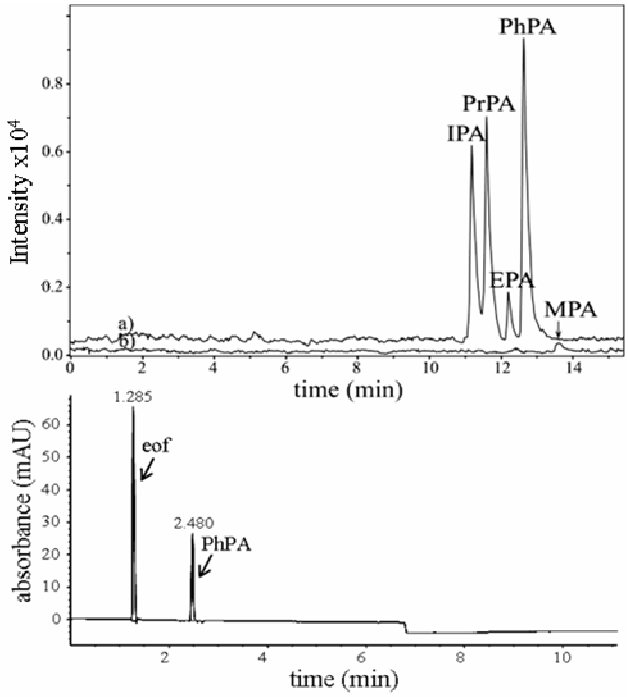



**Figure 4:** CE-MS analysis of a standard mixture of alkylphosphonic acids. Bare fused-silica capillary, 50 µm i.d. x 85 cm (UV detection at 21.5 cm). (a) base peak electropherogram; (b) extracted ion electropherogram (m/z 95). Background electrolytes: 15 mM $CH_3COONH_4$ adjusted to pH 8.8 with $NH_4OH$. Temperature, 25°C. Applied voltage: +20 kV. Hydrodynamic injection, 50 mbar 10 s. Direct UV detection at 200 nm. MS conditions are reported in experimental section with a sheath liquid composed of (75:25:2, v/v/v) $MeOH/H_2O/NH_4OH$. Analyte concentration: 50 µg.mL$^{-1}$ each in water. Analyte abbreviations: see Table 1.

Subsequently, five alkyl alkylphosphonic acids were added to the preceding standard mixture at a concentration of 50 µg.mL$^{-1}$. Two groups of isomeric alkyl alkylphosphonic acids, i.e. EEPA/PrMPA/MPrPA ($M_w$=138 g.mol$^{-1}$) and MEPA/EMPA ($M_w$=124 g.mol$^{-1}$), were selected (Table 1) in order to evaluate the separation selectivity of CE. The obtained electropherogram is reported in Figure 5. At pH 8.8, the alkylphosphonic (di)acids mainly bear a double negative charge, whereas the alkyl alkylphosphonic (mono)acids are singly negatively charged. Consequently, the effective mobilities of the alkyl alkylphosphonic acids are significantly lower than those of the alkylphosphonic acids. This allows to clearly identify these two distinct subclasses on the electropherogram: the alkyl alkylphosphonic acids migrating first, and the alkylphosphonic acids migrating later in counter-electroosmotic mode under positive voltage (Figure 5). However, contrary to the isomeric alkylphosphonic acids IPA and PrPA which are baseline-separated, the resolution between the isomeric alkyl alkylphosphonic acids EEPA/PrMPA/MPrPA and MEPA/EMPA is very poor.

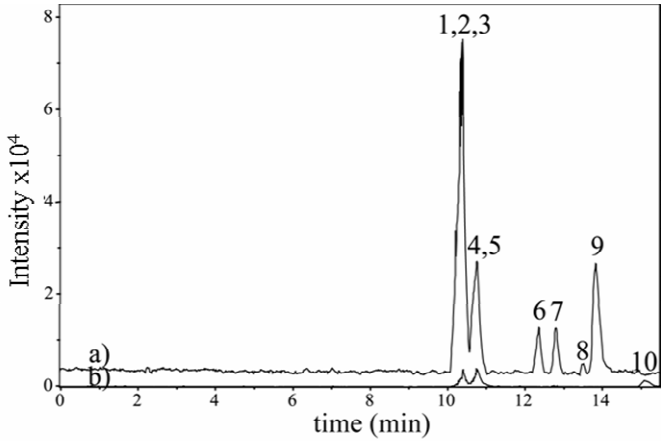



**Figure 5:** CE-MS analysis of a standard mixture of alkyl alkylphosphonic acids and alkylphosphonic acids. (a) base peak electropherogram; (b) extracted ion electropherogram (m/z 95). CE and MS conditions as reported in Figure 3 with a sheath liquid composed of (75:25:2, v/v/v) MeOH/$H_2O$/$NH_4OH$. Analyte concentration: 50 µg.mL$^{-1}$ each in water. Identification: 1, EEPA; 2, MPrPA; 3, PrMPA; 4, MEPA; 5, EMPA; 6, IPA; 7, PrPA; 8, EPA; 9, PhPA; 10, MPA.

### *2.3.4 Identification by MS-MS detection*

Mass spectra corresponding to the co-migrating isomeric alkyl alkylphosphonic acids revealed the presence of weakly abundant fragment ions formed by in-source fragmentations. In order to further investigate these fragmentations, MS-MS experiments were first performed by directly introducing each phosphonic acid at a concentration of 5 µg.mL$^{-1}$ in (1:1, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture into the mass spectrometer. The obtained mass spectrum displayed an abundant $[M-H]^-$ ion corresponding to the analyte. The $[M-H]^-$ ion was mass-selected and then subjected to low-energy collision-induced dissociations (CID), giving rise to the formation of fragment ions in relative abundances depending on the applied excitation amplitude ($V_{p-p}$). The fragment ions observed from each phosphonic acid on the CID spectra and their respective attributions are reported in Table 1. All the studied alkylphosphonic acids lead to the formation of the same fragment ion at m/z 79, which was attributed to $PO_3^-$ species. This fragment ion is generated by the loss of $[R_1+H]$, $R_1$ corresponding to the alkyl group bonded to the phosphorous atom. A fragmentation pathway involving a proton transfer is proposed in Figure 6a. Consequently, isomers IPA and PrPA can not be differentiated by their fragmentations under low-energy CID. More interestingly, the alkyl alkylphosphonic acids fragmentation pathways depend on the size of the $R_2$ alkyl group bonded to the oxygen atom. When $R_2$ is larger than a methyl group, the observed fragment ion corresponds to the loss of $[R_2-H]$ [30] and is very abundant. A mechanism involving a proton transfer is proposed in Figure 6b. On the other hand, when $R_2$ is a methyl group, the fragment ion

corresponds to the elimination of methanol and is observed at a lower extent. This loss could occur from $[M-H]^-$ through the formation of an ion-dipole complex as proposed in Figure 6c. The weak abundance of the methanol elimination suggests that the energy required for this fragmentation pathway is more important than for the elimination of $[R_2-H]$ by a proton transfer.

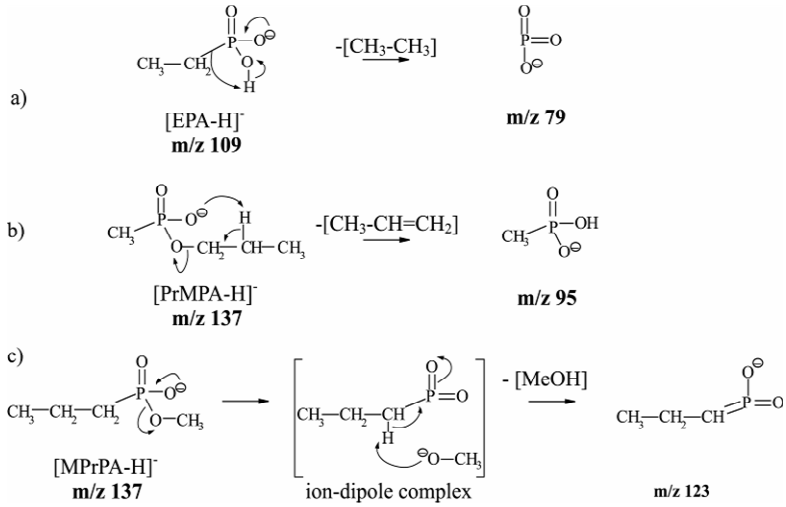



**Figure 6:** Proposed fragmentation pathway for (a) $[EPA-H]^-$ m/z 109 (b) $[PrMPA-H]^-$ m/z 137 ($R_2$>$CH_3$) and (c) $[MPrPA-H]^-$ m/z 137 ($R_2$=$CH_3$).

The specific fragmentations of isomeric alkyl alkylphosphonic acids were further exploited for their identification during CE-MS-MS experiments. Indeed, although the formation of these specific fragment ions also occurred by in-source fragmentations during CE-MS experiments, they were not abundant enough to be easily detected. To increase in-source fragmentations, the source voltages could be increased, which would unfortunately also lead to a decrease in relative abundances of the precursor ions. Alternatively, CE-MS-MS allowed to enhance the signal of the fragment ions by applying appropriate excitation amplitude and to preserve the signal of the precursor ions at the same time, since the acquisition module alternates MS and MS-MS scans (automatic MS-MS option, Esquire Control Bruker software) during CE-MS-MS experiments.

Finally, the electropherograms corresponding to the total current ions (TIC) obtained in MS and in MS-MS are reported in Figure 7. The MS-MS spectra obtained from different successive slices of the first peak, corresponding to the m/z 137 precursor ion, revealed the presence of the three specific fragment ions at m/z 109, m/z 105 and m/z 95, attributed to EEPA, MPrPA and PrMPA, respectively (Table 1). In the same way, the integration of the

second peak, corresponding to the m/z 123 precursor ion, led to MS-MS spectra displaying m/z 91 and m/z 95 specific fragment ions, attributed to MEPA and EMPA, respectively (Table 1). According to the slightly successive appearance of the different specific fragment ions, the following migration orders EEPA<MPrPA<PrMPA and MEPA<EMPA can be proposed.

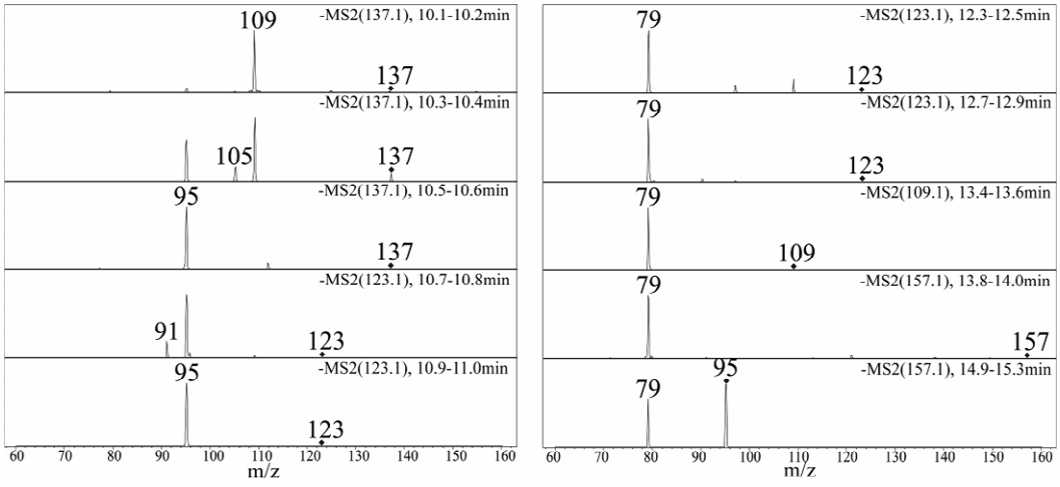



**Figure 7:** MS-MS spectra corresponding to each numbered peak obtained in CE-MS analysis of a standard mixture of alkyl alkylphosphonic acids and alkylphosphonic acids. CE and MS conditions as reported in Figure 3 with a sheath liquid composed of (75:25:2, v/v/v) MeOH/$H_2O$/$NH_4OH$. MS-MS conditions: excitation amplitude, 0.90 $V_{p-p}$; isolation width, 2 Th.

### *2.3.5 Analysis of soil extract by CE-MS*

This newly developed protocol for CE-MS was then applied and evaluated for the analysis of phosphonic acids in soil samples. The soil samples (10 g) were subjected to a treatment commonly used in our laboratory, which consists in a pressure-assisted solvent extraction by water (100°C, 150 bar), followed by a purification of the soil extract through a cation exchange cartridge [33]. The obtained aqueous soil extract was finally concentrated by partial evaporation to a volume of 1 mL.

In a first step, blank local soil extracts devoid of any phosphonic acid, and extracts spiked with the preceding ten phosphonic acids at a concentration of 50 µg.mL$^{-1}$ each after the treatment, were investigated for possible interferences and matrix effects. The corresponding electropherograms (Figures 8a and 8b) were compared with that of the standard mixture diluted in water at the same concentration (Figure 5). Very few interferences from soil matrix were detected from the reconstructed total current CE-MS electropherogram. The separations obtained were also very similar with respect to resolution and sensitivity. The limits of

quantitation (LOQ) obtained in pure water and in soil extracts were reported in Table 2. It should be noted that the LOQ of MPA is very poor because of the low ionization efficiency and the broad peak shape of this analyte.

| **Migration order** | **Compound** (M) | **$M_w$** ($g.mol^{-1}$) | **$[M-H]^-$** | **LOQ in pure water** ($\mu g.mL^{-1}$) | **LOQ in local soil extract** ($\mu g.mL^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | EEPA | 138 | m/z 137 | 12.5 | 15 |
| 2 | MPrPA | 138 | m/z 137 | 12.5 | 12.5 |
| 3 | PrMPA | 138 | m/z 137 | 10 | 12.5 |
| 4 | MEPA | 124 | m/z 123 | 15 | 20 |
| 5 | EMPA | 124 | m/z 123 | 20 | 25 |
| 6 | IPA | 124 | m/z 123 | 24 | 24 |
| 7 | PrPA | 124 | m/z 123 | 25 | 25 |
| 8 | EPA | 110 | m/z 109 | 60 | 60 |
| 9 | PhPA | 158 | m/z 157 | 10 | 15 |
| 10 | MPA | 96 | m/z 95 | 300 | 320 |

**Table 2 :** Limits of quantitation obtained in pure water and in a blank local soil extract for a signal-to noise ratio of 10.

In a second step, a local soil sample was spiked with the analytes at a concentration of 5 $\mu g.g^{-1}$ before treatment (i.e. extraction, percolation through cation exchange cartridge and concentration by evaporation). Observed resolution (Figure 8c) was similar to that obtained with pure water spiked with the analytes at 50 $\mu g.mL^{-1}$ and obtained sensitivity allowed the detection of the ten analytes. These experiments showed great promise for the detection and identification of phosphonic acids in soil extracts by CE-MS.

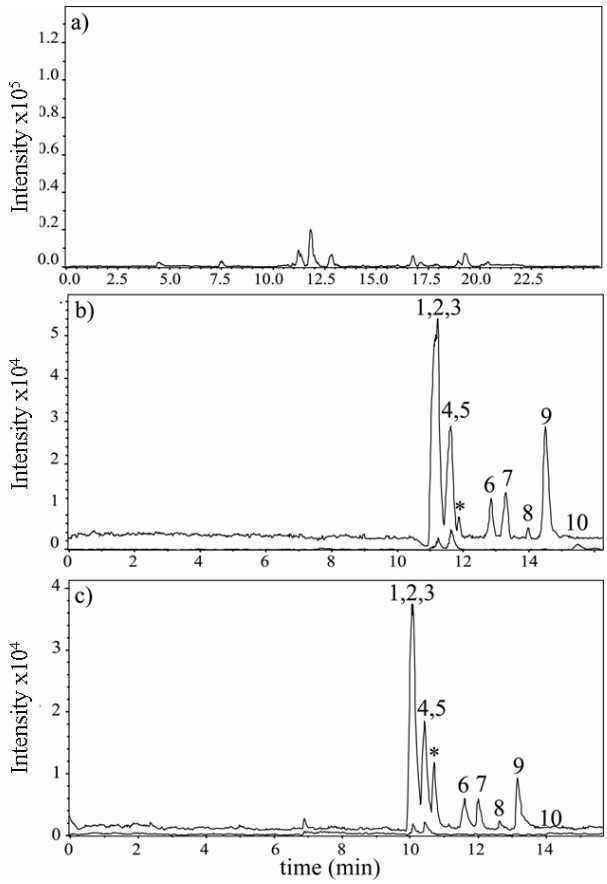



**Figure 8:** CE-MS electropherograms of (a) a blank local soil extract devoid of any phosphonic acids ; (b) a local soil extract spiked (after treatment) with the ten standard phosphonic acids at a concentration of 50 µg.mL$^{-1}$ each and (c) a local soil sample spiked (before treatment) with the ten standard phosphonic acids at a concentration of 5 µg.g$^{-1}$ each. Soil sample treatment is reported in experimental section. CE and MS conditions as reported in Figure 3. * peak from soil matrix.

## 2.4 Conclusion

This work evaluated CE-MS as a new analytical technique for the detection and identification of polar chemical warfare agent degradation products. A standard mixture of ten phosphonic acids including isomeric compounds was selected in order to evaluate the selectivity and the identification capability of this technique. Even if the isomeric alkyl alkylphosphonic acids were not separated by CE, specific fragmentations observed in CE-MS-MS allowed their identification. This result illustrated the powerful identification capability of mass spectrometry: indeed, this unambiguous identification of isomeric co-migrating compounds would have been impossible with UV detection. However, in the case of isomeric alkylphosphonic acids IPA and PrPA, which could not be differentiated by their MS-MS fragmentations, CE separation prior to MS detection was mandatory. Thus, this study

showed the great complementarity of CE and MS for the analysis of phosphonic acids and the interest of their hyphenation.

Finally, CE-MS appeared to be a very promising technique for the detection and identification of chemical warfare degradation products in soil extract insofar as resolution and sensitivity were preserved in this real matrix. Work is going on to enhance sensitivity (5 $\mu g.g^{-1}$ in soil sample at present) by using electrophoretic preconcentration techniques allowing larger sample volume injection. In the future, the use of microchip CE-MS would be considered for field analysis.

**Acknowledgment:**

The authors thank DGA/CNRS for financial support and Prof. Jean-Claude Tabet (Laboratoire Synthèse Structure Fonction de Molécules Bioactives, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) for helpful discussions concerning the study of the fragmentation pathways.

## 3. Conclusion

La première étude réalisée en CE-UV a montré l'influence importante du pH de l'électrolyte sur la séparation des acides alkylphosphoniques et, en particulier, pour les acides isopropylphosphonique et propylphosphonique isomères. La séparation de ces deux isomères, qui est obtenue par électrophorèse capillaire, constitue un résultat intéressant puisque la séparation de ces deux composés par chromatographie liquide est impossible avec des phases apolaires classiques de type silice greffée, et nécessite l'utilisation de colonnes particulières constituées de carbone graphite poreux [54]. Cette séparation a été attribuée à la différence de constante d'acidité $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ entre ces diacides alkylphosphoniques isomères. Des mesures réalisées par potentiométrie montrent en effet que ces composés possèdent des constantes d'acidité (ou constantes de dissociation apparentes) différentes ($pK'_{AH^-/A^{2-}}$ (PrPA)=8,18 et $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ (IPA)=8,44 à 25°C, pour une force ionique de 5 mM [55]) qui permettent d'expliquer les ordres de migration observés. Des valeurs proches ($pK'_{AH^-/A^{2-}}$ (PrPA)=8,22 et $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ (IPA)=8,43) ont pu être déterminées à 25°C et à une force ionique de 15 mM en CE-MS selon la procédure décrite en annexe.

Les expériences réalisées en CE-MS ont permis d'obtenir une très bonne séparation des acides alkylphosphoniques sans ajouter de méthanol dans le milieu de séparation, ce qui a permis d'une part d'améliorer la reproductibilité des temps de migration et, d'autre part, de diminuer significativement la durée de l'analyse. La comparaison des électrophérogrammes obtenus en utilisant une détection UV indirecte (Figure 3-c, [analytes]=250 $\mu g.mL^{-1}$) ou la spectrométrie de masse (Figure 4, [analytes]=50 $\mu g.mL^{-1}$) montre que les rapports signal-sur-bruit obtenus en spectrométrie de masse sont plus importants. La méthode CE-MS développée a aussi permis de détecter les analytes dans des extraits de sol initialement dopés à 5 $\mu g.g^{-1}$.

Contrairement aux acides alkylphosphoniques isomères, les acides alkyl alkylphosphoniques isomères ne sont pas séparés par électrophorèse capillaire. La différence de constante d'acidité entre ces composés est en effet insuffisante pour permettre leur séparation [56]. Cependant, des ions fragments spécifiques à chaque acide alkyl alkylphosphonique isomère ont pu être observés durant des expériences CE-MS-MS et ont permis d'obtenir une identification sans équivoque des analytes présents dans l'eau. Ces résultats confirment les puissantes capacités d'identification et, par conséquent, le grand intérêt de la spectrométrie de masse. L'électrophorèse capillaire reste cependant indispensable pour la séparation des acides isopropylphosphonique et propylphosphonique qui ne sont pas

différenciables en MS-MS dans les conditions utilisées (van Baar *et al*. ont cependant montré que les acides isopropylphosphonique et propylphosphonique isomères pouvaient être différenciés en utilisant une source ESI couplée à un triple quadripôle en mode d'ions positifs [57]).

La sensibilité obtenue en CE-ESI-ITMS pour les acides alkyl alkylphosphoniques dilués dans l'eau (les limites de quantification, correspondant à un rapport S/N=10, sont comprises entre 10 et 20 $\mu g.mL^{-1}$) est comparable à celle rapportée par Mercier *et al*. et Kostiainen *et al* en CE-ESI-TQ qui ont obtenu des limites de détection (rapport S/N=3) d'environ 5 $\mu g.mL^{-1}$en utilisant le mode d'acquisition SIM [30,31]. Cependant, Mercier *et al.* ont pu atteindre des limites de détection d'environ 0,1 $\mu g.mL^{-1}$ pour des acides méthylphosphoniques en CE-MS-MS, en utilisant un mode d'acquisition SIM paramétré pour ne détecter que l'ion fragment spécifique aux acides méthylphosphoniques [31]. Le mode d'acquisition SIM, disponible sur les analyseurs à triple quadripôle, est plus sensible que le balayage d'une gamme de masse qui a été utilisé lors de notre travail, mais il ne peut être employé que lorsque la nature des composés recherchés dans l'échantillon est connue.

## 4. Références

[1] M. Mesilaakso (Ed.), *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis*, Wiley, Chichester, 2005

[2] L. Szinicz, Toxicology 214 (2005) 167-181.

[3] B.N. Munro, S.S. Talmage, G.D. Griffin, L.C. Waters, A.P. Watson, J.F. King, V. Hauschild, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 933-974.

[4] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 177-200.

[5] J.R. Stuff, W.R. Creasy, A.A. Rodriguez, H. Dupont Durst, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 644-651.

[6] Y. Juillet, E. Gibert, A. Bégos, B. Bellier, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 848-856.

[7] R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read, M.T.J. Reid, *J. Chromatogr. A* 662 (1994) 301-321.

[8] S.A. Fredriksson, L.G. Hammarström, L. Henriksson, H.A. Lakso, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 1133-1143.

[9] Q. Liu, X. Hu, J. Xie, *Anal. Chim. Acta* 512 (2002) 93-101.

[10] R.W. Read, R.M. Black, *J. Chromatogr. A* 862 (1999) 169-177.

[11] R.M. Black, R.W. Read, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 233-244.

[12] M. Pumera, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 5-13.

[13] C.A. Boulet, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 909-923, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[14] G.A. Pianetti, M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, *J. Chromatogr.* 630 (1993) 371-377.

[15] S.A. Oehrle, P.C. Bossle, *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 247-252.

[16] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 279-285.

[17] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 245-252.

[18] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, A.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1085-1091.

[19] A.E.F.Nassar, S.V. Lucas, C.A. Myler, A.R. Jones, M. Campisano, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3598-3604.

[20] J.E. Melanson, B.L.Y. Wong, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 920 (2001) 359-365.

[21] R.L. Cheicante, J.R. Stuff, H. Dupont Durst, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 347-352.

[22] W.H. Robins, B.W. Wright, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 667-673.

[23] A.J. Tomlinson, N.A. Guzman, S. Naylor, *J. Cap. Elec.* 2 (1995) 247-265.

[24] J.E. Melanson, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1809-1813.

[25] C.L. Copper, G.E. Collins, *Electrophoresis* 25 (2004) 897-902.

[26] J. Jiang, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 239-244.

[27] C.E. Kientz, E.W.J.Hooijshuur, U.A.Th. Brinkman, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997) 253-259.

[28] T.E. Rosso, P.C. Bossle, *J. Chromatogr. A* 824 (1998) 125-134.

[29] J. Wang, M. Pumera, G.E. Collins, A. Mulchandani, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6121-6125.

[30] R. Kostiainien, A.P. Bruins,V.W.A. Häkkinen, *J. Chromatogr.* 634 (1993) 113-118.

[31] J.P. Mercier, P. Chaimbault, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 71-80.

[32] R.G. Cooks, A.L. Rockwood, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5 (1991) 53-53.

[33] C. Montauban, A. Bégos, B. Bellier, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2791-2796.

[34] G.A. Pianetti, A. Baillet, F. Traore, G. Mahuzier, *Chromatographia* 36 (1993) 263-267.

[35] M.-L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Valko, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 155-170.

[36] C.W. Huie, *Electrophoresis* 24 (2003) 1508-1529.

[37] F. Steiner, M. Hassel, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 131-142.

[38] F. Wang, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 277-293.

[39] C. Schwer, E. Kenndler, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1801-1807.

[40] P.B. Wright, A.S. Lister, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3251-3259.

[41] M. Vaher, M. Koel, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 83-88.

[42] S. Cherkaoui, E. Varesio, P. Christen, J.L. Veuthey, *Electrophoresis* 19 (1998) 2900-2906.

[43] C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 319-337.

[44] P. Gebauer, P. Boček, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1557-1563.

[45] P.D. Grossman and J. C. Colburn Ed., *Capillary Electrophoresis*, pp 112-113, Academic Press, San Diego 1992.

[46] C.W. Klampfl, W. Ahrer, *Electrophoresis* 22 (2001) 1579-1584.

[47] A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345-357.

[48] T.E. Wheat, K.A. Lilley, J.F. Banks, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 99-105.

[49] L.Geiser, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 111-121.

[50] H. Sawada, C. Nogami, *Anal.Chim. Acta* 507 (2004) 191-198.

[51] K. Vuorensola, J. Kokkonen, H. Sirén, R.A. Ketola, *Electrophoresis* 22 (2001) 4347-4354.

[52] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis* 25 (2004) 3441-3449.

[53] D.R. Zook, E.P. Grimsrud, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2 (1991) 232-239.

[54] J.-P. Mercier, P. Morin, M. Dreux, *Chimia* 53 (1999) 511-514.

[55] P.C. Crofts, G.M. Kosolapoff, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 3379-3382.

[56] J.-P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *Chromtagrophia* 38 (1998) 1-6.

[57] B.L.M. van Baar, A.G. Hulst, E.R.J. Wils, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 1104-1108.

# Chapitre III

# Identification d'acides alkylphosphoniques et alkyl alkylphosphoniques isomères dans des extraits de sol par CE-MS-MS et amélioration de la sensibilité dans l'eau pure par FASS

## 1. Introduction

Les expériences CE-MS-MS qui ont été décrites dans le chapitre précédent se sont avérées particulièrement utiles pour l'identification des acides alkyl alkylphosphoniques isomères non-séparés par électrophorèse capillaire et présents dans l'eau pure. Le travail présenté dans ce chapitre III montre les résultats obtenus en CE-MS-MS pour l'identification des analytes présents, cette fois, dans un extrait de sol dopé initialement à 5 $\mu g.g^{-1}$.

Le deuxième point développé dans ce chapitre concerne l'amélioration de la sensibilité en CE-MS. En électrophorèse capillaire, la sensibilité est en effet limitée par le faible volume d'injection (quelques nanolitres) qui ne doit pas dépasser 1 % à 2 % du volume du capillaire pour éviter une détérioration de la forme des pics et une perte de résolution. Par ailleurs, l'efficacité d'ionisation, qui est particulièrement faible pour les acides alkylphosphoniques de plus faible masse (les acides éthylphosphonique et méthylphosphonique en particulier) limite aussi l'intensité du signal. Il est donc apparu nécessaire d'utiliser une méthode de préconcentration des composés. Parmi les différentes techniques de préconcentration qui ont été présentées dans la partie I.5, la technique de FASS (cf. paragraphe I.5.1.1) est la plus simple à mettre en œuvre. Des expériences de préconcentration des acides alkylphosphoniques et alkyl alkylphosphoniques dilués dans de l'eau pure par FASS ont donc été menées pour montrer la faisabilité de cette technique qui pourrait permettre d'améliorer la sensibilité.

# 2. Article

## CE–MS-MS FOR THE IDENTIFICATION OF CHEMICAL WARFARE AGENT DEGRADATION PRODUCTS

Mélanie Lagarrigue[1], Anne Bossée[1], Arlette Bégos[1], Anne Varenne[2], Pierre Gareil[2], Bruno Bellier[1]

*LC-GC North America* 25 (2007) 2-6.

[1] Département Analyse Chimique, Centre d'Etudes du Bouchet (DGA), 5 rue Lavoisier, BP 3, 91710 Vert-le-Petit

[2] Laboratoire Electrochimie et Chimie Analytique, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (UMR CNRS 7575), 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05

**Abstract**

The terrorist threat has encouraged the development of analytical techniques for the detection and identification of chemical warfare agent degradation products. Capillary electrophoresis (CE) presents interesting features such as high separation efficiency, low sample consumption, and electrophoretic separation principles that are very complementary to those of the most commonly used chromatographic techniques. Its hyphenation with mass spectrometry (CE–MS) provides very powerful identification capabilities, explaining the growing interest in CE–MS for a wide range of applications. A CE–MS method was thus developed in this work for the identification of phosphonic acids present in purified water and soil extracts. CE–MS-MS appeared to be a particularly efficient tool for the identification of isomeric alkyl alkylphosphonic acids. Moreover, analytes can be easily preconcentrated in-capillary by using field-amplified sample stacking to enhance sensitivity in low-conductivity matrices.

## 2.1 Introduction

The different conflicts of the 20th century were marked by the use of chemical weapons. Therefore, the Chemical Weapons Convention (CWC) was signed in 1993 and came into force in 1997 in order to prohibit the development, production, stockpiling and use of chemical warfare agents [1]. But today, the use of chemical weapons by terrorist organizations represents a great threat. Thus, the development of analytical techniques for the detection and identification of chemical warfare agents has become essential.

Chemical weapons are divided into four groups: vesicant (mustard gas), nerve (tabun, sarin, soman, VX, and so forth), blood (hydrogen cyanide), and incapacitating agents. Nerve agents, which are the most lethal chemicals, generally are hydrolyzed over time to first produce alkyl alkylphosphonic acids and then alkylphosphonic acids (Figure 1a) that can be used to identify the present nerve agent. Gas chromatography (GC) has been used widely for the detection of nerve agents but the analysis of their degradation products, which are less volatile and more polar, requires a time consuming chemical derivatization [2]. Liquid chromatography (LC) avoids the derivatization of the degradation products but very polar compounds generally are separated with more difficulty in the most commonly used reversed-phase mode.

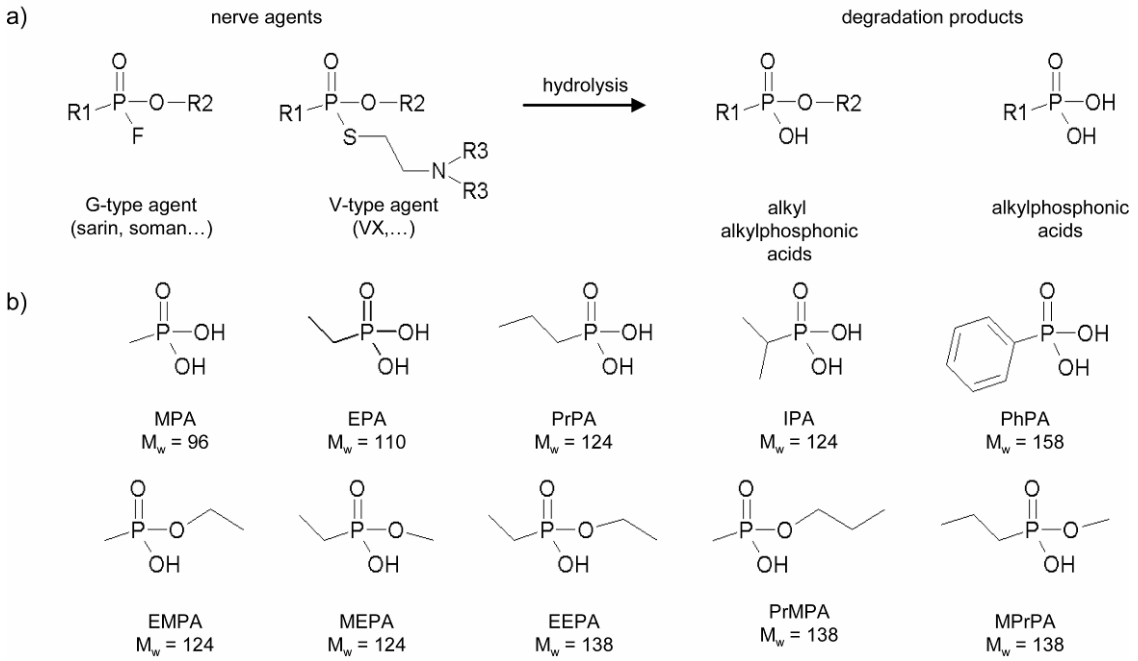



**Figure 1 :** a) Nerve agent degradation pathway and b) structures of the studied phosphonic acids. M=methyl, E=ethyl, Pr=propyl, I=isopropyl, Ph=phenyl, PA=phosphonic acid.

Capillary electrophoresis (CE) represents an interesting alternative technique for the analysis of nerve agent degradation products because CE intrinsically allows the separation of charged or polar species. Moreover, CE is known to provide high separation efficiency thanks to the flat profile of the electroosmotic flow through the capillary. Sample consumption is very limited with typical sample injection volumes between 1 and 20 nL. Therefore, CE with indirect UV detection has been successfully used for the separation of phosphonic acids [3-10].

The major drawback of CE is the limited sensitivity achieved with the commonly used UV detection. This is due to the very low injected sample amount and to the small inner diameter of the capillary (25–100 µm), representing a very short optical pathlength for the UV detection. Different electrophoretic preconcentration techniques can be employed to enhance sensitivity, such as field-amplified sample stacking (FASS), transient isotachophoresis (tITP), or sweeping [11]. More sensitive detection techniques can also be used, such as laser-induced fluorescence (LIF), requiring the derivatization of the analytes or mass spectrometry (MS). CE-MS is particularly interesting thanks to the powerful identification and structural characterization capabilities of MS.

The great potential of CE-MS has encouraged the development of CE-MS interfaces most commonly involving the use of electrospray ionization (ESI) sources. Liquid junction CE-MS interfaces (Figure 2a) were developed in 1988 [12] but presented drawbacks such as peak broadening. Sheath liquid coaxial interfaces (Figure 2b) were developed in 1987 [13] and are now the most used because they are easy to use and commercially available. Sheath liquid is required for the electric contact and the formation of a stable electrospray, the CE flow-rate being by far too low, but it causes partial dilution of the analytes reducing the sensitivity. To avoid this dilution, sheathless CE-MS interfaces have been developed to allow the use of nanospray ionization sources that are compatible with the low CE flow-rates and are known to provide better ionization efficiencies. The major difficulty is the establishment of the electric contact that can be ensured by an in-capillary electrode (Figure 2c) [14] or by a gold-coated nanospray tip (Figure 2d) [15]. Moreover, sheathless interfaces generally have a limited life-time (less than 1 h), but several groups are working on their life enhancement [16]. Finally, CE-MS interfaces also have been developed for microsystems including a CE separation and an ESI emitter [17] or for CE-matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) coupling [18].

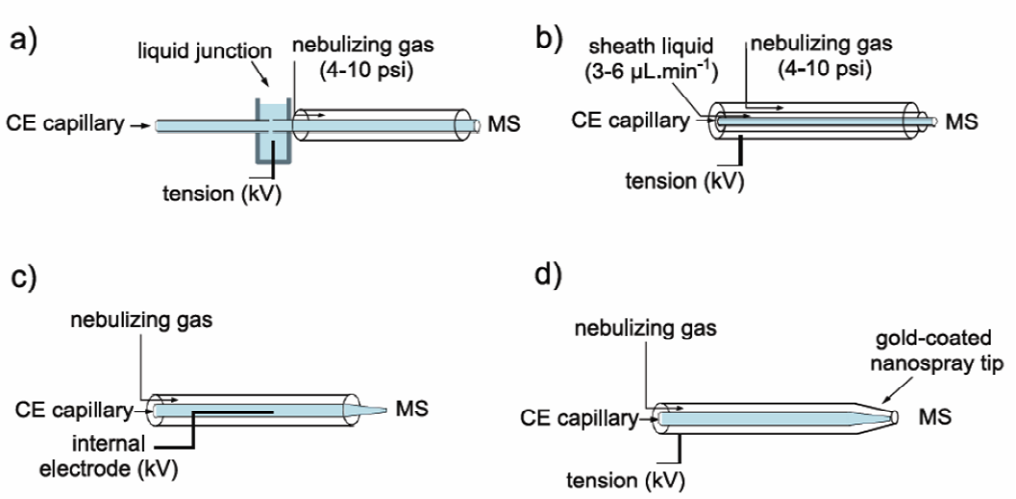



**Figure 2 :** Different CE-MS interfaces a) liquid junction interface b) sheath liquid coaxial interface c) sheathless interface with internal electrode and d) sheathless interface with gold-coated nanospray tip.

Despite this growing interest in CE-MS, only Kostiainen and colleagues [19] and Mercier and colleagues [20] have reported the use of this technique for the identification of phosphonic acids in purified or tap water. During the present work, a CE-MS method was developed for the detection and identification of phosphonic acids in pure water and soil extracts. The selectivity and identification capabilities of CE-MS-MS were evaluated by introducing several isomeric analytes (Figure 1b) in the sample. Finally, field-amplified sample stacking was carried out for sensitivity enhancement in low-conductivity matrices.

## 2.2 Experimental

### *2.2.1 Chemicals*

The structures of the studied phosphonic acids are presented in Figure 1b. PrMPA, MPrPA, EEPA, EMPA, MEPA and IPA were produced at the Centre d'Etudes du Bouchet (Vert-le-Petit, France) at >99 % purity ($^{31}$P NMR). MPA, EPA, PrPA and PhPA were purchased from Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

### *2.2.2 Electrolyte*

The separation electrolyte was composed of 15 mM ammonium formate (Fluka, Buchs, Switzerland) adjusted to pH 8.8 with 25 % ammonium hydroxide solution (Merck, Darmstadt, Germany). Purified water used throughout was obtained from an alpha-Q system (Millipore,

St Quentin en Yvelines, France). Electrolytes were filtered through a 0.2 µm PVDF membrane filters (Pall Life Sciences, MI, USA) before use.

### *2.2.3 Apparatus*

CE separations were performed with a $HP^{3D}CE$ (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) in 50 µm i.d. x 85 cm bare fused-silica capillaries (Agilent Technologies). Polyimide coating was removed from the outlet of the capillary (1 cm) to promote the formation of a stable electrospray. Analytes were hydrodynamically injected (50 mbar, 10 s), the separation voltage was set to +20 kV and the temperature to 22°C. Between runs, capillaries were rinsed with electrolyte for 3 min.

An Esquire 3000 ion trap mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray ionization (ESI) source was used in the negative ionization mode. Nitrogen was used as nebulizing gas (7 psi) and drying gas (200°C, 5 $L.min^{-1}$). ESI source voltages were as follows: spray needle at +3.5 kV, end plate offset at -500 V, capillary exit offset at -40 V, skimmer 1 at -20 V, skimmer 2 at -10 V, low mass cut-off at 50 Th. Ion accumulation time was automatically set with ion charge control (ICC) with a target of 10000 to avoid space-charge effects. The analytical scan range for mass spectra was m/z 50-500 Th. A sheath liquid coaxial interface (Agilent Technologies) was used for CE-MS coupling. The sheath liquid, composed of (75:25:2, v/v/v) methanol-water-ammonium hydroxide mixture, was delivered at 4 $\mu L.min^{-1}$ by a syringe pump (Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois).

### *2.2.4 Soil sample treatment*

Soil samples (10 g) were spiked with the analytes at 5 $\mu g.g^{-1}$ and subjected to pressure-assisted solvent extraction with water at 150 bar and 100°C [21] in a Dionex ASE 200 instrument (Voisins le Bretonneux, France). Soil extracts were next percolated through a cation exchange cartridge (AG50WX8 resin, Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), then concentrated by partial solvent evaporation to a volume of 1 mL and finally filtered through a 0.45 µm nylon membrane filters before analysis.

## 2.3 Results and discussion

### *2.3.1 Optimization of analytical conditions*

A sample composed of alkylphosphonic acids MPA ($M_w$=96 g.mol$^{-1}$), EPA ($M_w$=110 g.mol$^{-1}$), PrPA ($M_w$=124 g.mol$^{-1}$), PhPA ($M_w$=158 g.mol$^{-1}$) diluted in a (1:1, v/v) methanol-water mixture at 1 µg.mL$^{-1}$ was analyzed by direct introduction in the mass spectrometer to optimize the source and ion trapping conditions in the negative ionization mode, providing the best responses of these analytes. The corresponding MS spectrum reported in Figure 3 showed that, as already observed by Kostiainen *et al.* [19], the abundance of the pseudomolecular ions corresponding to the analytes decreased as the number of carbons in the alkyl chain decreased, due to a decreasing ionization efficiency.

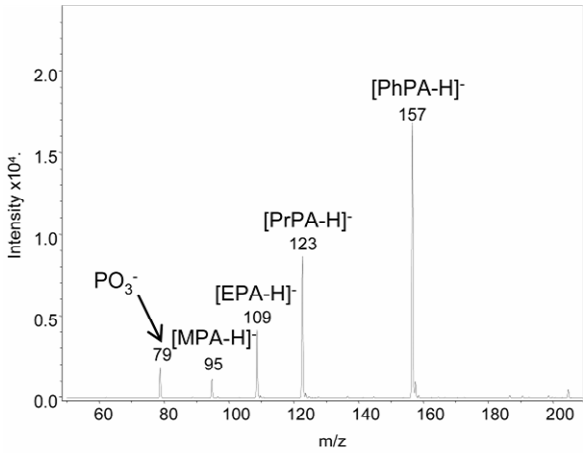



**Figure 3 :** MS spectrum obtained by direct introduction of a sample composed of alkylphosphonic acids MPA ($M_w$=96 g.mol$^{-1}$) , EPA ($M_w$=110 g.mol$^{-1}$), PrPA ($M_w$=124 g.mol$^{-1}$), PhPA ($M_w$=158 g.mol$^{-1}$) diluted in a (1:1, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture at 1 µg.mL$^{-1}$. The optimized source and ion trapping conditions are described in experimental section.

Nebulization gas pressure was optimized during CE-MS experiments because of the suction effect influencing the migration times and resolution. The sheath liquid composition and flow-rate strongly affect sensitivity. Different solvent mixtures (acetonitrile, methanol, isopropanol, water) were tested and best signal-to-noise ratios were obtained with a (3:1, v/v) methanol-water mixture containing 2 % ammonium hydroxide solution to favor the deprotonation of the analytes improving the pseudomolecular ion abundances. A flow-rate of 4 µL.min$^{-1}$ provided the best compromise between the formation of a stable spray and an acceptable dilution of the analytes.

The separation electrolyte is an essential parameter for CE analysis. Its pH determines the ionization degree of the analytes, which influences their electrophoretic mobilities and consequently, can affect the selectivity strongly. We demonstrated in a previous work [22] with CE-UV experiments that a pH 8.8 electrolyte provided a baseline separation of all alkylphosphonic acids, and particularly the IPA and PrPA isomers due to their different acidity constants inducing different ionization degrees. The electrolyte pH also determines the ionization of the silanol groups of the capillary wall, which controls the electroosmotic flow and, hence, the analysis time. The electrophoretic mobility of the electrolyte co-ion is also very important because it influences peak shape. However, CE-MS requires the use of volatile electrolyte co-ions (carbonate, acetate or formate), thus reducing the choice for electrolyte species. The final electrolyte composition for this work was 15 mM ammonium formate adjusted to pH 8.8 with 25 % ammonium hydroxide solution.

### *2.3.2 CE-MS-MS analysis of soil extracts*

A local soil sample spiked with the 10 analytes (Figure 1b) at a concentration of 5 $\mu g.g^{-1}$ was subjected to pressure-assisted solvent extraction, then percolated through a cation exchange cartridge and next concentrated by partial solvent evaporation to a volume of 1 mL (see conditions described in experimental section). The obtained aqueous soil extract finally was analyzed by CE-MS in the optimized conditions described previously.

The obtained CE-MS electropherogram (Figure 4a) displayed few interfering species from the soil matrix. Contrary to the alkylphosphonic acids that were all separated by CE, the isomeric alkyl alkylphosphonic acids were not separated because of their very close acidity constants, inducing very close charge states. CE-MS-MS experiments were then carried out and revealed the formation of three fragment ions at m/z 109, m/z 105 and m/z 95 from the precursor ion m/z 137 corresponding to the first peak (EEPA, PrMPA, MPrPA) and the formation of two fragment ions at m/z 91 and m/z 95 from the precursor ion m/z 123 corresponding to the second peak (MEPA, EMPA) (Figure 4b). The detailed study of the fragmentations of each isomeric alkyl alkylphosphonic acid was realized by direct introduction and reported previously [22]. This allowed us to specifically attribute the fragment ions m/z 109, m/z 105 and m/z 95 observed from the precursor ion m/z 137 to EEPA, PrMPA and MPrPA, respectively. In the same way, the fragment ions m/z 91 and m/z 95 observed from the precursor ion m/z 123 corresponded to EMPA and MEPA, respectively.

Finally, CE-MS-MS experiments provided an unambiguous identification of each comigrating isomeric alkyl alkylphosphonic acid in soil extracts without interference from soil ions, illustrating the great capabilities of MS for identification. On the other hand, CE separation was mandatory for the identification of isomeric alkylphosphonic acids, which led to the same fragment ion and could not be differentiated by MS-MS.

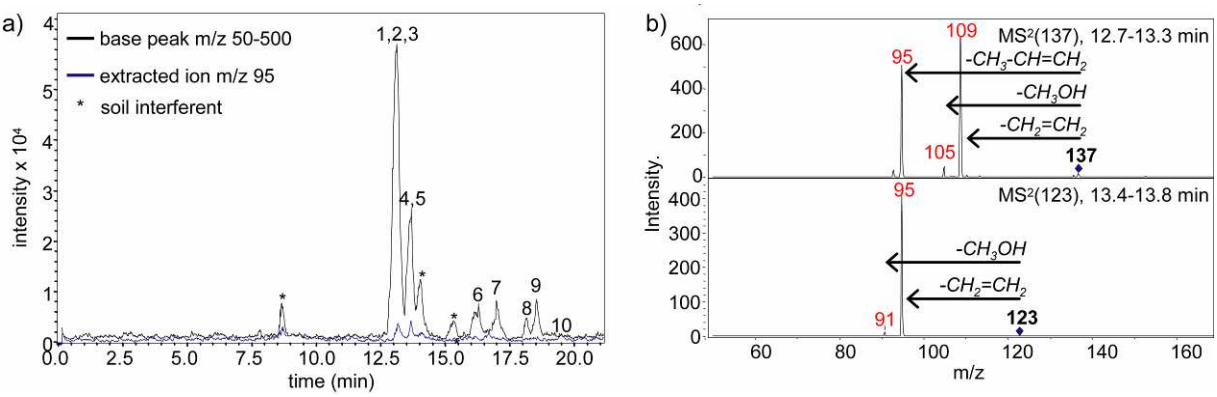



**Figure 4 :** a) Electropherogram corresponding to the analysis of a local soil sample spiked with alkyl- and alkyl alkylphosphonic acids at 5 µg.g$^{-1}$ each. b) MS-MS spectra corresponding to the alkyl alkylphosphonic acids. Separation electrolyte: 15 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8. Separation voltage: +20 kV. Hydrodynamic injection (50 mbar, 10 s).

### *2.3.3 Sensitivity enhancement in spiked water.*

All analytes were detected at 5 µg.g$^{-1}$ in spiked soil samples thanks to the concentration step of the extraction treatment. Nevertheless, in pure water, the smallest analytes were hardly detected under a concentration of 50 µg.mL$^{-1}$ (Figure 5a). The sensitivity was first limited by the decreasing ionization efficiency as the size of the analyte decreased, but also by the very low injected sample amount. Indeed, in the absence of stacking, the maximum injection volume is 1-2 % of the capillary volume to avoid resolution loss and peak shape deterioration. Different electrophoretic techniques can be carried out for in-capillary sample preconcentration [11]. The simplest one is field-amplified sample stacking (FASS) [23,24] which is achieved by using a separation electrolyte of higher conductivity than the sample solution. This provides a lower electric field in the electrolyte zone than in the sample zone ($E=j/\kappa$). Consequently, the analytes slow down when they reach the boundary between the low-conductivity sample zone and the high-conductivity electrolyte zone. The analytes are thus concentrated into a narrow zone at this boundary, authorizing the injection of larger sample volumes. As a proof of feasibility, a sample of pure water spiked with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$ was injected hydrodynamically at 50 mbar for 80 s, which represents a 8-fold

increase in sample volume (5 % of the capillary volume) as compared with previous standard injection conditions. Injection times up to 150 s were tested but did not provide better peak heights. The obtained electropherogram (Figure 5b) showed that all analytes were stacked perfectly without any loss of resolution and detected at the 5 µg.mL$^{-1}$ level, demonstrating an 8-fold sensitivity enhancement in pure water. Note that FASS cannot be used with this separation electrolyte to enhance sensitivity in soil extracts because of their too high conductivity.

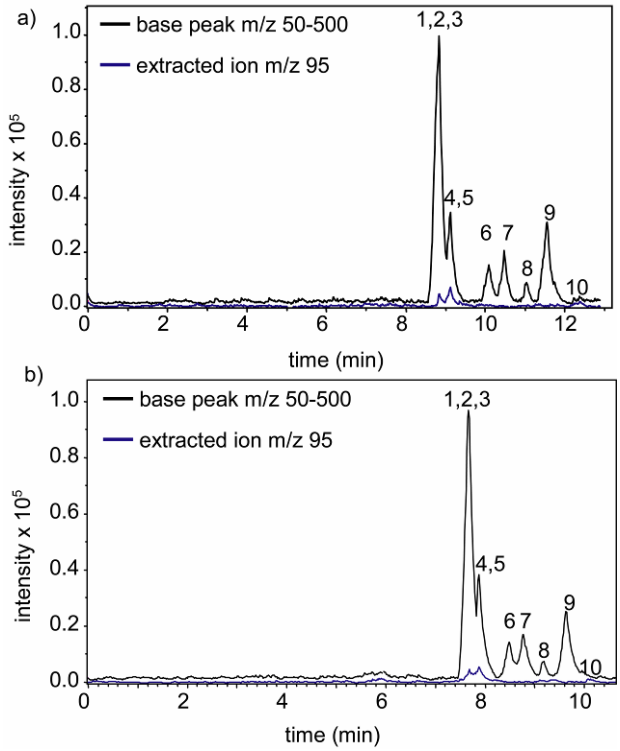



**Figure 5 :** Electropherogram of a standard mixture of ten alkyl- and alkyl alkylphosphonic acids at (a) 50 µg.mL$^{-1}$ each and (b) 5 µg.mL$^{-1}$ each in pure water. Separation electrolyte: 15 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8. Separation voltage: +20 kV. Hydrodynamic injection: (a) 50 mbar, 10 s; (b) 50 mbar, 80 s. 1:EEPA ; 2:MPrPA ; 3:PrMPA ; 4:MEPA ; 5:EMPA ; 6:IPA ; 7:PrPA ; 8:EPA ; 9:PhPA ; 10:MPA.

## 2.4 Conclusions

CE-MS-MS has appeared to be a powerful tool for the detection and identification of phosphonic acids in contaminated soil sample. Indeed, isomeric co-migrating alkyl alkylphosphonic acids are differentiated by specific fragment ions. On the other hand, the identification of the isomeric alkylphosphonic acids IPA and PrPA was only provided by CE selectivity. All analytes can be easily detected at a level of 5 µg.g$^{-1}$ in soil samples thanks to the extraction treatment and at a level of 5 µg.mL$^{-1}$ in low-conductivity aqueous matrices, applying FASS. Sensitivity could be further improved in aqueous matrices and soil extracts by implementing other preconcentration techniques such as transient isotachophoresis.

## 3. Conclusion

Ce travail montre que des expériences CE-MS-MS peuvent être réalisées pour identifier de manière univoque des acides alkyl alkylphosphoniques isomères présents dans des extraits de sol, malgré la présence des interférents de cette matrice. Par ailleurs, les expériences de préconcentration par FASS ont permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 8 dans l'eau pure. Cependant, la technique FASS développée n'a pas pu être appliquée à la préconcentration des analytes contenus dans des extraits de sol en raison de la conductivité trop élevée de cette matrice.

Ces premiers résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour utiliser la préconcentration par FASS dans des matrices environnementales de faible conductivité mais montrent aussi qu'une autre technique de préconcentration doit être envisagée pour la préconcentration des analytes dans des matrices plus conductrices telles que les extraits de sol ou des matrices biologiques.

## 4. Références

[1] *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis*, Ed. M. Mesilaakso, Wiley, Chichester 2005.

[2] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 177-200.

[3] G.A. Pianetti, M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, *J. Chromatogr.* 630 (1993) 371-377.

[4] S.A. Oehrle, P.C. Bossle, *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 247-252.

[5] R.L. Cheicante, J.R. Stuff, H. Dupont Durst, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 347-352.

[6] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 279-285.

[7] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 245-252.

[8] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, A.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1085-1091.

[9] A.E.F.Nassar, S.V. Lucas, C.A. Myler, A.R. Jones, M. Campisano, L.D. Hoffland, *Anal. Chem*. 70 (1998) 3598-3604.

[10] J.E. Melanson, B.L.Y. Wong, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 920 (2001) 359-365.

[11] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresi*s 24 (2003) 466-485.

[12] E.D. Lee, W. Muck, J.D. Henion, T.R. Covey, *J. Chromatogr.* 458 (1988) 313-321.

[13] J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.

[14] P. Cao, M. Moini, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8 (1997) 561-564.

[15] Z. Kele, G. Ferenc, E. Klement, G.K. Toth, T. Janaky, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 881–885.

[16] J.L. Edwards, C.N. Chisolm, J.G. Shackman, R.T. Kennedy, *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 80–88.

[17] A.P. Dahlin, M. Wetterhall, G. Liljegren, S.K. Bergstrom, P. Andren, L. Markides, J. Bergquist, *Analyst* 130 (2005) 193–199.

[18] T. Wehr, *LCGC* 21 (2003) 974–982.

[19] R. Kostiainen, A.P. Bruins, V.W.A. Häkkinen, *J. Chromatogr.* 634 (1993) 113–118.

[20] J.-P. Mercier, P. Chaimbault, P. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 71–80.

[21] C. Montauban, A. Bégos, B. Bellier, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2791–2797.

[22] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 110-118.

[23] R. Chien, D.S. Burgi, *J. Chromatogr.* 559 (1991) 153–161.

[24] D.S. Burgi and R. Chien, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2042–2047.

# Chapitre IV

# Amélioration de la sensibilité dans des matrices de faible conductivité par FASS en CE-MS

## 1. Introduction

La technique de préconcentration par FASS qui a été décrite dans le chapitre III présente quelques limitations. En effet, selon cette première procédure de FASS, la conductivité de l'échantillon est déterminée par la concentration des analytes. Or, le rapport de conductivité entre l'électrolyte et l'échantillon influence fortement les performances du processus de FASS en termes de concentration et de résolution. En conséquence, les résultats obtenus en utilisant cette technique peuvent varier selon la concentration des analytes, ce qui est incompatible avec la réalisation d'analyses quantitatives. Par ailleurs, le pH de l'échantillon constitué des acides alkylphosphoniques et alkyl alkylphosphoniques dilués dans l'eau pure est aussi déterminé par la concentration des analytes (pH 4 environ). Cette différence importante de pH entre l'électrolyte et l'échantillon génère des perturbations (écoulements laminaires) néfastes pour la résolution. Le travail présenté dans ce chapitre a donc pour objectif de développer une nouvelle procédure de préconcentration par FASS qui procure une répétabilité et une linéarité du signal satisfaisantes, permettant d'envisager l'utilisation de cette méthode pour des analyses quantitatives.

Le principe de la nouvelle procédure de FASS décrite dans ce chapitre consiste à introduire dans l'échantillon une solution de formiate d'ammonium, dont la concentration permet de fixer la conductivité et le pH de l'échantillon aux valeurs désirées. Il est ainsi possible de contrôler la valeur du rapport de conductivité entre l'électrolyte et l'échantillon qui influence les performances de la préconcentration par FASS et de pouvoir obtenir un pH homogène dans tout le capillaire permettant de limiter les écoulements laminaires responsables d'une perte de résolution. Cette nouvelle méthode de FASS a été développée dans un premier temps pour la préconcentration des analytes dans l'eau pure, puis appliquée à des matrices environnementales de faible conductivité : l'eau potable et l'eau de rivière.

## 2. Article

### FIELD-AMPLIFIED SAMPLE STACKING FOR THE DETECTION OF CHEMICAL WARFARE AGENT DEGRADATION PRODUCTS IN LOW-CONDUCTIVITY MATRICES BY CE-MS.

Mélanie Lagarrigue[1], Anne Bossée[1], Arlette Bégos[1], Nathalie Delaunay[2], Anne Varenne[2], Pierre Gareil[2*], Bruno Bellier[1]

Journal of Chromatography A, submitted

[1] Département Analyse Chimique, Centre d'Etudes du Bouchet (DGA), 5 rue Lavoisier BP 3 91710 Vert-le-Petit

[2] Laboratoire Electrochimie et Chimie Analytique, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (UMR CNRS 7575), 11 rue Pierre et Marie Curie 75231 Paris cedex 05

**Abstract**

Preconcentration of chemical warfare agent degradation products (alkylphosphonic acids and alkyl alkylphosphonic acids) in low-conductivity matrices (purified water, tap water and local river water) by field-amplified sample stacking (FASS) was developed for capillary electrophoresis (CE) coupled to ion trap mass spectrometry. FASS was performed by adding a mixture of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$ in appropriate concentrations to the sample. This allowed to control the conductivity and the pH of the sample in order to obtain FASS performances that are independent of analyte concentration. The influence of different parameters on FASS (conductivity ratio between the sample and the BGE, injection volume and concentration of BGE) was studied to determine the optimal conditions and was rationalized by using the theoretical model developed by Burgi and Chien. A good correlation was obtained between the bulk electroosmotic velocity predicted by this model and the experimental value deduced from the migration time of the electroosmotic flow marker detected by MS. This newly developed method was successfully applied to the analysis of tap water and local river water fortified with the analytes and provided a 10-fold sensitivity enhancement in comparison to the signal obtained without preconcentration procedure. The quite satisfactory repeatability and linearity for peak areas obtained in the 0.5-5 $\mu g.mL^{-1}$ concentration range allow quantitative analysis to be implemented. Limits of detection of 0.25 to 0.5 $\mu g.mL^{-1}$ for the alkyl alkylphosphonic acids and of 0.35 to 5 $\mu g.mL^{-1}$ for the alkylphosphonic acids were reached in tap water and river water.

**Key-words:** alkylphosphonic acids, CE-MS, chemical warfare agent degradation products, environmental matrices, field-amplified sample stacking.

## 2.1 Introduction

Alkyl alkylphosphonic acids ($R_1$-P(O)(OH)($OR_2$)) and alkylphosphonic acids ($R_1$-P(O)$(OH)_2$) result from the hydrolysis of G-type and V-type nerve agents such as tabun, sarin, soman and VX over time. These nerve agent degradation products are subjected to the Chemical Weapons Convention (CWC) [1] which entered into force in April 1997. The Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) ensures the compliance with the CWC by proceeding to inspections, on-site analysis and sampling followed by off-site analysis that can be performed by a network of expert laboratories which are regularly subjected to OPCW proficiency tests. The most widely used separation techniques that are employed for the determination of chemical warfare agents and their degradation products are gas chromatography and liquid chromatography [2]. Although less used, capillary electrophoresis (CE) displays specific interests for the analysis of chemicals related to the CWC thanks to its intrinsic capabilities for the analysis of polar compounds such as phosphonic acids, its high separation efficiency, very low sample consumption and separation principles which are very different, and consequently very complementary to those of chromatographic techniques. Several articles have thus reported the use of CE for the analysis of nerve agent degradation products [3]. Because these compounds are generally devoid of chromogenic groups, they have often been detected using indirect UV detection [4-11]. However, the sensitivity of conventional UV-vis detection is limited by the very short optical path length corresponding to the small inner diameter of the capillary (25-100 µm). Consequently, more sensitive detection techniques have been used for the detection of nerve agent degradation products such as conductivity [6,7,12], laser-induced fluorescence [13,14], flame photometric detection [15,16] and mass spectrometry (MS) [17-19]. The latter is particularly interesting because it provides very powerful identification capabilities. The great complementary of CE and MS for the identification of chemicals related to the CWC was reported in our previous works [20,21].

Sensitivity can also be improved by using in-capillary preconcentration techniques which allows to increase the injected sample volume. This volume is usually limited to ca 1 % of the capillary volume in the absence of preconcentration procedures to avoid resolution loss and

peak shape alteration. The different preconcentration techniques that can be used in CE are widely described in the literature [22-26] and generally rely on the same principle, namely the reduction of a large injected sample plug into narrow and concentrated zones of analytes. The simplest preconcentration technique is field-amplified sample stacking (FASS) which only requires the use of a background electrolyte (BGE) of higher conductivity than the sample. The fact that local electric field is inversely proportional to conductivity results in a high electric field in the hydrodynamically injected sample zone, providing a high analyte velocity in this low-conductivity region. Consequently, when analytes penetrate into the low electric field of the BGE zone, they slow down and are concentrated into narrow bands. The conductivity ratio between the BGE and the sample ($\gamma$ ratio) strongly influences the performances of FASS with respect to sensitivity enhancement and resolution.

In a previous article, we described the development and optimization of a CE-MS method for the detection and identification of chemical warfare agent degradation products (alkyl alkylphosphonic acids and alkylphosphonic acids) in pure water and soil extracts [20]. Good identification capabilities were obtained, particularly when using CE-MS-MS for the identification of co-migrating isomeric alkyl alkylphosphonic acids, but the sensitivity was limited by the low injected sample amount and the relatively low ionization efficiency obtained for analytes of low m/z ratios (ethylphosphonic acid and methylphosphonic acid). Thus, a brief investigation of FASS was undertaken for the preconcentration of alkyl alkylphosphonic and alkylphosphonic acids in water prior to CE-MS. This approach, however, presented two drawbacks. First, the important difference between the pH of the sample (about 4) and that of the BGE (8.8) led to a detrimental mismatch of the electroosmotic velocities between these two zones, thus limiting the injected volume to ca 5 % of the capillary volume. Secondly, the conductivity and the pH of the sample depended on analyte concentration. This induced a variation of the $\gamma$ ratio and consequently of FASS performances with analyte concentration, which is incompatible with quantitative analysis. In the present work, a more detailed investigation of various parameters (BGE composition, $\gamma$ ratio, injection volume) has been performed, so that overall FASS performances can be controlled independently of analyte concentration, in compliance with quantitative analysis requirements. Finally, this newly developed method was successfully applied to environmental low-conductivity matrices (local tap and river waters).

## 2.2 Experimental

### *2.2.1 Chemicals and sample solutions*

Methylphosphonic acid (MPA, purity ≥98 %), ethylphosphonic acid (EPA, purity ≥98 %), propylphosphonic acid (PrPA, purity ≥95 %), phenylphosphonic acid (PhPA, purity ≥98 %) and ethyl methylphosphonic acid (EMPA, purity ≥98 %) were purchased from Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Isopropylphosphonic acid (IPA), methyl ethylphosphonic acid (MEPA), ethyl ethylphosphonic acid (EEPA), methyl propylphosphonic acid (MPrPA) and propyl methylphosphonic acid (PrMPA) were synthesized at the Centre d'Etudes du Bouchet and were ≥98 % purity ($^{31}$P NMR). The structures of the analytes are reported in Table 1. Ammonium formate (purity ≥99 %) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Formamide and anhydrous D(+)-glucose used as electroosmotic flow markers were purchased from Aldrich. Methanol (HPLC grade), 25 % w/w ammonium hydroxide solution and 1 M sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water used throughout was obtained from an alpha-Q system (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Stock solutions of phosphonic acids were prepared by diluting the compounds in water at a concentration of 10 mg.mL$^{-1}$. The samples analyzed by CE-MS were prepared from these stock solutions diluted in the different studied matrices (purified water, tap water, local river water) to obtain final concentrations of analytes ranging from 0.5 to 5 µg.mL$^{-1}$. The mixtures of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$, that were used to control the pH and the conductivity of the sample, were added in a (1:10, v/v) mixture/sample ratio to limit the dilution of the sample.

| **compound** | **EEPA** | **MPrPA** | **PrMPA** | **MEPA** | **EMPA** | **IPA** | **PrPA** | **EPA** | **PhPA** | **MPA** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **migration order** | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. |
| **$R_1$** | $C_2H_5$ | $(CH_3)(CH_2)_2$ | $CH_3$ | $C_2H_5$ | $CH_3$ | $(CH_3)_2CH$ | $(CH_3)(CH_2)_2$ | $C_2H_5$ | $C_6H_5$ | $CH_3$ |
| **$R_2$** | $C_2H_5$ | $CH_3$ | $(CH_3)(CH_2)_2$ | $CH_3$ | $C_2H_5$ | H | H | H | H | H |
| **$M_w$** (g.mol$^{-1}$) | 138 | 138 | 138 | 124 | 124 | 124 | 124 | 110 | 158 | 96 |
| **[M-H]-** (m/z) | 137 | 137 | 137 | 123 | 123 | 123 | 123 | 109 | 157 | 95 |
| **main fragment ion** (m/z) | 109 | 105 | 95 | 91 | 95 | 79 | 79 | 79 | 79 | 79 |

**Table 1:** Structures of the studied alkyl- ($R_1$-P(O)$(OH)_2$)) and alkyl alkyl- ($R_1$-P(O)(OH)($OR_2$)) phosphonic acids, migration orders and mass-to-charge ratios of the corresponding pseudo-molecular ions and main fragment ions observed on mass spectra in negative ion mode.

### *2.2.2 Instrumentation*

A $HP^{3D}CE$ capillary electrophoretic system (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a UV absorbance diode array detector was used for CE-MS coupling. The employed mass spectrometer was an Esquire 3000 ion trap mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray ionization (ESI) source. The CE-MS hyphenation was carried out with a coaxial sheath liquid interface (Agilent Technologies). The ion trap mass spectrometer was used in the negative ion mode with the following optimized ESI source voltages: spray needle at +3.5 kV, end plate offset at -500 V, capillary exit offset at -40 V, skimmer 1 at -20 V, skimmer 2 at -10 V, low mass cut-off [27] at 50 Th. Ion accumulation time was automatically set with ion charge control with a target of 10000 to avoid space charge effects. The analytical scan range for mass spectra was m/z 50-500 Th. The presented electropherograms corresponded to base peak electropherograms (BPE) m/z 60-160 Th. Nitrogen was used as nebulizing gas at a pressure of 7 psi (1 psi=6894.76 Pa) and as drying gas at a temperature of 200°C and a flow rate of 5 $L.min^{-1}$. The sheath liquid ((75:25:2, v/v/v) $MeOH/H_2O/NH_4OH$) was delivered by a syringe pump (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) at a flow-rate of 4 $\mu L.min^{-1}$. Nebulizing and drying gas were turned off during injection step.

### *2.2.3 Separations conditions*

CE-MS experiments were performed in 50 µm i.d. x 85 cm bare fused-silica capillaries (Agilent Technologies) with 21.5 cm effective length to UV detector. To favor the formation of a stable electrospray, a CE column cutter (Agilent Technologies) was used to obtain a very sharp and orthogonal cut of the capillary ends and the polyimide coating was removed from the outlet of the capillary (1 cm). Prior to first use, bare fused silica capillaries were successively washed with 1 M NaOH and 0.1 M NaOH for 10 min each. After storage, capillaries were flushed with 0.1 M NaOH for 5 min and water for 10 min. Between runs, capillaries were rinsed with electrolyte for 3 min. Electrolytes were filtered through 0.2 µm PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane filters before use. Temperature was set to 22°C and separation voltage was set to +20 kV. Formamide (0.1 % v/v in water) and anhydrous D(+)-glucose (500 $\mu g.mL^{-1}$ in water) were used as electroosmotic flow markers for UV and MS detection, respectively.

The BGEs were composed of 30 mM, 50 mM or 75 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8 with $NH_4OH$ 25 %. Analytes were hydrodynamically injected under 50 mbar for variable injection times. The conductivities of the different BGEs and samples that were used in this study were determined by measuring current intensity as a function of applied voltage within a range where the linearity of Ohm's law was verified. The conductivities were easily deduced from Ohm's law after rearrangement:

$$\kappa = \frac{4LI}{\pi d_c{}^2 V} \quad (1)$$

where I is the measured current intensity, V is the voltage applied to the capillary, $d_c$ is the inner diameter and L is the total length of the capillary. Calibration was realized with solutions of 0.1 M and 0.01 M KCl ($\kappa$=1.288 and 0.1413 $S.m^{-1}$ at 25°C, respectively).

### 2.3 Results and discussion

The sample conductivity is a crucial parameter for FASS experiments because it determines the value of the $\gamma$ ratio ($\gamma=\kappa_{BGE}/\kappa_S$), which strongly influences the performances of FASS. Indeed, ideally, analyte concentration should be enhanced by a factor $\gamma$ [28]. In this work, FASS was performed by adding a mixture of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$ to the sample, so that the sample conductivity was controlled by the added concentrations of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$, and not by the analyte concentration. It was later verified that the conductivities of a blank sample and a sample spiked with the analytes (at 5 $\mu g.mL^{-1}$) were equal after the addition of the same mixture of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$. Moreover, the $HCOONH_4$ and $NH_4OH$ concentrations, that were added to the sample, were selected to adjust sample pH to the same value as that of BGE pH, and hence to limit laminar flow due to difference in the local electroosmotic velocities, which are responsible for a resolution loss.

Optimal conditions of $\gamma$ ratio, injection volume and BGE concentration with respect to detection sensitivity were investigated in CE-MS coupling. Prior to this, the conductivities of different solutions of $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8 with $NH_4OH$ were measured (see section 2.2.3) to determine the conditions for which $\gamma$=5, 10 or 15 with BGEs composed of 30 mM, 50 mM or 75 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8 with $NH_4OH$, as reported in Table 2. Different injection volumes corresponding to 5 %, 10 % or 15 % of the capillary volume were tested.

| | **γ≈5** | **γ≈10** | **γ≈15** |
|---|---|---|---|
| **BGE** | **30 mM $HCOONH_4$ + 10 mM $NH_4OH$ (pH 8.8)** $\kappa$ =0.294 $S.m^{-1}$ ; $\upsilon_{eo}$=1.51 $10^{-3}$ $m.s^{-1}$ | | |
| BGE added to the sample | 5 mM $HCOONH_4$ 1.8 mM $NH_4OH$ | 2 mM $HCOONH_4$ 0.75 mM $NH_4OH$ | 1.4 mM $HCOONH_4$ 0.5 mM $NH_4OH$ |
| $\kappa$ ($S.m^{-1}$) | 0.058 | 0.030 | 0.019 |
| $\upsilon_{eo}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | 2.17 | 2.42 | 2.49 |
| **BGE** | **50 mM $HCOONH_4$ + 16.7 mM $NH_4OH$ (pH 8.8)** $\kappa_{BGE}$ =0.491 $S.m^{-1}$ ; $\upsilon_{eo}$=1.37 $10^{-3}$ $m.s^{-1}$ | | |
| BGE added to the sample | 9 mM $HCOONH_4$ 3 mM $NH_4OH$ | 4 mM $HCOONH_4$ 1.4 mM $NH_4OH$ | 2.25 mM $HCOONH_4$ 0.85 mM $NH_4OH$ |
| $\kappa$ ($S.m^{-1}$) | 0.099 | 0.049 | 0.032 |
| $\upsilon_{eo}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | 1.99 | 2.17 | 2.41 |
| **BGE** | **75 mM $HCOONH_4$ + 23 mM $NH_4OH$ (pH 8.8)** $\kappa_{BGE}$ =0.757 $S.m^{-1}$ ; $\upsilon_{eo}$=1.31 $10^{-3}$ $m.s^{-1}$ | | |
| BGE added to the sample | 15 mM $HCOONH_4$ 10 mM $NH_4OH$ | 6 mM $HCOONH_4$ 2.1 mM $NH_4OH$ | 4.1 mM $HCOONH_4$ 1.5 mM $NH_4OH$ |
| $\kappa$ ($S.m^{-1}$) | 0.151 | 0.074 | 0.049 |
| $\upsilon_{eo}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | 1.86 | 2.12 | 2.22 |

**Table 2:** $HCOONH_4$ and $NH_4OH$ concentrations in BGEs and added to samples, and corresponding conductivities and electroosmotic velocities. Conductivities were measured as described in section 2.2.3, electroosmotic velocities were deduced from the migration time of the electroosmotic flow marker detected by MS.

### *2.3.1 Influence of FASS on electroosmotic velocity*

The CE-MS experiments that were performed in this work revealed that the migration times of phenylphosphonic acid (PhPA), which was taken as model analyte, decreased as the γ ratio and the injection volume increased (Table 3). This can be explained by the increase in the bulk electroosmotic velocity ($\upsilon_b$) which is defined as the average of the local electroosmotic velocities in the low-conductivity sample plug ($\upsilon_{eS}$) and the high-conductivity BGE ($\upsilon_{eBGE}$) weighted by their respective lengths [28,29]:

$$\upsilon_b = x_\alpha \upsilon_{eS} + (1 - x_\alpha)\upsilon_{eBGE} \quad (2)$$

where $x_\alpha = l_{inj}/L$.

The local electroosmotic velocity ($\upsilon_{ei}$) can be expressed as a function of the local electric field in zone i ($E_i$, where i corresponds to the sample zone or to the BGE) and the local electroosmotic velocity measured in homogeneous conditions ($\upsilon_{eoi}$) under the uniform electric field $E_0$ ($E_0$=V/L):

$$\upsilon_{ei} = \upsilon_{eoi} \frac{Ei}{E_0} \quad (3)$$

The local electric field in sample zone ($E_S$) or in BGE ($E_{BGE}$) can be expressed as:

$$E_S = \frac{\gamma E_0}{1+(\gamma-1)x_\alpha} \quad (4)$$

$$E_{BGE} = \frac{E_0}{1+(\gamma-1)x_\alpha} \quad (5)$$

The values of $E_i$, $\upsilon_{ei}$ and $\upsilon_b$ were thus calculated using the experimental values of $\upsilon_{eoi}$ and $\kappa_i$ (Table 2) and were reported in Table 3.

| | $x_\alpha$ | $E_{BGE}$ ($kV.m^{-1}$) | $E_S$ ($kV.m^{-1}$) | $\upsilon_{eBGE}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | $\upsilon_{eS}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | $\upsilon_b$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | $\upsilon_{aBGE}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | $t_{PhPA}^{MS}$ min | $\upsilon_{eo}^{MS}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) | $\upsilon_{eo}^{UV}$ ($10^{-3}$ $m.s^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **a) BGE=30 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8** | | | | | | | | | | |
| **γ=5.1** sample + 5 mM $HCOONH_4$ + 1.8 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 19.52 | 99.8 | 1.3 | 9.2 | **1.7** | 0.40 | 17.0 | **1.7** | 1.5 |
| | 0.10 | 16.67 | 85.3 | 1.1 | 7.9 | **1.8** | 0.68 | 14.5 | **1.8** | 1.6 |
| | 0.15 | 14.55 | 74.4 | 0.9 | 6.9 | **1.8** | 0.89 | 13.4 | **1.8** | 1.6 |
| **γ=9.7** sample + 2 mM $HCOONH_4$ + 0.75 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 16.41 | 158.7 | 1.1 | 16.3 | **1.8** | 0.76 | 15.7 | **1.8** | **1.8** |
| | 0.10 | 12.60 | 121.9 | 0.8 | 12.5 | **2.0** | 1.2 | 11.7 | **2.0** | 2.7 |
| | 0.15 | 10.23 | 98.9 | 0.7 | 10.2 | **2.1** | 1.4 | 10. 8 | **2.1** | **2.1** |
| **γ=15.2** sample + 1.4 mM $HCOONH_4$ + 0.5 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 13.78 | 208.8 | 0.9 | 22.1 | **1.9** | 1.1 | 15.3 | **1.9** | 1.7 |
| | 0.10 | 9.74 | 147.6 | 0.6 | 15.6 | **2.1** | 1.5 | 10.9 | **2.1** | 1.9 |
| | 0.15 | 7.53 | 114.2 | 0.5 | 12.1 | **2.2** | 1.7 | 9.3 | **2.2** | 1.9 |
| **b) [BGE]=50 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8** | | | | | | | | | | |
| **γ=5.0** sample + 9 mM $HCOONH_4$ + 3 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 19.63 | 97.6 | 1.1 | 8.3 | **1.5** | 0.36 | 19.7 | **1.5** | **1.5** |
| | 0.10 | 16.84 | 83.7 | 1.0 | 7.1 | **1.6** | 0.61 | 15.9 | **1.6** | **1.6** |
| | 0.15 | 14.74 | 73.3 | 0.9 | 6.2 | **1.7** | 0.81 | 14.2 | **1.7** | **1.6** |
| **γ=10.1** sample + 4 mM $HCOONH_4$ + 1.4 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 16.17 | 163.4 | 0.9 | 15.1 | **1.6** | 0.71 | 17.1 | **1.6** | **1.6** |
| | 0.10 | 12.31 | 124.5 | 0.7 | 11.5 | **1.8** | 1.1 | 12.9 | **1.8** | **1.8** |
| | 0.15 | 9.94 | 100.5 | 0.6 | 9.3 | **1.9** | 1.3 | 11.2 | **1.9** | **1.9** |
| **γ=15.3** sample + 2.25 mM $HCOONH_4$ + 0.85 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 13.72 | 210.0 | 0.8 | 21.5 | **1.8** | 1.04 | 16.5 | **1.7** | **1.7** |
| | 0.10 | 9.68 | 148.2 | 0.6 | 15.2 | **2.0** | 1.5 | 12.3 | **1.9** | **1.9** |
| | 0.15 | 7.48 | 114.5 | 0.4 | 11.7 | **2.1** | 1.7 | 10.3 | **2.0** | **2.0** |
| **c) [BGE]=75 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8** | | | | | | | | | | |
| **γ=5.0** sample + 15 mM $HCOONH_4$ + 10 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 19.60 | 98.2 | 1.1 | 7.7 | **1.4** | 0.33 | 25.0 | **1.3** | **1.3** |
| | 0.10 | 16.80 | 84.1 | 0.9 | 6.6 | **1.5** | 0.57 | 18.9 | **1.4** | 1.3 |
| | 0.15 | 14.70 | 73.6 | 0.8 | 5.8 | **1.6** | 0.75 | 15.0 | **1.5** | **1.5** |
| **γ=10.3** sample + 6 mM $HCOONH_4$ + 2.1 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 16.07 | 165.2 | 0.9 | 14.9 | **1.6** | 0.70 | 22.9 | 1.4 | 1.4 |
| | 0.10 | 12.20 | 125.5 | 0.7 | 11.3 | **1.7** | 1.1 | 14.6 | **1.6** | 1.5 |
| | 0.15 | 9.84 | 101.1 | 0.6 | 9.1 | **1.8** | 1.3 | 12.4 | **1.8** | **1.8** |
| **γ=15.3** sample + 4.1 mM $HCOONH_4$ + 1.5 mM $NH_4OH$ | 0.05 | 13.73 | 209.8 | 0.8 | 19.8 | **1.7** | 1.06 | 18.1 | 1.5 | 1.5 |
| | 0.10 | 9.69 | 148.1 | 0.5 | 13.1 | **1.9** | 1.3 | 13.1 | **1.8** | 1.7 |
| | 0.15 | 7.49 | 114.4 | 0.4 | 10.8 | **2.0** | 1.6 | 11.4 | **1.9** | 1.7 |

**Table 3:** Bulk electroosmotic velocity ($\upsilon_b$) and laminar flow velocity ($\upsilon_{aBGE}$) calculated according to the model developed by Burgi and Chien [27,28], migration times of PhPA detected in MS ($t_{PhPA}^{MS}$) and experimental values of the electroosmotic velocity calculated from MS ($\upsilon_{eo}^{MS}$) and UV ($\upsilon_{eo}^{UV}$) detection of EOF markers as a function of the γ ratio and the reduced injection length $x_\alpha$ for BGEs composed of a) 30 mM, b) 50 mM and c) 75 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8. The sample was composed of the analytes diluted in water at 5 $\mu g.mL^{-1}$. Other separation and detection conditions: see sections 2.2.2 and 2.2.3. The values for $\upsilon_{eo}^{UV}$ and $\upsilon_{eo}^{MS}$ differing from the $\upsilon_b$ values by less than 0.1 $10^{-3}$ $m.s^{-1}$ were indicated in bold characters.

A scheme illustrating the different cited parameters was presented in Figure 1. As expected, these calculations demonstrated that the local electric field strength in the sample zone was higher than the local electric field strength in the BGE, inducing a high electroosmotic velocity in the sample zone ($\upsilon_{eS}$). This allowed to easily understand the increase in bulk electroosmotic velocity with larger injection volumes, due to the higher contribution of $\upsilon_{eS}$ [30]. On the other hand, these calculations also explain the increase in $\upsilon_b$ with increasing $\gamma$ ratio.

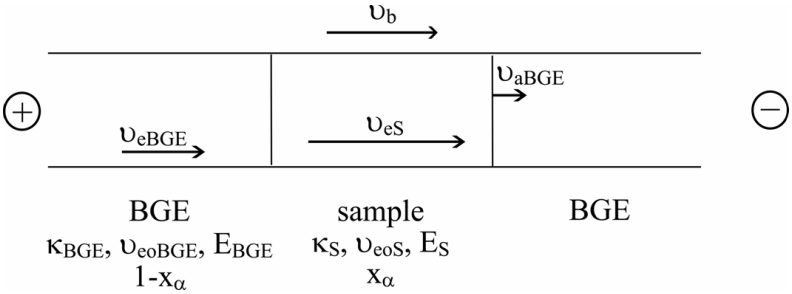



**Figure 1:** Scheme representing the different parameters used in the model developed by Burgi and Chien [28,29].

The calculated values of the bulk electroosmotic velocity were then compared to those obtained experimentally by injecting a short plug of electroosmotic flow marker mixture before the sample in all experiments. The electroosmotic flow marker mixture contained formamide and glucose in order to measure the bulk electroosmotic velocity from UV ($\upsilon_{eo}^{UV}$) and MS ($\upsilon_{eo}^{MS}$) detections in the same experiment. Indeed, formamide was UV-detected at 200 nm after a moving distance of 21.5 cm, whereas glucose was characterized by a major $[2M-H]^-$ ion at m/z 359 and a less abundant $[M-H]^-$ ion at m/z 179 (M=glucose) on mass spectra after a moving distance of 85 cm. The obtained values for $\upsilon_{eo}^{UV}$ and $\upsilon_{eo}^{MS}$ were reported in Table 3. These values were generally, but not always, close to each other. Nevertheless, the agreement between the experimental values for the electroosmotic velocity deduced from the MS electroomotic flow marker ($\upsilon_{eo}^{MS}$) and the calculated values for $\upsilon_b$ (Table 3) is markedly closer than that obtained from the UV electroomotic flow marker ($\upsilon_{eo}^{UV}$). This result demonstrated the interest of using an MS-responsive electroosmotic flow marker in CE-MS experiments. Indeed, in CE-MS configuration, the effective length of the UV detection, which is imposed by the geometry of the cassette, is relatively short (21.5 cm). This resulted in the UV detection of the electroosmotic flow marker occuring at the very beginning of the FASS process. On the other hand, the detection of an electroosmotic flow marker at the end of the capillary (85 cm) by MS provided a value for the electroosmotic velocity which was averaged over the full length of the capillary. This could explain why the

agreement between the calculated and experimental electroosmotic velocities was better from MS than from UV detection of the electroosmotic flow marker.

Eventually, the model developed by Burgi and Chien, which did not take into account the electroosmotic flow dynamics during FASS as did Thorman [31] and Pittman [32], seemed to be sufficient to explain the evolution of the bulk electroosmotic velocity in our case. However, the adequation between theoretical calculations and experimental measurements seemed to decrease with increasing concentrations of BGE (Table 3). This could be due to increasing Joule heating resulting from the increase in the current intensity inside the capillary.

### *2.3.2 Search for a compromise between sensitivity and resolution*

Increasing γ ratio should result in an increase in the concentration and a decrease in the length of the zones of analytes after FASS [28]. It, however, also increases the mismatch between the local electroosomotic velocities in the sample and in the BGE, which generates laminar flows and induces broadening of the zone being stacked. Consequently, the best results are obtained when a proper compromise is found between the adverse effects of sample stacking and laminar flows. It was assumed that the perturbations induced by laminar flows in the sample zone can be neglected, due to the short time that analytes spend in this zone [28]. The laminar flow velocities in the BGE ($\upsilon_{aBGE}$) can be expressed as follows [28]:

$$\upsilon_{aBGE} = \upsilon_b - \upsilon_{eBGE} \quad (6)$$

The calculated values for $\upsilon_{aBGE}$ were reported in Table 3. As expected, the calculated laminar flow velocities in the BGE region ($\upsilon_{aBGE}$) increased when the γ ratios or the injection volumes increased. This could explain the decrease in the resolution between isomers IPA (peak 6) and PrPA (peak 7) (for which we demonstrated that the CE separation was mandatory for their identification [20,21]), that was observed experimentally with increasing γ ratios (γ=5, 10 or 15) or injection volumes (corresponding to 5 %, 10 % or 15 % of the capillary volume) as illustrated in Figure 2a. The laminar flow velocity seemed to also influence the signal intensity. Indeed, the variation of the peak intensity corresponding to PhPA (peak 9), taken as model analyte, as a function of the γ ratio and the injection volume (Figure 2b) revealed that the signal intensity increased between γ=5 and γ=10, but decreased when the γ ratio and/or the injection volumes were too high (i.e. when γ=15 and/or when the injection volume corresponded to 15 % of the capillary volume). This decrease in signal intensity could be due to the important peak shape alteration induced by the high velocity of

laminar flow. According to these results, the best compromise between sensitivity and resolution was reached for γ=8 and an injection volume corresponding to 8 % of the capillary volume. These optimal values are in accordance with those reported by Burgi and Chien [28].

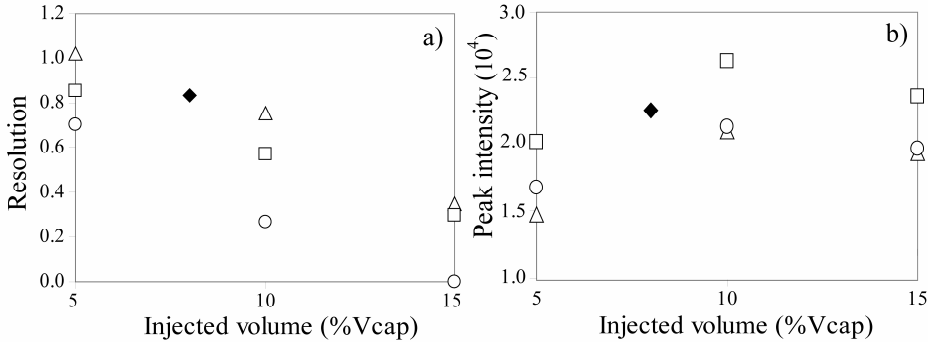



**Figure 2:** a) Resolution obtained between the peaks corresponding to IPA and PrPA (peaks 6 and 7) and b) peak intensity corresponding to PhPA (peak 9) for different injection volumes (5, 10 or 15 % of the capillary volume) and γ ratios (triangles: γ=5; squares : γ=10; circles: γ=15). Resolution and peak intensity obtained in the optimal conditions (γ=8 and injection volume=8 % of the capillary volume) are indicated by a black diamond. The samples were composed of the analytes diluted in water at 5 $\mu g.mL^{-1}$ and of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$ in the appropriate concentrations mentioned in Table 2.

Experiments were then performed in these optimized conditions with different concentrations of BGE (30 mM, 50 mM and 75 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8) in order to evaluate the influence of the concentration of BGE on signal intensity. The corresponding electropherograms were reported in Figure 3 and revealed that the signal intensity slightly decreased on going from a 30 mM to a 50 mM BGE, and next dramatically decreased with a 75 mM BGE. This should be due to a competition between the ionization of electrolyte species and the analytes in the ionization source of the mass spectrometer. Eventually, the best results were obtained with a BGE composed of 30 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8, a γ ratio of 8 and an injected volume corresponding to 8 % of the capillary volume. In these conditions, a 10-fold sensitivity enhancement was obtained, in comparison to that produced in the absence of any preconcentration procedure, and with a maximum injected volume corresponding to 0.6 % of the capillary volume.

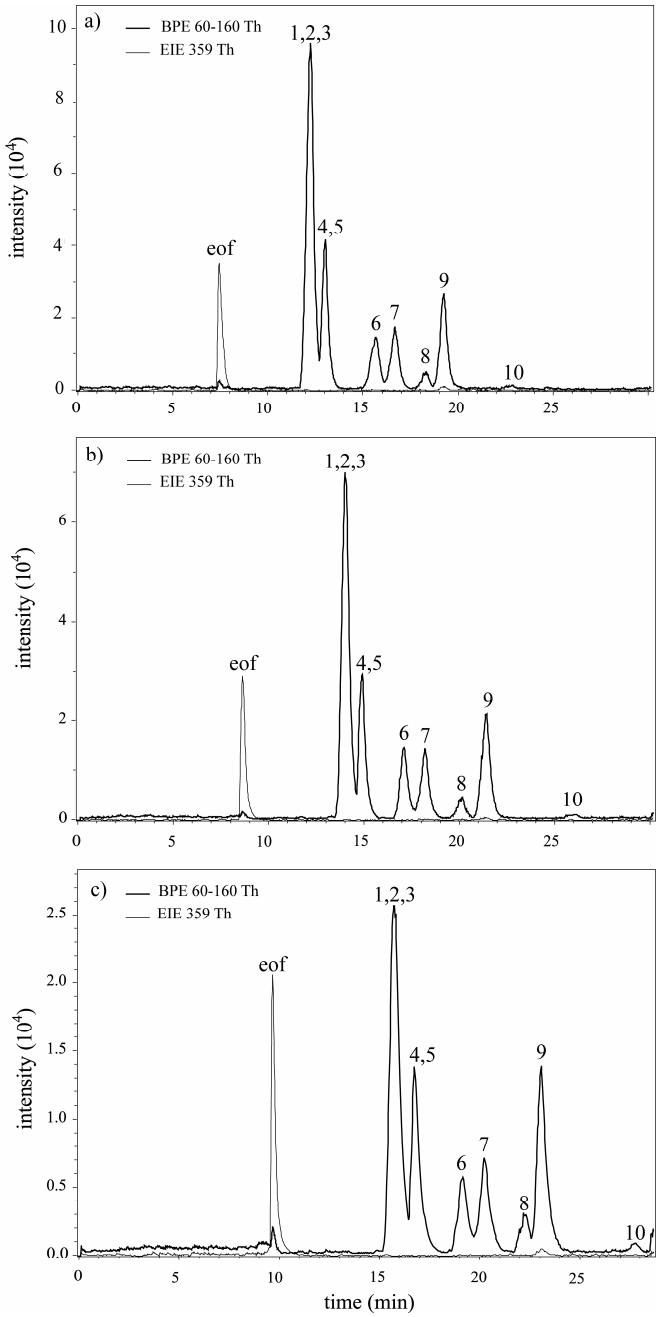



**Figure 3:** Electropherograms of a standard mixture of alkyl- and alkyl alkylphosphonic acids obtained with a BGE composed of a) 30 mM, b) 50 mM and c) 75 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8. The injection volume corresponded to 8 % of the capillary volume. The optimal value of the γ ratio (γ=8) was obtained by adding a) 3 mM $HCOONH_4$ and 1.1 mM $NH_4OH$ (pH 8.8), b) 5 mM $HCOONH_4$ and 1.8 mM $NH_4OH$ (pH 8.8) and c) 8.5 mM $HCOONH_4$ and 3 mM $NH_4OH$ (pH 8.8) to the samples containing the analytes at 5 $\mu g.mL^{-1}$ each in water. BPE: base peak electropherogram. EIE: extracted ion electropherogram for glucose ($[2M-H^-]$).

### *2.3.3 Applications to tap water and local river water*

This newly developed approach was then applied to environmental matrices: tap water and local river water. First, the conductivities of blank tap and local river waters were measured. The conductivities of tap water ($\kappa$=0.055 $S.m^{-1}$) and river water ($\kappa$=0.053 $S.m^{-1}$)

were too high to obtain a γ ratio of 8 with the BGE composed of 30 mM $HCOONH_4$ adjusted at pH 8.8 ($\kappa_{BGE}$=0.294 $S.m^{-1}$). This is why, a BGE composed of 50 mM $HCOONH_4$ adjusted at pH 8.8 ($\kappa_{BGE}$=0.491 $S.m^{-1}$) was used. A solution of $HCOONH_4$ and $NH_4OH$ was added to river and tap water samples spiked with the analytes (at 5 $\mu g.mL^{-1}$) in order to obtain final concentrations of 1.4 mM $HCOONH_4$ and 0.5 mM $NH_4OH$ (pH 8.8). This allowed to set the conductivity of the samples to 0.061 $S.m^{-1}$ and 0.064 $S.m^{-1}$ in river and tap water respectively, providing γ ratios around 8 (γ=8.0 and 7.7, respectively). The obtained electropherograms (Figure 4) showed that the signal intensity, in both cases, was very close to that obtained in pure water, demonstrating that this method was very suitable for sensitivity enhancement in tap and river waters.

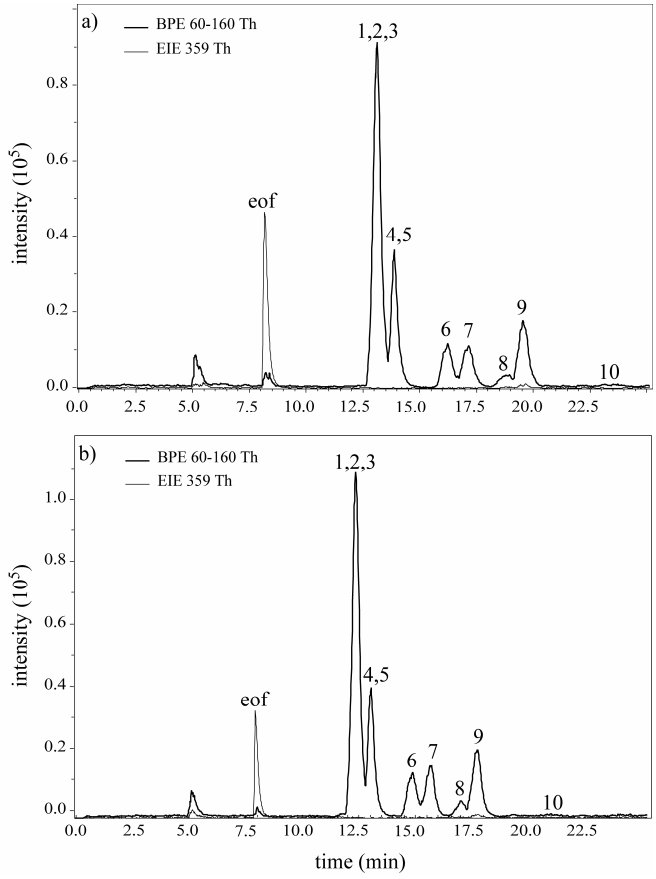



**Figure 4:** Electropherograms of a) tap water and b) local river water spiked with alkyl- and alkyl alkylphosphonic acids at 5 $\mu g.mL^{-1}$ each obtained with a BGE composed of 50 mM $HCOONH_4$ adjusted to pH 8.8 and an injection volume corresponding to 8 % of the capillary volume. The optimal value of the γ ratio (γ=8) was obtained by the addition of 1.4 mM $HCOONH_4$ and 0.5 mM $NH_4OH$ (pH 8.8) to the samples. Other separations and detection conditions: see sections 2.2.2 and 2.2.3.

### *2.3.4 Reapeatability, linearity and LOD*

The reapeatabilities for peak areas measured in the optimized conditions for the three matrices spiked with the ten analytes at 5 µg.mL$^{-1}$ each were very satisfactory: RSD (n=6) were 2.7-3.9 % in purified water, 2.4-3.9 % in tap water and 2.3-3.3 % in river water. The linearity of the response obtained in MS was determined with analyte concentrations ranging between 0.5 and 5 µg.mL$^{-1}$ in the three matrices (Figure 5).

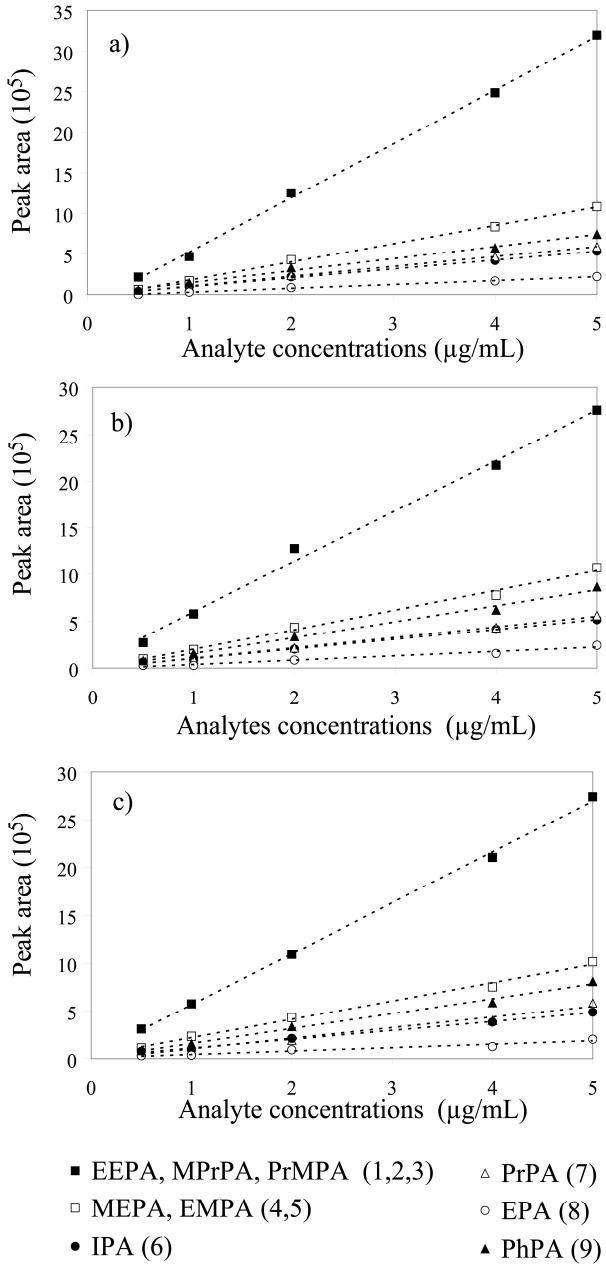



**Figure 5:** Peak areas obtained in optimized CE-MS conditions in a) pure water, b) tap water and c) river water spiked with the alkyl- and alkyl alkylphosphonic acids in the 0.5–5 µg.mL$^{-1}$ concentration range. Dotted lines represent least-squares regression straight-lines.

The linearity was good in this concentration range for the three matrices, as testified by correlation coefficients reported in Table 4. This confirmed that this FASS method yielded enrichment performances that are independent of analyte concentration and thus compatible with quantitative analysis. Finally, the limit of detection (LOD) corresponding to a 3:1 S/N ratio were determined from the BPE m/z 60-160 Th as follows: 0.25 $\mu g.mL^{-1}$ for EEPA, MPrPA and PrMPA, 0.5 $\mu g.mL^{-1}$ for MEPA, EMPA, PrPA and IPA, 0.35 $\mu g.mL^{-1}$ for PhPA, 2 $\mu g.mL^{-1}$ for EPA and 5 $\mu g.mL^{-1}$ for MPA. The signal-to-noise ratio, however, can be enhanced by a factor 2 in the extracted ion electropherogram (EIE) mode, which allows to extract the signal corresponding to a given m/z ratio from the total ion current.

Not surprisingly, MPA and EPA were detected at higher concentrations, owing to their lower intrinsic response in ESI-MS detection [19,33]. For this reason, repeatability and linearity for MPA in the 0.5-5 $mg.mL^{-1}$ range were not given either.

| | **EEPA+PrMPA +MPrPA** | **EMPA+EMPA** | **IPA** | **PrPA** | **EPA** | **PhPA** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **a)** | y=663829x -136550 | y=224215x -44363 | y=109597x -11613 | y=122530x -19061 | y=47928x -18904 | y=149132x -2514 |
| | $R^2$=0.998 | $R^2$=0.998 | $R^2$=0.998 | $R^2$=0.9993 | $R^2$=0.997 | $R^2$=0.994 |
| **b)** | y=540049x +62060 | y=208025x -832 | y=99929x +6087 | y=114875x -8450 | y=40236x -352 | y=164266x -9569 |
| | $R^2$=0.994 | $R^2$=0.993 | $R^2$=0,998 | $R^2$=0.996 | $R^2$=0.991 | $R^2$=0.997 |
| **c)** | y=532088x +34992 | y=191878x +29436 | y=92827x +18336 | y=114722x -9654 | y=35790x +8621 | y=155942x +4407 |
| | $R^2$=0.998 | $R^2$=0.994 | $R^2$=0.996 | $R^2$=0.998 | $R^2$=0.993 | $R^2$=0.993 |

**Table 4:** Equations for the least-squares regression straight-lines (n=5) and corresponding correlation coefficients obtained for the determination of MS response linearity in a) pure water, b) local tap and c) river water (Figure 5).

## 2.4 Conclusion

Our results show that FASS can be applied profitably to the preconcentration of nerve agent degradation products in real low-conductivity matrices (tap and river waters) prior to quantitative analysis by CE-MS. The first step of the newly developed method consisted in the determination of sample conductivity. This allowed to evaluate the concentration of BGE that has to be added to the sample to obtain a suitable BGE to sample conductivity ratio ($\gamma$ ratio). The $\gamma$ ratio was then precisely set to its optimal value ($\gamma$=8) that was confirmed experimentally in this work by adding a $HCOONH_4$ / $NH_4OH$ mixture in appropriate concentrations to the sample. Moreover, the addition of the $HCOONH_4$ / $NH_4OH$ mixture

allowed to set the same pH in the sample as in the BGE, which limits laminar flows responsible for resolution loss. Finally a 10-fold sensitivity enhancement was obtained in tap and river waters by hydrodynamically loading a sample volume corresponding to 8 % of the capillary volume. The repeatability and the linearity of the peak areas in the 0.5-5 $\mu g.mL^{-1}$ concentration range were good. Although the LOD of EPA (2 $\mu g.mL^{-1}$) and MPA (5$\mu g.mL^{-1}$) were limited by their low ionization efficiency, the LOD of all other studied analytes were in between 0.25 and 0.5 $\mu g.mL^{-1}$, meeting the LOD requirements of OPCW related analysis (1 $\mu g.mL^{-1}$) [34].

FASS, however, is not adapted to the preconcentration of analytes in high-conductivity matrices: another preconcentration method is thus required to treat such samples conveniently. Our current efforts are focussed on assessing transient isotachophoresis for the preconcentration of alkylphosphonic acids in soil extracts or biological samples and for the enhancement of the preconcentration factor.

**Acknowledgments :**

Our colleagues from the chemical synthesis laboratory and the NMR laboratory for synthesis and purity check of home-made standards are gratefully acknowledged.

## 3. Conclusion

Bien que la nouvelle procédure de FASS décrite dans ce chapitre n'ait pas permis d'augmenter significativement le gain en sensibilité par rapport aux premières expériences présentées dans le chapitre III, le principal objectif de ce travail, qui consistait à obtenir une méthode de préconcentration par FASS compatible avec des analyses quantitatives et adaptée à des matrices environnementales, a été atteint.

Les conditions optimales assurant le meilleur compromis entre préconcentration et résolution ont été déterminées en étudiant l'influence du rapport de conductivité entre l'échantillon et l'électrolyte, du volume d'injection et de la concentration de l'électrolyte. Les effets de la variation de ces paramètres sur les temps de migration et la résolution ont été expliqués en utilisant le modèle théorique développé par Burgi et Chien. Les différentes expériences réalisées ont montré que la valeur de la vitesse électroosmotique globale prédite par ce modèle était très proche de celle mesurée expérimentalement à partir du temps de migration du marqueur d'écoulement électroosmotique détecté en spectrométrie de masse.

Le rapport optimal de conductivité entre l'échantillon et l'électrolyte a pu être atteint grâce à l'addition d'une solution de formiate et d'ammonium de concentration adaptée dans l'échantillon. Cette méthode a pu être utilisée avec succès pour la préconcentration des analytes dans des matrices environnementales de faible conductivité. La bonne répétabilité des aires de pics a pu être vérifiée. La linéarité du signal est apparue très satisfaisante, ce qui démontre que les résultats obtenus sont bien indépendants de la concentration des analytes dans l'échantillon.

Le facteur de concentration qui a été obtenu (10 fois) est conforme à celui qui peut être classiquement observé en FASS et a permis d'obtenir des limites de détection inférieures à 1 $\mu g.mL^{-1}$ pour la plupart des analytes, conformément aux exigences de l'OIAC pour l'analyse de composés liés à la CIAC.

## 4. Références

[1] *Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction*, The Technical Secretariat of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, La Haye, 1993.

[2] *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis*, Ed. M. Mesilaakso, Wiley, Chichester, 2005.

[3] C.A. Boulet, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 909-923, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[4] J.E. Melanson, B.L.Y. Wong, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 920 (2001) 359-365.

[5] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1285-1292.

[6] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, C.A. Myler, A.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3598-3604.

[7] A.E.F. Nassar, S.V. Lucas, A.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1085-1091.

[8] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 245-252.

[9] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 279-285.

[10] R.L. Cheicante, J.R. Stuff, H. Dupont Durst, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 347-352.

[11] G.A. Pianetti, M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, *J. Chromatogr.* 630 (1993) 371-377.

[12] T.E. Rosso, P.C. Bossle, *J. Chromatogr. A* 824 (1998) 125-134.

[13] J. Jiang, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 239-244.

[14] J.E. Melanson, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1809-1813.

[15] E.W.J. Hooijshuur, C.E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 187-199.

[16] C.E. Kientz, E.W.J. Hooijschuur, U.A.Th. Brinkman, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997) 253-259.

[17] J.P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, *Chimia* 53 (1999) 511-514.

[18] J.P. Mercier, P. Chaimbault, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 71-80.

[19] R. Kostiainen, A.P. Bruins, V.M.A. Häkkinen, *J. Chromatogr*. 634 (1993) 113-118.

[20] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 110-118.

[21] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *LCGC North America* 25 (2007) 2-6.

[22] M.C. Breadmore, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 22 (2001) 2464-2489.

[23] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768-2779.

[24] Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 107-117.

[25] J.L. Beckers, P. Boček, *Electrophoresis* 21 (2000) 2747-2767.

[26] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466-485.

[27] R.G. Cooks, A.L. Rockwood, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5 (1991) 53-53.

[28] D.S. Burgi, R.L. Chien, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2042-2047.

[29] R.L. Chien, J.C. Helmer, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1354-1361.

[30] T. Hirokawa, N. Ikuta, T. Yoshiyama, H. Okamoto, *Electrophoresis* 22 (2001) 3444-3448.

[31] W. Thormann, C.X. Zhang, J. Caslavska, P. Gebauer, R.A. Mosher, *Anal. Chem.* 70 (1998) 549-562.

[32] J.L. Pittman, H.J. Gessner, K.A. Frederick, E.M. Raby, J.B. Batts, S. Douglass Gilman, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3531-3538.

[33] A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345-357.

[34] Work instructions for sample preparation of test samples for OPCW proficiency tests, QDOC/LAB/WI/PT2, December 2004.

# Chapitre V

# Amélioration de la sensibilité dans des matrices de forte conductivité par isotachophorèse transitoire en CE-MS

## 1. Introduction

La technique FASS décrite dans le chapitre précédent n'est pas applicable à la préconcentration des analytes contenus dans des matrices de forte conductivité sans nécessiter une dilution importante de l'échantillon afin de réduire sa conductivité. Cette approche n'étant pas satisfaisante, l'objectif du travail présenté dans ce chapitre a consisté à développer une nouvelle méthode de préconcentration permettant d'améliorer la sensibilité de détection d'analytes contenus dans des matrices de forte conductivité. La technique de préconcentration par isotachophorèse transitoire (cf. paragraphe I.5.1.4) est alors apparue comme la plus intéressante puisqu'elle ne nécessite pas la modification des instruments commerciaux contrairement aux systèmes à deux capillaires (cf. paragraphe I.5.1.4) ou les manipulations délicates du capillaire qui sont nécessaires pour entreprendre des expériences de préconcentration sur phase solide (cf. paragraphe I.5.2.1) ou sur membrane (cf. paragraphe I.5.2.2). Enfin, la technique de préconcentration par balayage (cf. paragraphe I.5.2.3), impliquant l'utilisation d'un électrolyte de séparation composé de micelles de tensioactif, semble peu compatible avec une détection par spectrométrie de masse.

Ce chapitre décrit donc le développement d'une technique tITP-CZE-MS pour améliorer la sensibilité de détection des produits de dégradation d'agents de guerre chimique contenus dans des matrices de forte conductivité. Pour cette étude, un échantillon constitué de cinq acides alkyl méthylphosphoniques issus de la dégradation du VX, R-VX, sarin, cyclosarin et du soman a été utilisé. Ce mélange de composés est en effet beaucoup plus représentatif d'un prélèvement réel que l'échantillon qui avait été utilisé jusqu'à présent et qui comportait de nombreux composés isomères afin d'évaluer la sélectivité et les capacités d'identification du couplage CE-MS. La technique de tITP-CZE-MS a été développée dans un premier temps

pour l'analyse des cinq acides alkyl méthylphosphoniques contenus dans des extraits de sol, puis a été appliquée à l'analyse d'échantillons d'urine de rat dopés par les analytes. La détection et l'identification de composés liés aux agents de guerre chimique contenus dans des échantillons biologiques (urine, plasma, sérum, etc.) est particulièrement importante. Les échantillons biologiques peuvent en effet représenter les seuls échantillons disponibles pour prouver une agression lorsqu'un prélèvement environnemental est impossible. Cela peut notamment être le cas pour la mise en évidence de composés très volatils qui sont très rapidement évaporés et, en conséquence, indétectables dans l'environnement. Toutefois, ces composés volatils peuvent avoir été absorbés par une victime. Les agents peuvent alors être présents dans les fluides biologiques sous forme libre (particulièrement dans l'urine) ou sous une forme associée avec une protéine (particulièrement dans le plasma).

## 2. Article

### ANALYSIS OF NERVE AGENT DEGRADATION PRODUCTS IN HIGH-CONDUCTIVITY MATRICES BY ON-LINE TRANSIENT ISOTACHOPHORESIS PRECONCENTRATION AND CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS SEPARATION COUPLED TO MASS SPECTROMETRY.

Mélanie Lagarrigue[1], Anne Bossée[1], Arlette Bégos[1], Nathalie Delaunay[2], Anne Varenne[2], Pierre Gareil[2*], Bruno Bellier[1]

[1] Département Analyse Chimique, Centre d'Etudes du Bouchet (DGA), 5 rue Lavoisier BP 3 91710 Vert-le-Petit

[2] Laboratoire Electrochimie et Chimie Analytique, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (UMR CNRS 7575), 11 rue Pierre et Marie Curie 75231 Paris cedex 05

**Abstract**

Preconcentration of nerve agent degradation products (alkyl methylphosphonic acids) contained in high-conductivity matrices using transient isotachophoresis (tITP) was performed to enhance sensitivity of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS). The separation conditions of the five studied alkyl methylphosphonic acids in CE-MS were first optimized. The presence of methanol in the separation medium was required to obtain a good separation of the analytes under counter-electroosmotic flow conditions. Thus, a background electrolyte (BGE) composed of $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture was used. Preconcentration by ITP was induced by the BGE acting as leading electrolyte (LE) while a terminating electrolyte (TE), consisting of 100 mM glycine pH 10 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture injected before the sample, was used. Different leading ions (formate or acetate) and LE concentrations were tested. The best results were obtained with a LE composed of 30 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ mixture for the analysis of soil extracts fortified with the analytes. The loading length of the TE zone was optimized. Surprinsingly, the initial pH of the TE, which determines the initial mobility of the terminating ion, appeared to markedly influence the resolution and the sensitivity. This tITP-CZE-MS method was then adapted for the analysis of rat urine sample fortified with the analytes, which required the use of a more concentrated LE (50 mM). Limits of detection between 4 and 70 $ng.mL^{-1}$ in soil extract, and between 5 and 75 $ng.mL^{-1}$ in rat urine were reached from extracted ion electropherograms (EIEs).

**Key words:** alkyl methylphosphonic acids, nerve agent degradation products, soil extract analysis, rat urine analysis, transient isotachophoresis, capillary zone electrophoresis-mass spectrometry.

## 2.1 Introduction

The development of analytical techniques for the detection and identification of chemical warfare agents is of growing interest due to the implementation of the Chemical Weapons Convention (April 1997) and the increase of the terrorist threat. Nerve agents are the most lethal type of chemical warfare agents, but are generally rapidly hydrolyzed to produce first specific alkyl alkylphosphonic acids and next non-specific alkylphosphonic acids. In the case of a chemical aggression, nerve agent degradation products can be detected in environmental matrices (water, air, soil, etc.) or in the biological fluids of the victims (urine, plasma, blood, etc.).

Although less used than gas or liquid chromatography, capillary electrophoresis (CE) has been recognized as an interesting technique for the separation of chemical warfare agents [1], but it generally suffers from a low concentration sensitivity, which is due to the limited injection volume (ca 1 % of the capillary volume under classical conditions). A variety of electrophoretic preconcentration techniques, however, can be used to enhance sensitivity in CE [2-5]. Preconcentration principles based on electric field amplification such as field-amplified sample stacking (FASS), field-amplified sample injection (FASI) or large volume sample stacking (LVSS) can be applied to analytes present in matrices of lower conductivity than the background electrolyte (BGE), but they are not relevant when this condition is not fulfilled. The preconcentration of analytes contained in high-conductivity matrices [6] such as sea water [7-9], urine [10-13], serum [10,14-17] or plasma [11] prior to CZE separation can be performed using isotachophoresis (ITP). ITP takes place in a discontinuous separation medium composed of a leading electrolyte (LE) and a terminating electrolyte (TE) containing co-ions of higher and lower effective mobility, respectively, than those of the analytes to be preconcentrated. The compounds, whose effective mobilities are not comprised between those of the leading and terminating ions, are diffused.

ITP and CZE can be hyphenated using a two-capillary arrangement (combined ITP-CZE, cITP-CZE) [18] or in a single-capillary arrangement (transient ITP-CZE, tITP-CZE) [6,19-21]. In cITP-CZE, the first capillary, which is generally of wider inner diameter (200-500 µm), is used for the preconcentration of the analytes by ITP. Concentrated analyte zones are

next diverted towards the second capillary (of classical dimensions) where CZE separation occurs. In tITP-CZE, the sample zone is surrounded by a zone of TE and a zone of LE in the capillary filled with the BGE. The analytes are concentrated by ITP until the BGE co-ions penetrate the sample zone. ITP conditions are then no more satisfied and the analytes are afterwards separated in CZE mode. The BGE can be different from both the LE and the TE, but in some cases, the BGE can act as either the TE or the LE. Furthermore, the terminating or leading ion can be initially present either in a zone injected ahead or after the sample zone (tITP induced by the separation medium), or in the sample zone (tITP induced by the sample composition).

Direct coupling of ITP to mass spectrometry (ITP-MS) was first described by Udseth *et al.* [22]. ITP was already used as preconcentration technique prior to CZE-MS to enhance sensitivity in both the two-capillary (cITP-CZE-MS) [11,23,24] and the single-capillary (tITP-CZE-MS) [25-27] arrangements. In this work, tITP was used to enhance sensitivity of CE-MS for the detection of alkyl methylphosphonic acids, which are specific degradation products of nerve agents, in high-conductivity matrices (soil extract and rat urine). Indeed, field-amplification based preconcentration techniques, which we previously implemented for the case of low-conductivity matrices [28,29], cannot be applied in the present case because of too high conductivities of these matrices. To our knowledge, this is the first application of tITP-CZE-MS for the detection of nerve agent degradation products.

## 2.2 Experimental

### *2.2.1 Chemicals and sample solutions*

Ethyl methylphosphonic acid (EMPA, purity >98 %) and pinacolyl methylphosphonic acid (PMPA, purity >98 %) were purchased from Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Isopropyl methylphosphonic acid (IMPA), isobutyl methylphosphonic acid (iBMPA) and cyclohexyl methylphosphonic acid (ChMPA), were synthesized at the Centre d'Etudes du Bouchet and were >98 % purity ($^{31}$P NMR). The structures of the analytes are reported in Figure 1.

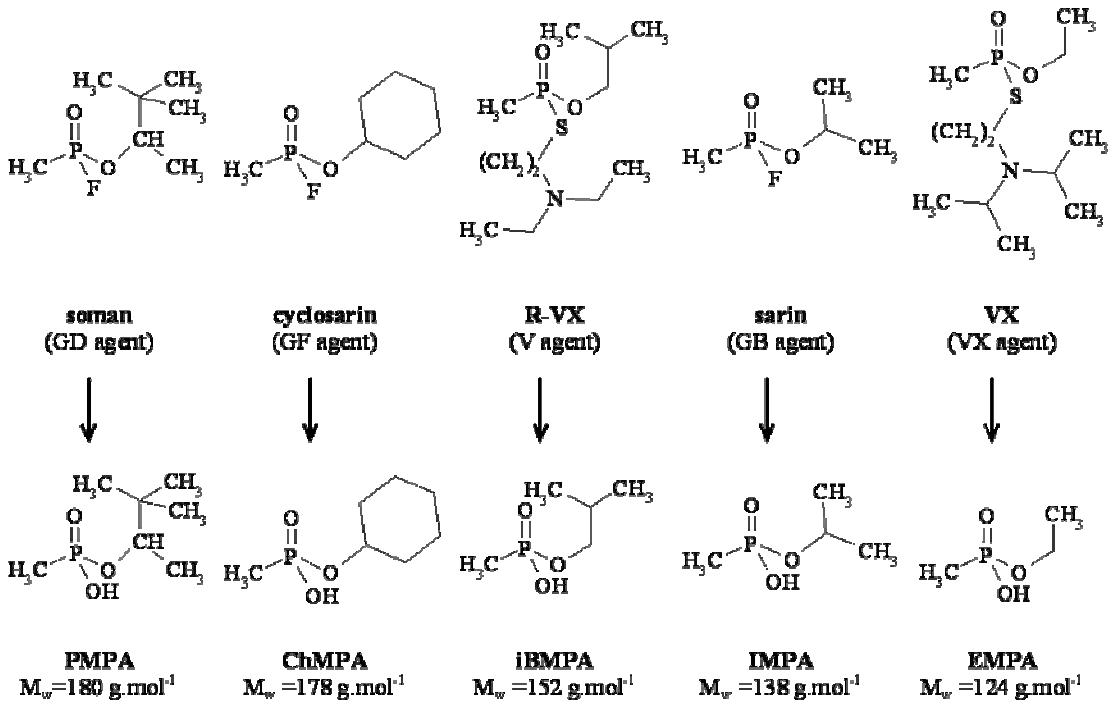



**Figure 1 :** Structures of the studied alkyl methylphosphonic acids and their corresponding nerve agents.

Ammonium acetate (purity >99 %) and ammonium formate (purity >99 %) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and glycine (purity 99.8 %) from Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France). Formamide (purity >99 %) and anhydrous D(+)-glucose (purity >99 %) were purchased from Aldrich. Methanol (HPLC grade), 25 % ammonium hydroxide solution and 1 M sodium hydroxide were from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water used throughout was delivered by an alpha-Q system (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Samples and electrolytes were filtered through a 0.2 µm PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane filters (Pall Life Sciences, MI, USA) before use.

Blank soil extracts were prepared from 10 g of local soil samples that were submitted to pressure-assisted solvent extraction with water at 150 bar and 100°C in a Dionex ASE 200 instrument (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) [30]. The obtained aqueous soil extracts were next percolated through a cation exchange cartridge (AG50WX8 resin, Biorad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), then concentrated by partial evaporation to a volume of 2 mL (corresponding to an enrichment factor of 5) or to a volume of 1 mL (corresponding to an enrichment factor of 10). Aqueous soil extracts were finally filtered through 0.45 µm nylon membrane filters (Pall Life Sciences, MI, USA). Urine samples from healthy rats were filtered through 0.2 µm PVDF membrane filters and (1:1, v/v) diluted with water. Stock solutions of alkyl methylphosphonic acids were prepared by diluting the

compounds in water at a concentration of 100 µg.mL$^{-1}$. The samples analyzed by CE-MS were prepared from these stock solutions diluted in the different studied matrices (soil extract or rat urine) to obtain final concentrations of the analytes of 5 µg.mL$^{-1}$ each.

### *2.2.2 Instrumentation*

A HP$^{3D}$CE capillary electrophoretic system (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a UV absorbance diode array detector was used for CE-MS coupling. The employed mass spectrometer was an Esquire 3000 ion trap mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray ionization (ESI source). The CE-MS hyphenation was carried out with a coaxial sheath liquid interface (Agilent Technologies). The ion trap mass spectrometer was used in the negative ion mode with the following optimized ESI source voltages: spray needle at +3.5 kV, end plate offset at -500 V, capillary exit offset at -40 V, skimmer 1 at -20 V, skimmer 2 at -10 V, low mass cut-off (LMCO) at 50 Th [31]. Ion accumulation time was automatically set with ion charge control (ICC) with a target of 10000 to avoid space charge effects. The analytical scan range for mass spectra was m/z 50-500 Th. Nitrogen was used as nebulizing gas at a pressure of 7 psi (1 psi=6894.76 Pa) and as drying gas at a temperature of 200°C and a flow rate of 5 L.min$^{-1}$. The sheath liquid ((75:25:2, v/v/v) MeOH/$H_2O$/$NH_4OH$) was delivered by a syringe pump (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) at a flow-rate of 4 µL.min$^{-1}$. Nebulizing and drying gas were turned off during injection step.

### *2.2.3 Separation conditions*

CZE-MS and tITP-CZE-MS experiments were performed in 50 µm i.d. x 90 cm bare fused-silica capillaries (Agilent Technologies) with 21.5 cm effective length to UV detector. Prior to first use, bare fused silica capillaries were washed with 1 M NaOH for 10 min, 0.1 M NaOH for 10 min. After storage, capillaries were flushed with 0.1 M NaOH for 5 min, and water for 10 min. Between runs, capillaries were rinsed with BGE for 3 min. Temperature was set to 22°C and separation voltage was set to +20 kV.

For tITP-CZE-MS, the LE and the TE were prepared in a (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ hydro-organic medium. pH values reported throughout are those measured for the aqueous part of the electrolyte. The BGE was used as LE and was composed of 30 mM or 50 mM ammonium acetate adjusted to pH 8.8 by ammonium hydroxide solution (the concentration values

reported throughout correspond to the final concentrations in the hydro-organic medium). The TE consisted of 200 mM or 333 mM glycine adjusted to pH 10 by ammonium hydroxide solution in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$. TE was hydrodynamically injected (250 s at 50 mbar, corresponding to 14 % of the capillary length) before the sample (200 s at 50 mbar, corresponding to 11 % of the capillary length). Formamide (0.1 % v/v in water) and anhydrous D(+)-glucose (500 µg.mL$^{-1}$ in water) were used as electroosmotic flow markers for UV and MS detection, respectively.

The conductivities of soil extract and rat urine samples, that were used in this study, were determined (at 25°C) by measuring current intensity as a function of applied voltage within a range where the linearity of Ohm's law was verified. The conductivities were easily deduced from Ohm's law after rearrangement:

$$\kappa = \frac{4LI}{\pi d_c{}^2 V} \qquad (1)$$

where I is the measured current intensity, V is the voltage applied to the capillary, $d_c$ is the inner diameter and L is the total length of the capillary. Calibration was realized with solutions of 0.1 M and 0.01 M KCl ($\kappa$=1.288 and 0.1413 S.m$^{-1}$ at 25°C, respectively).

## 2.3 Results and discussion

### *2.3.1 CZE separation of the analytes*

The first step of this work consisted in the determination of the separation conditions leading to the separation of the five studied alkyl methylphosphonic acids by CZE-MS. The resolution obtained with a BGE composed of 15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) prepared in a 100 % aqueous medium was relatively poor (Figure 2a). Therefore, different BGEs composed of 15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 were prepared in different water-methanol media. Indeed, the presence of organic solvent in the separation medium can modify the selectivity due to the alteration of the dissociation constants and the solvation of analytes. The addition of organic solvents also strongly influences the electroosmotic flow, due to the variations of viscosity, dielectric constant and zeta potential [32]. The electropherograms obtained in CZE-MS with different solvent compositions of the separation medium were reported in Figures 2b-d and revealed that the resolution increased as the proportion of methanol in the separation medium increased. A satisfactory separation of the five studied alkyl methylphosphonic acids was thus obtained with a BGE composed of 15 mM

$CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ (Figure 2d). The reduction of the electroosmotic flow with increasing proportion of methanol in the BGE led to an enhanced resolution. Despite the resulting increase in the analysis time (40 min), the reduction of the electroosmotic flow is interesting for ITP experiments, because ITP performances are known to be enhanced under reduced electroomotic flow conditions [6,12,21,23].

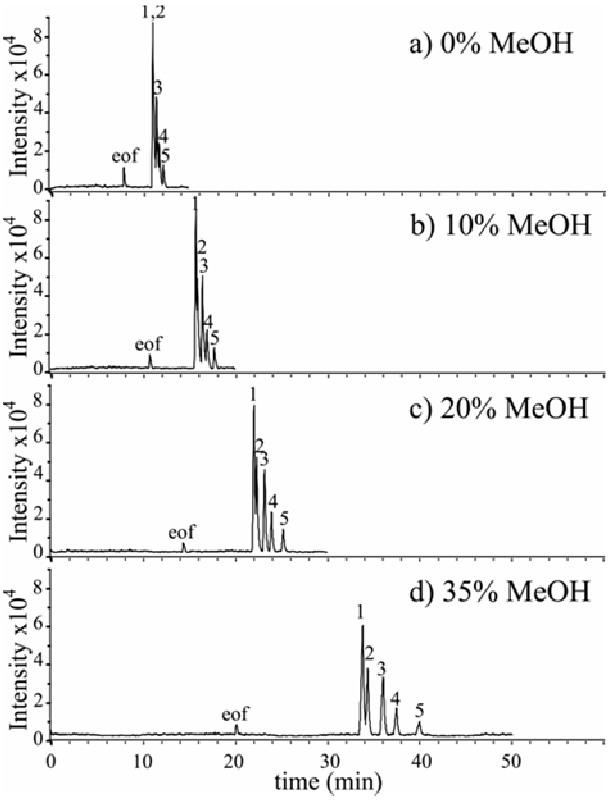



**Figure 2 :** Influence of the proportion of methanol in the separation medium on resolution. Electropherograms obtained in CE-MS for the separation of the five studied alkyl methylphosphonic acids diluted at 50 µg.mL$^{-1}$ in water with a BGE composed of 15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in a) 100 % $H_2O$, b) (10:90, v/v), c) (20:80, v/v) or d) (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$. Other CE and MS conditions as reported in experimental section. Hydrodynamic sample injection: 50 mbar, 10 s. Identification: 1, PMPA; 2, ChMPA; 3, iBMPA; 4, IMPA; 5, EMPA.

### *2.3.2 Influence of the nature and the concentration of the LE*

A tITP method was next developed to enhance sensitivity of CZE-MS for the detection of alkyl methylphosphonic acids present in soil extracts, representing high-conductivity matrices ($\kappa$=0.90 S.m$^{-1}$ and $\kappa$=0.45 S.m$^{-1}$ for blank soil extract samples corresponding to enrichment factors of 10 and 5, respectively). Different parameters must be taken into account, such as: the choice of the tITP-CZE configuration (i.e., tITP induced by the separation medium or by the sample composition [21]), the composition of the BGE, the LE and the TE (nature of the

species, concentration, pH, etc.), and the injection length of the sample, the LE and the TE. Moreover, in view of detection by mass spectrometry, the choice of the different electrolytes (BGE, TE and LE) is limited to volatile species.

The tITP-CZE-MS experiments, that were performed during this work, involved a tITP step induced by the separation medium the BGE acting as LE. Experiments were performed using a LE composed of 15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ or 15 mM $HCOONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ for the analysis of a soil extract corresponding to an enrichment factor of 5 and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$. The TE was introduced in the capillary before the sample because of the counter-electroosmotic flow conditions (Figure 3). It was composed of 100 mM glycine pH 10 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$. Next, a sample constituted of a soil extract fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$ and corresponding to 11 % of the capillary length was injected. The capillary inlet was then dipped into the BGE, and high voltage was applied.

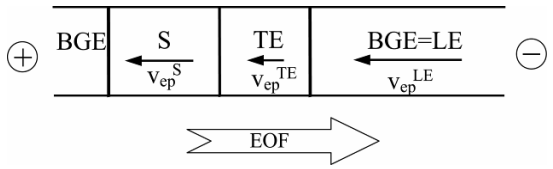



**Figure 3 :** Scheme representing the configuration of the tITP-CZE-MS experiments and the electrophoretic velocity of the leading ion ($v_{ep}^{LE}$), the terminating ion ($v_{ep}^{TE}$) and the analytes ($v_{ep}^{S}$).

Sharper peaks were obtained with the LE composed of 15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ (data not shown). This could be both due to the lower dispersion of the analyte zones which is achieved with acetate anion acting as leading ion and BGE co-ion, because its effective mobility ($\mu_{ep}^{0}$=-42.4 $10^{-5}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) is closer to the mobility of the analytes (ca -25 $10^{-5}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) than that of formate anion ($\mu_{ep}^{0}$=-56.6 $10^{-5}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$).

Additionnal experiments were then performed using a LE composed of 15 mM or 30 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ with a TE consisting of 100 mM or 200 mM glycine pH 10 ($NH_4OH$) in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$, respectively. During ITP, the concentrations of the different zones are adjusted according to the LE concentration. Therefore, the TE concentration was increased proportionally to the LE concentration in order to facilitate this adjustment. Surprisingly, the signal intensity was not significantly enhanced by using 30 mM acetate ion as compared with 15 mM acetate ion for the analysis of a soil extract corresponding to an enrichment factor of 5 and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$.

However, in the case of the analysis of a soil extract corresponding to an enrichment factor of 10 and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$, sharper peaks and higher signal intensity were obtained with 30 mM acetate ion (Figure 4a) than with 15 mM acetate ion (Figure 4b).

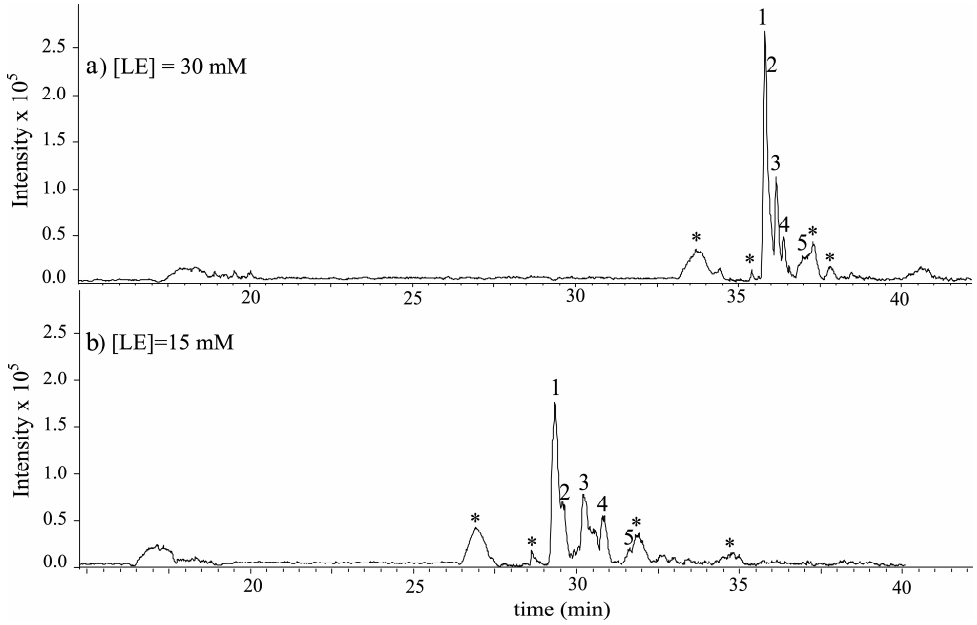



**Figure 4 :** Influence of the LE concentration on resolution and sensitivity for the analysis of a soil extract corresponding to an enrichment factor of 10 and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$. Electropherograms obtained with a) LE: 30 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ and TE: 200 mM glycine pH 10 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ and b) LE: 15 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ and TE: 100 mM glycine pH 10 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$. Hydrodynamic sample injection (50 mbar, 200 s). Hydrodynamic TE loading (50 mbar, 250 s). Other CE and MS conditions as reported in experimental section. Identification: 1, PMPA; 2, ChMPA; 3, iBMPA; 4, IMPA; 5, EMPA.* interfering soil ion.

Thus, the increase in the LE concentration allowed to analyze soil extracts corresponding to higher enrichement factors. The influence of the concentration of the soil extract on the ITP performances, could be explained by considering that one (or several) anionic macro-component(s) of the soil extract could be present at sufficient concentration, according to the enrichment factor, to act as destacker(s) and thus impair the ITP process. Indeed, experiments perfomed using CE with indirect UV detection for the determination of anions in blank soil extracts, revealed the presence of $Cl^-$, $SO_4^{2-}$, $NO_3^-$ and $HPO_4^{2-}$. Conversely, above a critical value, the LE concentration ensured the stacking of the analytes against the destacker(s) [33]. Experiments were also performed with 50 mM acetate ion, but the signal intensity was slightly lower than that obtained with 30 mM acetate ion. This could be due to an increase in the competition between the ionization of the LE species and of the analytes in the ionization source of the mass spectrometer as the LE concentration was increased.

### *2.3.3 Influence of loading length and initial pH of the TE on tITP-CZE-MS performances*

With this type of tITP-CZE configuration (Figure 3), the time during which the analytes stay stacked in ITP increases on loading longer TE zones [6]. Consequently, the ITP time can be modulated by varying the loading length of the TE (Figures 5a-c).

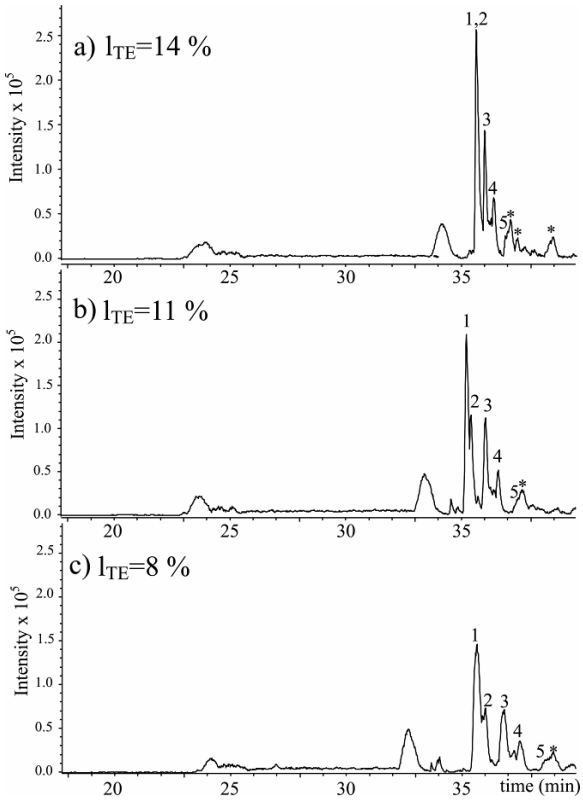



**Figure 5 :** Influence of the loading length of the TE ($l_{TE}$) on resolution and sensitivity. Electropherograms obtained for the analysis of a soil extract corresponding to an enrichment factor of 10 and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$ with loading lengths of the TE corresponding to a) 14 %, b) 11 % and c), 8 % of the capillary length. Other CE and MS conditions as in Figure 4a. Identification: 1, PMPA; 2, ChMPA; 3, iBMPA; 4, IMPA; 5, EMPA.* interfering soil ion.

These experiments showed that longer TE loadings, corresponding to longer ITP times, led to sharper peaks and higher signal intensity. It can, however, also be observed that resolution decreased particularly for the first two peaks (corresponding to PMPA and ChMPA) with longer ITP time. Indeed, with this type of tITP-CZE configuration induced by the separation medium where the BGE acts as the LE, slower-migrating analytes, which are detected first in counter-electroosmotic mode, stay for a longer time stacked in ITP compared to faster analytes [21]. The zones corresponding to slower analytes are consequently sharper when passing the detector. However, the probability of being detected as they are still in ITP stack and, consequently, not baseline-separated, is more important for slower analytes. This explains the particularly poor resolution observed between PMPA and ChMPA, which have

lower effective mobilities. On the other hand, faster analytes leave the ITP stack first and are consequently more dispersed when passing the detector. This explains why the peak corresponding to EMPA (peak 5), is more broadened than those corresping to other analytes. However, even if the resolution between PMPA and ChMPA is very poor with a loading length of the TE corresponding to 14% of the capillary length, this value, which corresponds to the highest signal intensity, was selected as optimal value. Indeed, the co-migrating analytes PMPA and ChMPA, and all other analytes, can be easily identified thanks to the different mass-to-charge ratios corresponding to their pseudo-molecular ions that are observed on MS spectra (Figure 6).

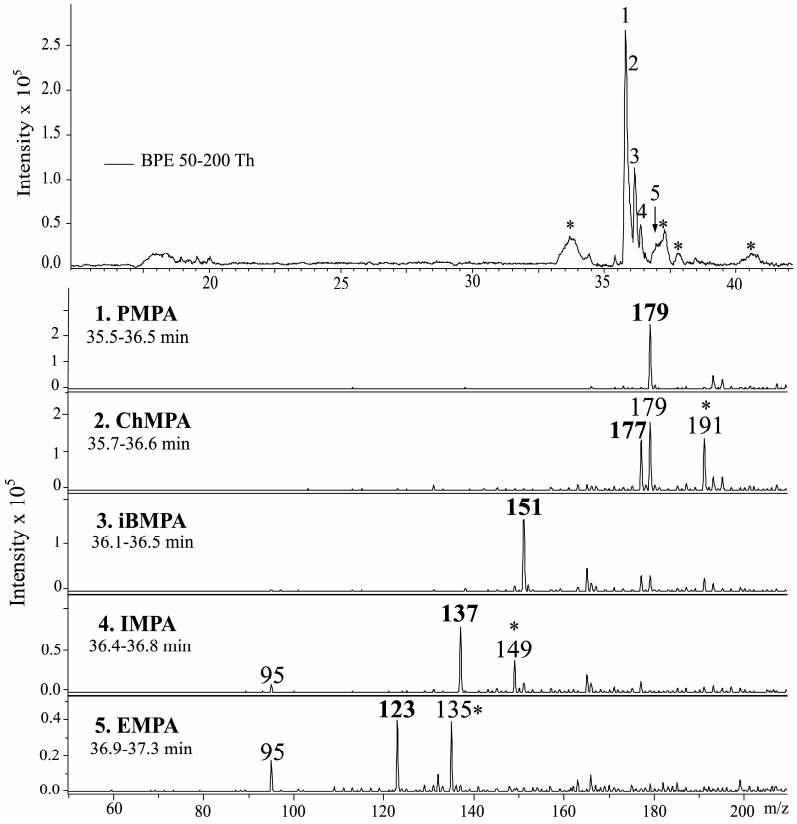



**Figure 6 :** MS spectra corresponding to the studied alkyl methylphosphonic acids present at 5 µg.mL$^{-1}$ in a soil extract corresponding to an enrichment factor of 10. LE: 30 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$, TE: 200 mM glycine pH 10 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$. CE and MS conditions as in Figure 5a. * interfering soil ion.

The influence of the initial effective mobility of the terminating ion, was studied by performing experiments with different values of the initial pH of the TE (pH 10, 9.8 or 9.2). The calculated initial effective mobility of the terminating ion, the leading ion and the analytes, determined in a 100 % aqueous medium, are given in Table 1.

| | terminating ion=glycine | analytes | leading ion=acetate |
|---|---|---|---|
| **pKa** | 9.78 | 2.19<pKa<2.34 [34] | 4.76 |
| $\mu^0$ ($10^{-5}$ cm².V$^{-1}$.s$^{-1}$) | -37.4 | | -42.4 |
| $\mu_{eff}$ ($10^{-5}$ cm².V$^{-1}$.s$^{-1}$) | -3.8* (pH=8.9)<br>-7.7* (pH=9.2)<br>-16.4* (pH=9.8)<br>-19.1* (pH=10.0) | -30<$\mu_{eff}$<-23** | -36.8*** |

* calculated with PeakMaster 5.1, for 200 mM glycine at different pH ($NH_4OH$) in $H_2O$, with ionic strength correction.
** determined experimentally with a BGE composed of 30 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in $H_2O$.
*** calculated with PeakMaster 5.1, for 30 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 ($NH_4OH$) in $H_2O$.

**Table 1 :** Effective mobility of the terminating ion, analytes and leading ion determined in a 100 % aqueous medium.

The obtained electropherograms (Figures 7a-c) showed that the increase in the initial effective mobility of the terminating ion (due to the increase in the initial pH of the TE) led to sharper peaks and higher signal intensity. This suggest an increase in the ITP time with increasing initial mobility of the terminating ion. Indeed, with this type of tITP-CZE configuration, the time during which an analyte stays stacked in ITP, increases as the difference of mobility between the analytes and the terminating ion decreases [19]. However, our experimental results (Figures 7a-c) seem surprising because the initial pH of the TE zone is rapidly adjusted according to the LE conditions. According to the work of Mosset *et al.* [35], the adjusted value of the pH of the TE zone can be estimated at 8.9, which corresponds to a very low mobility of the terminating ion (Table 1). Consequently, the time during which the terminating ion has a higher effective mobility, inducing longer ITP time, should be very short. Results reported in Figures 7a-c demonstrate that this period, nevertheless, significantly influence resolution and sensitivity. Note that the important diffusion of the analyte zones observed at pH 9.2 (Figure 7a) was probably due to the initial effective mobility of the terminating ion which was not sufficient to ensure ITP process.

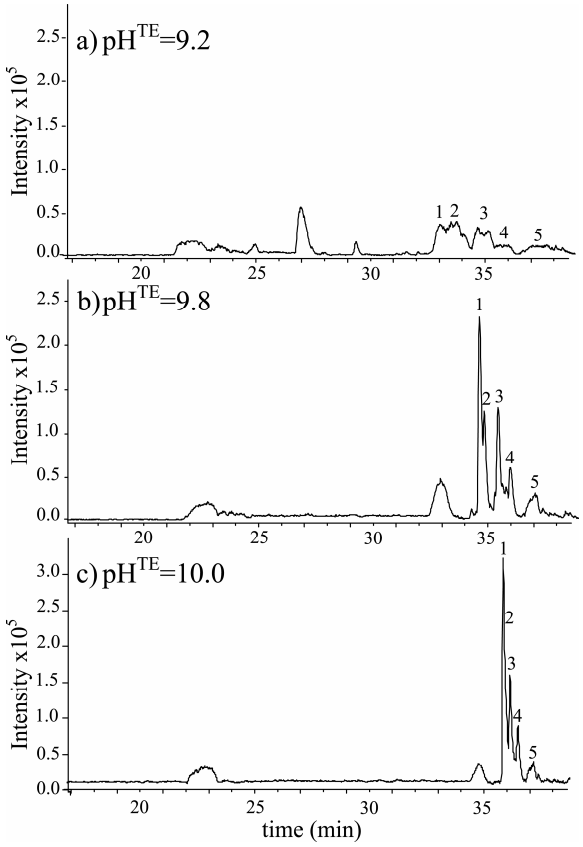



**Figure 7 :** Influence of initial pH of the TE on resolution and sensitivity. Electropherograms obtained for the analysis of a soil extract corresponding to an enrichment factor of 10 and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$ using a TE composed of 200 mM glycine in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$ at a) pH 9.2, b) pH 9.8 and c) pH 10 adjusted with $NH_4OH$. Other CE and MS conditions as in Figure 6. Identification: 1, PMPA; 2, ChMPA; 3, iBMPA; 4, IMPA; 5, EMPA.

Under optimized conditions (Figure 6), tITP provided a sensitivity enhancement of about 40-fold for injection of a sample of soil extract having an enrichment factor of 10, as compared with the classical injection procedure (with a sample injection length corresponding to 0.6 % of the capillary length). Limits of detection (signal-to-noise ratio of 3) were determined from base peak electropherogram (BPE) m/z 50-200 Th (Table 2a). The signal-to-noise ratio, however, can be enhanced in the extracted ion electropherogram (EIE) mode (Table 2b), which allows to extract the signal corresponding to a given m/z ratio from the total ion current.

| | **PMPA** | **ChMPA** | **iBMPA** | **IMPA** | **EMPA** |
|---|---|---|---|---|---|
| **migration order** | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **a) LOD in soil extract (ng.mL$^{-1}$)** from BPE m/z 50-200 Th | 9 | 35 | 35 | 80 | 200 |
| **b) LOD in soil extract (ng.mL$^{-1}$)** from EIEs | 4 | 12 | 12 | 30 | 70 |

**Table 2 :** Limits of detection of the studied alkyl methylphosphonic acids in soil extracts corresponding to an enrichement factor of 10 determined from a) BPE m/z 50-200 Th and b) EIEs. CE and MS conditions as in Figure 6.

### *2.3.4 Application of tITP-CZE-MS for the preconcentration of analytes in rat urine*

The tITP-CZE-MS technique, developed for the analysis of soil extracts, was then adapted for the analysis of a high-conductivity biological matrice consisting in rat urine ($\kappa$=3.21 $S.m^{-1}$) fortified with the studied alkyl methylphosphonic acids at 5 $\mu g.mL^{-1}$. For rat urine analysis, strong diffusion of the analytes was observed with the 30 mM LE. A more concentrated LE (50 mM) had to be used. Moreover, the dilution of rat urine sample (1:1, v/v) with water was required. This could be due to the high concentration of anions that can act as destackers in rat urine [33].

The analysis of a blank rat urine sample by tITP-CZE-MS revealed the presence of a very abundant interfering anion in the migration range of the analytes (Figure 8a). The MS spectrum corresponding to this interfering ion displayed an abundant ion at m/z 178 (Figure 8b) and tITP-CZE-MS-MS experiments (Figure 8c) revealed a loss of $CO_2$, which suggested the presence of a carboxylic acid group. This ion, observed at m/z 178, could be attributed to an adduct ion corresponding to lactate anion ($[(CH_3(CH)(OH)COO^-)(H_2O)_4(NH_3)]^-$).

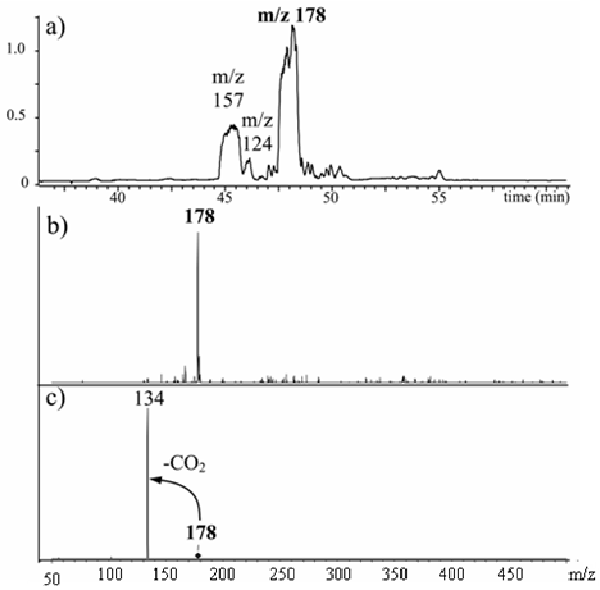



**Figure 8 :** Analysis of a blank rat urine sample by tITP-CZE-MS and tITP-CZE-MS-MS. a) Electropherograms obtained for the tITP-CZE-MS analysis of a blank rat urine sample (1:1, v/v) diluted with water, b) MS spectrum corresponding to the abundant interfering ion observed between 46 and 48 min and c) MS-MS spectrum corresponding to the abundant interfering ion m/z 178 obtained with an excitation voltage of 0.60 $V_{pp}$ and an excitation width of 1 Th. LE : 50 mM $CH_3COONH_4$ pH 8.8 in (35:65, v/v), TE : 333 mM glycine pH 10 in (35:65, v/v) MeOH/$H_2O$. Loading length of the TE: 14 % of the capillary length. Injection length of the sample: 11 % of the capillary length.

Because of the presence of this abundant interfering ion, the analytes cannot be all detected from the base peak electropherogram (BPE) m/z 50-200 Th, as shown in Figure 9a.

The signal-to-noise ratio, however, can be enhanced in the extracted ion electropherogram (EIE) mode (Figure 9b).

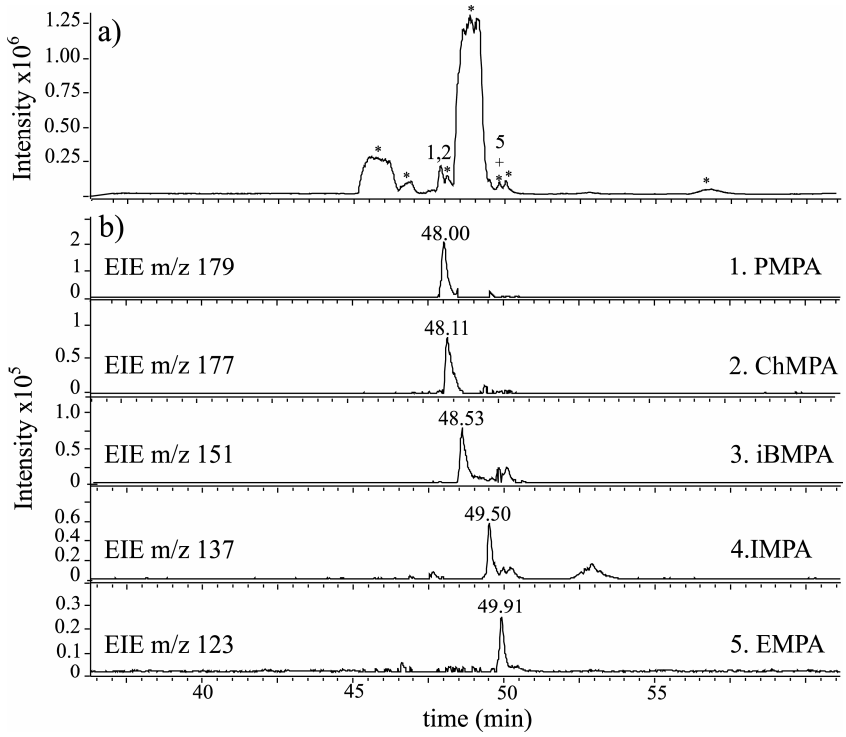



**Figure 9 :** Analysis of rat urine (1:1, v/v) diluted with water and fortified with the analytes at 5 µg.mL$^{-1}$ by tITP-CZE-MS. a) BPE m/z 50-200 Th and b) EIEs corresponding to PMPA (EIE m/z 179), ChMPA (EIE m/z 177), iBMPA (EIE m/z 151), IMPA (EIE m/z 137) and EMPA (EIE m/z 123). CE and MS conditions as in Figure 8. * interfering rat urine ion.

The limits of detections (signal-to-noise of 3) were determined in rat urine from BPE m/z 50-200 Th (Table 3a). Limits of detections can be enhanced using EIEs (Table 3b).

| | **PMPA** | **ChMPA** | **iBMPA** | **IMPA** | **EMPA** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Migration order** | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **a) LOD in rat urine (ng.mL$^{-1}$)** fom BPE 50-200 Th | 10 | 38 | 38 | 120 | 220 |
| **b) LOD in rat urine (ng.mL$^{-1}$)** from EIEs | 4.5 | 13 | 13 | 40 | 75 |

**Table 3 :** Limits of detection of the studied alkyl methylphosphonic acids in rat urine diluted (1:1, v/v) with water determined from a) base peak electropherogram (BPE) m/z 50-200 Th and b) extracted ion electropherograms (EIEs). CE and MS conditions as in Figure 8.

The limits of detections obtained in soil extracts (Table 2) and in rat urine (Table 3) showed an increasing tendency as the apparent mobility and the size of the analytes decreased. This was due in part to the fact that the time during which an analyte stays stacked

in ITP mode decreases as the effective mobility of the analyte increases and to the fact that, as already observed, the ionization efficiency decreases upon decreasing molecular size [28,36-38].

## 2.4 Conclusion

Transient ITP was successfully used prior to CZE-MS for the preconcentration of alkyl methylphosphonic acids in high-conductivity matrices such as soil extract and rat urine. This preconcentration technique provided a 40-fold sensitivity enhancement as compared to the results obtained in CZE without any preconcentration procedure. The limits of detections in soil extract and in rat urine were between 9 and 220 $ng.mL^{-1}$ from BPE m/z 50-200 Th and between 4 and 75 $ng.mL^{-1}$ from EIEs. tITP performances could be further enhanced by suppressing electroosmotic flow. tITP-CZE-MS induced by the separation medium with the TE acting as the BGE could also be evaluated. Indeed, this configuration could be interesting to favor the preconcentration of analytes having higher effective mobility, also corresponding to those of lower molecular size having lower ionization efficiency.

## 3. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la technique de préconcentration par isotachophorèse transitoire (tITP) peut être utilisée pour améliorer la sensibilité de détection d'acides alkyl méthylphosphoniques contenus dans des matrices de forte conductivité par CE-MS. Des limites de détection comprises entre 9 et 200 $ng.mL^{-1}$ ont ainsi pu être atteintes pour des acides alkyl méthylphosphoniques contenus dans un extrait de sol à partir du signal obtenu en mode BPE (base peak electropherogram) sur la gamme de masse m/z 50-200 Th. De meilleures limites de détection, comprises entre 4 et 70 $ng.mL^{-1}$, ont pu être obtenues en utilisant le mode EIE (extracted ion electropherogram) qui permet d'extraire, du courant d'ion total, le signal correspondant aux rapports m/z des analytes. La technique tITP-CZE-MS a ensuite été appliquée à l'analyse d'acides alkyl méthylphosphoniques présents dans l'urine de rat. Cependant, un interférent particulièrement abondant, issu de l'urine de rat et dont le rapport m/z et la mobilité sont proches de ceux des analytes, a été observé. Les analytes qui comigrent avec cet interférent, ne peuvent donc être détectés qu'en utilisant le mode EIE. Des limites de détection des acides alkyl méthylphosphoniques contenus dans l'urine de rat comprises entre 10 et 220 $ng.mL^{-1}$ en mode BPE (m/z 50-200 Th) et entre 4.5 et 75 $ng.mL^{-1}$ en mode EIE ont été atteintes.

Le traitement de l'échantillon d'urine de rat, requis pour les analyses par tITP-CZE-MS, a simplement consisté à filtrer et diluer l'échantillon (1:1, v/v) avec de l'eau pure. Ce traitement d'échantillon très simple et rapide, permet d'envisager l'utilisation de cette méthode pour réaliser un criblage de métabolites d'agents neurotoxiques (acides alkyl méthylphosphoniques) contenus dans l'urine de rat. Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il semble mettre en évidence un avantage de la CE-MS par rapport à la LC-MS. Des travaux réalisés au laboratoire sur la détection de métabolites d'agents neurotoxiques dans l'urine de rat par LC-MS, ont en effet montré qu'un traitement significatif de l'échantillon (passage sur cartouche échangeuse de cations puis sur cartouche SPE $C_{18}$) était requis avant l'analyse pour éviter une suppression du signal ou une pollution de la source, dues aux nombreux sels présents dans cette matrice.

Une méthode de quantification du métabolite du sarin (l'acide isopropyl méthylphosphonique) retrouvé dans l'urine d'un rat intoxiqué au sarin, a été développée au laboratoire en LC-MS, et a montré les résultats suivants (Tableau 3) :

| | **0,5 $DL_{50}$ (51 µg.kg$^{-1}$)** | **0,1 $DL_{50}$ (10,3 µg.kg$^{-1}$)** |
|---|---|---|
| **5 heures après intoxication** (ng.mL$^{-1}$) | 800 | 350 |
| **24 heures après intoxication** (ng.mL$^{-1}$) | 350 | 50 |
| **29 heures après intoxication** (ng.mL$^{-1}$) | 35 | 5 |

**Tableau 3 :** Concentration d'acide isopropyl méthylphosphonique présent dans l'urine de rats intoxiqués au sarin (injecté par voie sous cutanée) récoltée 5 heures, 24 heures ou 29 heures après une intoxication correspondant à 0,5 $DL_{50}$ ou 0,1 $DL_{50}$. Les résultats correspondent à la moyenne des concentrations mesurées chez trois rats d'environ 300 g. Traitement de l'urine avant analyse par LC-MS: passage sur cartouche échangeuse de cations puis sur cartouche SPE $C_{18}$. Dispositif LC-MS : micro-colonne greffée $C_{18}$, spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation et d'un triple quadripôle fonctionnant en mode d'acquisition par filtrage sélectif de l'analyte (Multiple Reaction Monitoring, MRM).

Ces résultats obtenus en LC-MS montrent que les performances de la méthode tITP-CZE-MS, qui permet d'atteindre une limite de détection de l'acide isopropyl méthylphosphonique de 120 ng.mL$^{-1}$ en mode BPE et de 40 ng.mL$^{-1}$ en mode EIE dans l'urine de rat, doivent encore être améliorées. La suppression de l'écoulement électroosmotique est, par exemple, connue pour améliorer les performances de l'ITP car elle permet de minimiser les perturbations dues aux différences d'écoulement électroosmotique entre les différentes zones et, le plus souvent, de prolonger l'ITP, permettant ainsi d'approcher davantage l'état stationnaire [6,12,21,23]. Il pourrait aussi être intéressant de développer une méthode de tITP-CZE-MS impliquant l'utilisation d'un électrolyte terminal agissant également en tant qu'électrolyte de séparation. Dans cette configuration, les analytes les plus mobiles (en mobilités effectives) resteraient plus longtemps préconcentrés en mode ITP que les analytes les moins mobiles. Cela pourrait permettre d'améliorer la sensibilité de détection des analytes de plus petite taille qui sont aussi les composés possédant les plus faibles efficacités d'ionisation.

## 4. Références

[1] C.A. Boulet, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 909-923, Ed. Meyers, Wiley, Chichester 2000.

[2] D.S. Burgi, R.-L. Chien, *Capillary Electrophoresis Guidebook*, pp. 211-226, Ed. K.D. Altria, Humana Press, Totowa 1996.

[3] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis* 24 (2003) 466-485.

[4] M.C. Breadmore, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 22 (2001) 2464-2489.

[5] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768-2779.

[6] A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Electrophoresis* 27 (2006) 323-340.

[7] Z. Huang, K. Ito, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A* 1055 (2004) 229-234.

[8] K. Fukushi, N. Ishlo, M. Sumida, S. Takeda, S.-I. Wakida, K. Hiro, *Electrophoresis* 21 (2000) 2866-2871.

[9] T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, A.R. Timerbaev, *Electrophoresis* 24 (2003) 2328-2334.

[10] T.Hirokawa, M. Yoshioka, H.Okamoto, AR. Timerbaev, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 165-170.

[11] M. Mazereeuw, V. Spikmans, U.R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 219-233.

[12] A. Riaz, B. Kim, D.S. Chung, *Electrophoresis* 24 (2003) 2788-2795.

[13] A. Riaz, D.S. Chung, *Electrophoresis* 26 (2005) 668-673.

[14] L. Křivánková, M. Brezkova, P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 25 (2004) 3406-3415.

[15] L. Křivánková, A. Vrana, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 772 (1997) 283-295.

[16] H. Okamoto, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 522-528.

[17] Z.Huang, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 75-79.

[18] L. Křivánková, P. Gebauer, W. Thormann, R.A. Mosher, P. Boček, *J. Chromatogr.* 638 (1993) 119-135.

[19] J. Boden, K. Bächmann, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 319-330.

[20] P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček, *J. Chromatogr.* 608 (1992) 47-57.

[21] L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 55-70.

[22] H.R. Udseth, J.A. Loo, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 61 (1989) 228-232.

[23] Z.D. Peterson, C.R. Bowerbank, D.C. Collins, S.W. Graves, M.L. Lee, *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 169-179.

[24] E. van der Vlis, M. Mazereeuw, U.R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr. A* 712 (1995) 227-234.

[25] Y. An, J.W. Cooper, B.M. Balgley, C.S. Lee, *Electrophoresis* 27 (2006) 3599-3608.

[26] H. Stutz, G. Bordin, A.R. Rodriquez, *Electrophoresis* 25 (2004) 1071-1089.

[27] M. Larsson, E.S.M. Lutz, *Electrophoresis* 21 (2000) 2859-2865.

[28] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *LC-GC North America* 25 (2007) 2-6.

[29] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, N. Delaunay, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, soumis à *J. Chromatogr. A*

[30] C. Montauban, A. Bégos, B. Bellier, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2791-2796.

[31] R.G. Cooks, A.L. Rockwood, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5 (1991) 53.

[32] M. Vaher, M. Koel, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 83-88.

[33] P. Gebauer, L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, W. Thormann, *Electrophoresis* 21 (2000) 2797-2808

[34] J.-P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *Chromatographia* 834 (1998) 1-6.

[35] D. Mosset, P. Gareil, R. Rosset, *J. Chromatogr.* 390 (1987) 241-248.

[36] R. Kostiainen, A.P. Bruins,V.W.A. Häkkinen, *J. Chromatogr.* 634 (1993) 113-118.

[37] A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345-357.

[38] D.R. Zook, E.P. Grimsrud, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2 (1991) 232-239.

# Conclusion générale et perspectives

L'entrée en vigueur de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques depuis 1997 et l'augmentation de la menace terroriste nécessitent le développement de méthodes d'analyse permettant d'identifier des agents de guerre chimique. Lors de ce travail, des méthodes d'analyse par couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse (CE-MS) ont été développées pour la détection et l'identification de produits de dégradation d'agents neurotoxiques (acides alkyl alkylphosphoniques spécifiques et acides alkylphosphoniques non-spécifiques) contenus dans des matrices environnementales (eau potable, eau de rivière, extrait de sol) et biologiques (urine de rat). Le couplage CE-MS s'avère en effet particulièrement intéressant pour l'analyse de tels composés chargés ou très polaires et permet de bénéficier des principes de séparation particuliers, de la grande efficacité de séparation et de la très faible consommation d'échantillon de l'électrophorèse capillaire, alliés à la sensibilité et aux grandes capacités d'identification de la spectrométrie de masse.

La première partie de ce travail a consisté à évaluer la sélectivité et les capacités d'identification du couplage CE-MS pour l'analyse d'acides alkyl alkylphosphoniques et alkylphosphoniques contenus dans l'eau ou des extraits de sol. Les expériences CE-MS-MS se sont avérées particulièrement efficaces pour identifier des acides alkyl alkylphosphoniques isomères malgré leur comigration, grâce à la présence d'ions fragments spécifiques. La séparation par CE est toutefois indispensable pour différencier les acides alkylphosphoniques isomères qui sont indiscernables en MS-MS. L'ensemble de ces premiers résultats a donc permis de mettre en évidence la grande complémentarité de l'électrophorèse capillaire et de la spectrométrie de masse pour l'identification de produits de dégradation d'agents de guerre chimique contenus dans l'eau ou des extraits de sol.

Deux méthodes de préconcentration électrophorétique en ligne ont ensuite été développées pour améliorer la sensibilité de détection. La préconcentration par amplification du champ électrique (FASS) a ainsi permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 et d'atteindre des limites de détection des acides alkyl alkylphosphoniques comprises entre 0,25 et 0,50 $\mu g.mL^{-1}$ dans des matrices environnementales de faible conductivité (eau potable et eau de rivière). La répétabilité et la linéarité du signal satisfaisantes qui ont été obtenues permettent d'envisager l'utilisation de cette technique pour réaliser des analyses quantitatives.

Une méthode de préconcentration par isotachophorèse transitoire (tITP) a ensuite été développée pour améliorer la sensibilité de détection d'acides alkyl alkylphosphoniques contenus dans des matrices de forte conductivité (extrait de sol et urine de rat) en CE-MS. La méthode tITP-CZE-MS développée a ainsi permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 40 environ et d'atteindre des limites de détection des acides alkyl alkylphosphoniques contenus dans un extrait de sol ou de l'urine de rat comprises entre 9 et 220 $ng.mL^{-1}$ en mode BPE (base peak electropherogram) m/z 50-200 Th, et comprises entre 4 et 75 $ng.mL^{-1}$ en mode EIE (extracted ion electropherogram).

Ce travail permet d'envisager de nombreuses perspectives. Le couplage CE-MS semble bien adapté à l'analyse de matrices complexes et pourrait permettre d'éviter ou de simplifier le traitement d'échantillon nécessaire avant l'analyse. L'analyse de produits de dégradation d'agents de guerre chimique contenus dans d'autres matrices complexes, telles que les liquides de décontamination, riches en sels et en tensioactifs, pourrait donc être développée.

Les recherches effectuées sur les méthodes d'identification d'agents de guerre chimique contenus dans des d'échantillons biologiques sont actuellement importantes. Il serait donc intéressant de poursuivre le développement de la méthode de tITP-CZE-MS, qui a été mise au point pour détecter les métabolites spécifiques d'agents neurotoxiques dans l'urine de rat, afin d'améliorer encore les limites de détection et d'élargir son application à d'autres échantillons biologiques comme le plasma.

Des méthodes CE-MS pourraient par ailleurs être développées pour analyser des composés neutres liés aux agents de guerre chimique. Cela nécessiterait l'introduction de sélecteurs dans le milieu de séparation tels que des cyclodextrines ou des micelles de tensioactif. La principale difficulté résiderait alors dans l'incompatibilité de ces sélecteurs peu volatils avec la détection par spectrométrie de masse. Des méthodes de remplissage partiel pourraient par exemple être développées pour empêcher ou réduire l'introduction de ces composés dans le spectromètre de masse. Il pourrait aussi être intéressant d'évaluer le couplage CE-MS pour la détection et l'identification de toxines protéiques (phytotoxines par exemple) ou non-protéiques (mycotoxines par exemple) présentes dans des liquides de biocollecte. Enfin, à plus long terme, les techniques CE-MS développées pourraient être intégrées dans des microsystèmes qui sont particulièrement intéressants pour l'analyse de terrain.

# Annexe

# Détermination de la première constante d'acidité des acides propylphosphonique et isopropylphosphonique par CE-MS

## 1. Théorie

La dissociation d'un diacide $AH_2$ peut être décrite par les équilibres suivants :

$$AH_2 + H_2O \leftrightarrows AH^- + H_3O^+ \quad K^{th}_{AH_2 / AH^-} = Ka_2$$

$$AH^- + H_2O \leftrightarrows A^{2-} + H_3O^+ \quad K^{th}_{AH^- / A^{2-}} = Ka_1$$

La constante thermodynamique de dissociation de l'espèce $AH^-$ ($K^{th}_{AH^- / A^{2-}} = Ka_1$) est définie par la relation suivante :

$$K^{th}_{AH^- / A^{2-}} = \frac{\gamma_{H_3O^+}\gamma_{A^{2-}}}{\gamma_{AH^-}} \frac{[H_3O^+][A^{2-}]}{[AH^-]}$$

où les termes $\gamma$ représentent les coefficients d'activité des espèces, et les termes entre crochets correspondent aux concentrations molaires. En considérant que $pH = -\log(\gamma_{H_3O^+}[H_3O^+])$, la constante thermodynamique de dissociation de l'acide $AH^-$, $pK^{th}_{AH^- / A^{2-}}$, peut être définie comme :

$$pK^{th}_{AH^- / A^{2-}} = pH - \log\frac{[A^{2-}]}{[AH^-]} - \log\frac{\gamma_{A^{2-}}}{\gamma_{AH^-}}$$

La constante d'acidité apparente $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ est définie par la relation suivante :

$$pK'_{AH^-/A^{2-}} = pH - \log\frac{[A^{2-}]}{[AH^-]}$$

Le coefficient d'activité d'un ion i ($\gamma_i$) présent dans une solution diluée à 25°C peut être exprimé selon la théorie de Debye-Hückel [1] :

$$-\log\gamma_i = \frac{0.51 z_i^2 \sqrt{I}}{1+0.33a\sqrt{I}}$$

où $z_i$ représente la charge de l'espèce i, et I la force ionique de la solution. La valeur du paramètre a, qui correspond au diamètre de l'ion i solvaté, est un paramètre généralement inconnu dont la valeur est comprise entre 1 et 10 Å. Le modèle de Güntelberg [2] fixe la valeur du paramètre a à 3 Å, ce qui permet d'exprimer le coefficient d'activité selon la relation suivante :

$$-\log\gamma_i = \frac{0.51 z_i^2 \sqrt{I}}{1+\sqrt{I}}$$

La force ionique I de la solution est définie comme :

$$I = 0.5\sum_j [j] z_j^2$$

où [j] et $z_j$ correspondent à la concentration et à la charge de toutes les espèces présentes dans la solution.

## 2. Détermination de constantes d'acidité par électrophorèse capillaire [3-7]

La mobilité effective de l'espèce A ($\mu_{eff}A$) dépend de son degré d'ionisation et des mobilités absolues des formes $AH^-$ ($\mu^0_{AH^-}$) et $A^{2-}$ ($\mu^0_{A^{2-}}$) selon :

$$\mu_{eff}{}^A = \frac{[AH^-]}{[A^{2-}]+[AH^-]+[AH_2]}\mu^0_{AH^-} + \frac{[A^{2-}]}{[A^{2-}]+[AH^-]+[AH_2]}\mu^0_{A^{2-}}$$

Expérimentalement, la mobilité effective peut être calculée à partir du temps de migration de l'analyte ($t_m$) et du marqueur d'écoulement électroosmotique ($t_{eo}$) selon la relation suivante :

$$\mu_{eff}{}^A = \frac{L_{tot} L_{dét}}{V}\left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}}\right)$$

où $L_{tot}$ correspond à la longueur totale du capillaire et $L_{dét}$ à la longueur comprise entre l'entrée du capillaire et la fenêtre de détection (lorsque les composés sont détectés par spectrométrie de masse, $L_{tot}=L_{dét}$).

La constante d'acidité $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ d'une espèce peut être déterminée en reportant l'évolution de sa mobilité effective en fonction du pH de l'électrolyte. La valeur de $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ correspond au point d'inflexion de la courbe sigmoïdale obtenue, qui peut être déterminé grâce au logiciel Origin 6.0. Il est important de noter que les différents électrolytes utilisés pour la détermination de constantes d'acidité doivent posséder la même force ionique pour pouvoir attribuer la valeur de la constante d'acidité déterminée à une force ionique donnée.

## 3. Résultats obtenus

Un échantillon constitué des acides propylphosphonique et isopropylphosphonique dilués à 100 $\mu g.mL^{-1}$ dans l'eau pure a été introduit dans un capillaire de 85 cm x 50 µm d.i. par injection hydrodynamique (50 mbars, 5 s). Les expériences ont été réalisées en CE-MS dans les conditions de détection décrites dans le Chapitre II. L'injection de l'échantillon a été répétée trois fois pour chaque valeur du pH de l'électrolyte de séparation. Les différents électrolytes de séparation de force ionique égale à 15 mM, qui ont été utilisés pour déterminer les deux constantes d'acidité sont décrits dans le Tableau 1. La température de la cassette contenant le capillaire a été fixée à 25°C.

| composition de l'électrolyte | | | | | | pH | I (mM) | Pouvoir tampon (mM/unité de pH) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $CH_3COOH$ | 20 | mM + | triéthanolamine | 15,03 | mM | 4,97 | 15 | 8,78 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 30 | mM | 7,77 | 14,99 | 17,51 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 35 | mM | 7,9 | 14,99 | 20,03 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 40 | mM | 8,06 | 14,99 | 21,93 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 45 | mM | 8,11 | 14,99 | 23,42 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 55 | mM | 8,25 | 14,99 | 25,58 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 60 | mM | 8,31 | 14,99 | 26,4 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | triéthanolamine | 80 | mM | 8,49 | 14,99 | 28,64 |
| $CH_3COOH$ | 15 | mM + | $NH_3$ | 25 | mM | 9,27 | 15,01 | 13,98 |
| $CH_3COOH$ | 14,95 | mM + | $NH_3$ | 50 | mM | 9,86 | 15 | 24,72 |
| $CH_3COOH$ | 14,72 | mM + | $NH_3$ | 200 | mM | 10,61 | 14,99 | 33,29 |

**Tableau 1 :** Composition, pH, force ionique et pouvoir tampon (calculés avec le logiciel PeakMaster 5.1) des différents électrolytes de séparation qui ont été utilisés pour la détermination des constantes d'acidité avec pKa($CH_3COOH$)=4,76 ; pKa(éthanolamine)=7,76 ; pKa($NH_4OH$)=9,25.

Les mobilités effectives des acides propylphosphonique et isopropylphosphonique ont été calculées puis reportées en fonction du pH de l'électrolyte. La valeur du $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ de

chacun de ces deux composés a été déterminée grâce au logiciel Origin 6.0 à partir de la courbe sigmoïdale obtenue (Figure 1).

| | $\lvert\mu_{eff}\rvert_{moyenne}$ $10^{-5}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) | | | |
|---|---|---|---|---|
| pH | IPA | *RSD%* | PrPA | *RSD%* |
| 4.97 | 28.77 | *1.16* | 28.77 | *1.16* |
| 7.77 | 31.83 | *0.64* | 33.28 | *0.79* |
| 7.90 | 33.08 | *0.54* | 34.73 | *0.50* |
| 8.06 | 33.31 | *0.18* | 35.02 | *0.25* |
| 8.11 | 34.17 | *0.43* | 35.96 | *0.38* |
| 8.25 | 35.32 | *0.61* | 37.23 | *0.81* |
| 8.31 | 35.64 | *0.75* | 37.50 | *0.73* |
| 8.49 | 36.93 | *0.57* | 38.75 | *0.38* |
| 9.27 | 42.76 | *0.39* | 43.86 | *0.32* |
| 9.86 | 43.79 | *0.35* | 44.41 | *0.25* |
| 10.61 | 44.40 | *1.08* | 44.40 | *1.08* |

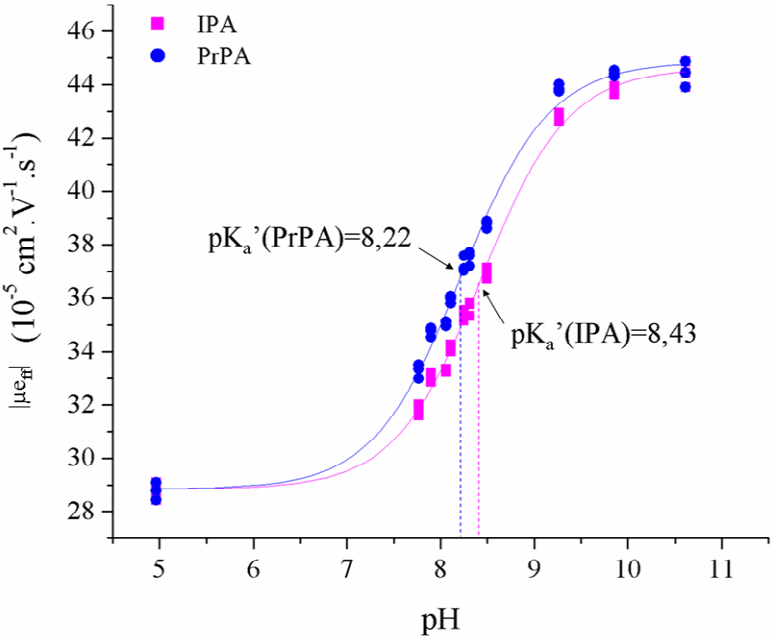



**Figure 1 :** Evolution des mobilités effectives des acides isopropylphosphonique et propylphosphonique (exprimées en valeurs absolues) en fonction du pH de l'électrolyte de force ionique 15 mM.

Les valeurs de $pK'_{AH^-/A^{2-}}$ obtenues expérimentalement pour I=15 mM correspondent à 8,22 pour l'acide propylphosphonique et à 8,43 pour l'acide isopropylphosphonique. La constante thermodynamique de dissociation $pK^{th}_{AH^-/A^{2-}}$, qui est indépendante des conditions de séparation, peut être calculée en corrigeant la valeur expérimentale de $pK'_{AH^-/A^{2-}}$. Pour des électrolytes de force ionique égale à 15 mM, la correction correspond à l'addition du terme suivant :

$$-\log\frac{\gamma_{A^{2-}}}{\gamma_{AH^-}} = \frac{0.51(z_{A^{2-}})^2\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - \frac{0.51(z_{AH^-})^2\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} = 0.22 - 0.06 = 0.16$$

Les valeurs de $pK^{th}_{AH^-/A^{2-}}$ sont donc égales à 8,38 pour l'acide propylphosphonique et 8,59 pour l'acide isopropylphosphonique. Ces valeurs sont proches des constantes d'acidités apparentes mesurées par Crofts *et al.* par potentiométrie à 25°C et pour une force ionique de 5 mM (8,18 pour l'acide propylphosphonique et 8,44 pour l'acide isopropylphosphonique [8]).

## 4. Conclusion

Ce travail montre que des constantes d'acidité peuvent être déterminées en CE-MS ce qui est particulièrement intéressant pour des composés qui sont transparents dans l'UV. Les déviations relatives standard (RSD) qui ont été obtenues pour les valeurs des mobilités effectives répétées trois fois pour un même pH sont bonnes. Cependant, les temps de migration des analytes obtenus aux différents pH sont assez longs (entre 6 et 11 minutes) en raison de la longueur importante du capillaire qui est nécessaire pour réaliser des expériences CE-MS. Les temps d'analyse pourraient être écourtés en utilisant, par exemple, un inverseur d'écoulement électroosmotique. Par ailleurs, le choix des électrolytes utilisables est limité aux électrolytes volatils en CE-MS.

## 5. Références

[1] P. Debye, E. Hückel, *Phys. Z.* 24 (1923) 305-325.

[2] E. Guntelberg, *Z. Phys. Chem.* 123 (1926) 199-247.

[3] S.K. Poole, S. Patel, K. Dehring, H. Workman, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 445-454.

[4] L. Geiser, Y. Henchoz, A. Galland, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, *J. Sep.Sci.* 28 (2005) 2374-2380.

[5] J.-P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, *Chromatographia* 834 (1998) 1-6.

[6] J.M. Herrero-Martínez, M. Sanmartin, M. Rosés, E. Bosch, C. Ràfols, *Electrophoresis* 26 (2005) 1886–1895.

[7] M. Matoga ,E. Laborde-Kummer, M.H. Langlois, P. Dallet, J.J. Bosc, C. Jarry, J.P. Dubost, *J. Chromatogr. A,* 984 (2003) 253–260.

[8] P.C. Crofts, G.M. Kosolapoff, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 3379-3382.

## Résumé

L'entrée en vigueur de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques depuis 1997 et l'augmentation de la menace terroriste nécessitent le développement de méthodes d'analyse permettant d'identifier des agents de guerre chimique. Le couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse (CE-MS) présente des propriétés intéressantes pour l'analyse de composés chargés ou très polaires tels que les produits de dégradation d'agents neurotoxiques (acides alkyl alkylphosphoniques spécifiques et acides alkylphosphoniques non-spécifiques).

Le développement d'une méthode CE-MS pour l'analyse d'un mélange constitué d'acides alkyl alkylphosphoniques et alkylphosphoniques comportant des composés isomères, a permis d'évaluer la sélectivité et les capacités d'identification du couplage CE-MS. Les expériences CE-MS-MS se sont avérées particulièrement efficaces pour identifier des acides alkyl alkylphosphoniques isomères non séparés en CE, tandis que la séparation par CE est indispensable pour différencier des acides alkylphosphoniques isomères indiscernables en MS-MS. Deux méthodes de préconcentration électrophorétique en ligne ont ensuite été développées pour améliorer la sensibilité de détection. La préconcentration par amplification du champ électrique (FASS) a ainsi permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 dans des matrices environnementales de faible conductivité (eau potable et eau de rivière). Des limites de détection des acides alkyl alkylphosphoniques comprises entre 0,25 et 0,50 $\mu g.mL^{-1}$ ont été atteintes. La préconcentration par isotachophorèse transitoire (tITP) a ensuite été développée pour améliorer la sensibilité de détection d'acides alkyl méthylphosphoniques contenus dans des matrices de forte conductivité (extrait de sol et urine de rat) en CE-MS. La méthode tITP-CZE-MS a ainsi permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 40 environ et d'atteindre des limites de détection des acides alkyl méthylphosphoniques contenus dans un extrait de sol et de l'urine de rat comprises entre 9 et 220 $ng.mL^{-1}$.



**Mots-clés :** agents de guerre chimique, analyse d'échantillons biologiques, analyse environnementale, couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse, préconcentration électrophoprétique.



## Summary

The implementation of the Chemical Weapons Convention since 1997 and the increasing terrorist threat, promote the development of analytical methods providing the identification of chemical warfare agents. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) presents interesting properties for the analysis of charged or very polar compounds such as nerve agents degradation products (specific alkyl alkylphosphonic acids and non-specific alkylphosphonic acids).

Development of a CE-MS method for the analysis of a mixture of alkyl alkylphosphonic and alkylphosphonic acids containing isomeric compounds, allowed the evaluation of selectivity and identification capabilities of CE-MS coupling. CE-MS-MS experiments appeared to be a particularly efficient tool for the identification of co-migrating isomeric alkyl alkylphosphonic acids; whereas CE was mandatory for the identification of isomeric alkylphosphonic acids which cannot be differentiated in MS-MS. Two electrophoretic preconcentration techniques were then developed to enhance sensitivity of CE-MS. Thus, field-amplified sample stacking (FASS) provided a 10-fold sensitivity enhancement in low-conductivity environmental matrices (tap water and river water). Limits of detection of alkyl alkylphosphonic acids between 0.25 and 0.50 $\mu g.mL^{-1}$ were reached. Preconcentration by transient isotachophoresis (tITP) was next developed to enhance sensitivity for the detection of alkyl methylphosphonic acids contained in high-conductivity matrices (soil extract and rat urine) by CE-MS. The developed tITP-CZE-MS method provided a 40-fold sensitivity enhancement and limits of detection of alkyl methylphosphonic acids contained in soil extracts and in rat urine between 9 et 220 $ng.mL^{-1}$.



**Key words:** chemical warfare agents, biological sample analysis, environmental analysis, capillary electrophoresis - mass spectrometry coupling, electrophoretic preconcentration.



**Centre d'Etudes du Bouchet, Département Analyse Chimique,**
**5 rue Lavoisier BP 3 - 91 710 Vert-le-Petit - France**