

Preparación de muestras

Juan Manuel Silva

Js.juanmanuelsilva@gmail.com

Área Tecnología Química

Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas

Análisis Industrial 2024



Toma de muestra
Y
transporte

Preparación
de muestra

Análisis

Interpretación
de resultados
y reporte

Reprocesamiento?

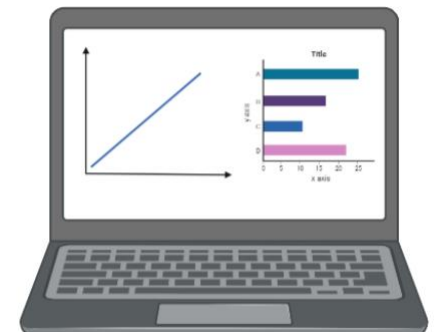
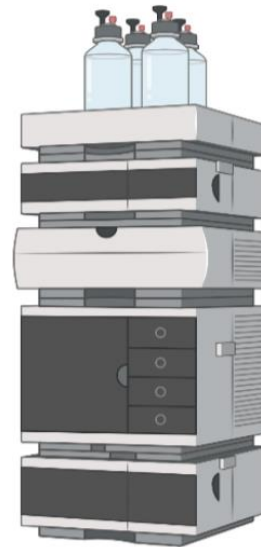
Toma de muestra
Y
transporte

Preparación
de muestra

Análisis

Interpretación
de resultados
y reporte

Reprocesamiento?



Preparación de muestras

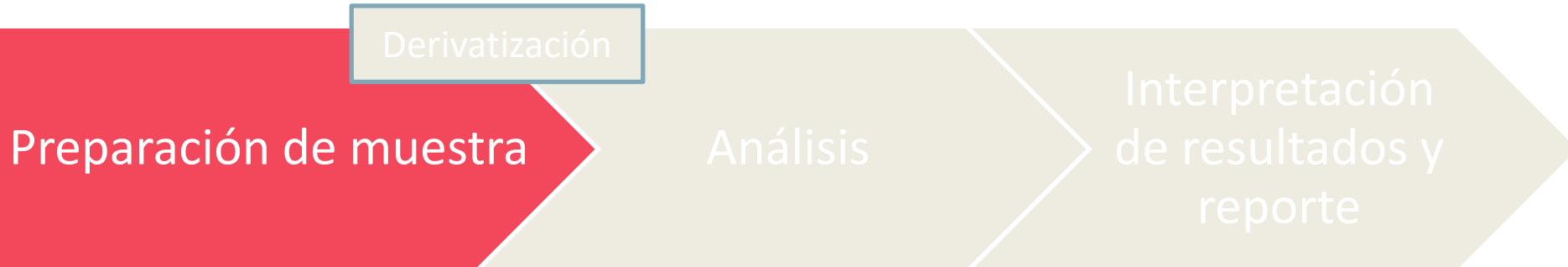


- Extracción sólido-líquido
- Extracción por fluidos supercríticos
- Extracción líquido-líquido
- QuEChERS
- SPE
- Digestión ácida

HPLC
GC

Programas estadísticos o
software de equipo

Preparación de muestras



- **Extracción sólido-líquido**
 - **Extracción por fluidos supercríticos**
 - **Extracción líquido-líquido**
 - QuEChERS
 - SPE
 - Digestión ácida
- Escalables para extraer analitos de interés industrial

Preparación de muestras

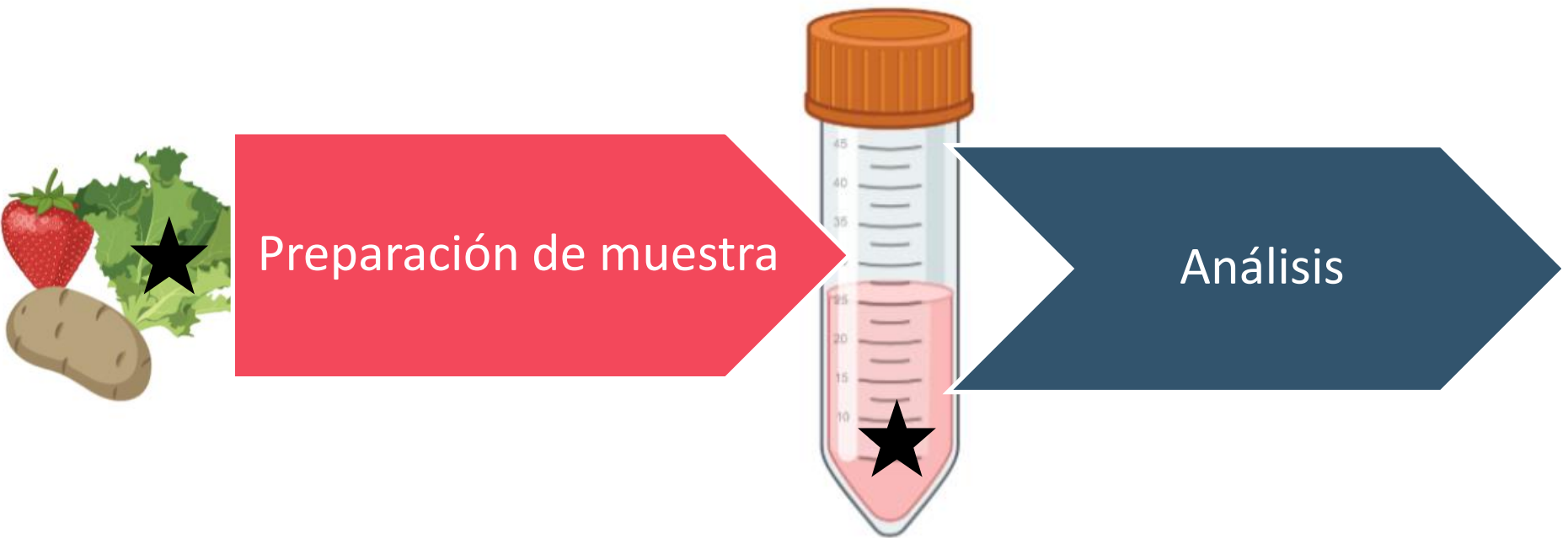
Preparación de muestra

- Extracción sólido-líquido
- Extracción por fluidos supercríticos
- Extracción líquido-líquido
- QuEChERS
- SPE
- Digestión ácida

Preparación de muestras

Preparación de muestras/Método de extracción

Es el aislamiento y/o la concentración de ciertos analitos objetivos (minoritarios o mayoritarios) desde la **matriz**, haciendo que estos compuestos estén en medio más adecuado para el siguiente paso de análisis.



Preparación de muestras

Preparación de muestras/Método de extracción

Es el aislamiento y/o la concentración de ciertos analitos objetivos (minoritarios o mayoritarios) desde la **matriz**, haciendo que estos compuestos estén en medio más adecuado para el siguiente paso de análisis.

Por qué llevar a cabo preparación de muestras?

- Simplificar el análisis de muestras complejas
 - Remover interferencias de la matriz
 - Acelerar los análisis
 - Concentrar o diluir la muestra
1. Mejorar la sensibilidad (aumenta la señal)
 2. LOD/LOQ menores
 3. Mejor resolución de picos cromatográficos
- *Cuestiones técnicas*
 1. Alarga la vida de la columna cromatográfica
 2. Reduce la frecuencia del mantenimiento del detector
 3. Las jeringas de inyección tienen menos tendencia a tener bloqueos
 4. Reducción en la contaminación del equipo

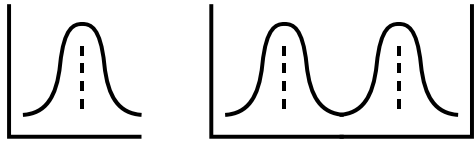


Preparación de muestras

Preparación de muestras/Método de extracción

Es el aislamiento y/o la concentración de ciertos analitos objetivos desde la **matriz**, haciendo que estos compuestos sean más adecuados para el siguiente paso de análisis.

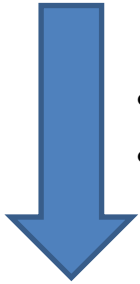
Por qué llevar a cabo preparación de muestras?

- Simplificar el análisis de muestras complejas
 - Remover interferencias de la matriz
 - Acelerar los análisis
 - Concentrar o diluir la muestra
1. Mejorar la sensibilidad (aumenta la señal)
 2. LOD/LOQ menores
 3. Mejor resolución de picos cromatográficos
- 
- **Cuestiones técnicas**
1. Alarga la vida de la columna cromatográfica
 2. Reduce la frecuencia del mantenimiento del detector
 3. Las jeringas de inyección tienen menos tendencia a tener bloqueos
 4. Reducción en la contaminación del equipo

Características generales a considerar

Propiedades Fisicoquímicas del analito: Estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedad acido-base (pK_a) y *respuesta frente al detector seleccionado para el análisis*.

Concentración de analito en la muestra: Si la concentración es alta, la preparación de muestra es sencilla (la pérdida de analito entre los pasos será insignificativa). Si la *concentración es baja*, puede requerir métodos más complejos.



- Respuesta baja o nula a nuestro detector
- Baja concentración de analito en la muestra

Características generales a considerar

Propiedades Fisicoquímicas del analito: Estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedad ácido-base (pK_a) y *respuesta frente al detector seleccionado para el análisis*.

Concentración de analito en la muestra: Si la concentración es alta, la preparación de muestra es sencilla (la pérdida de analito entre los pasos será insignificativa). Si la *concentración es baja*, puede requerir métodos más complejos con numerosos pasos.

- Respuesta baja o nula a nuestro detector
- Baja concentración de analito en la muestra



Derivatización



La derivatización es un paso que se intenta evitar ya empleamos más reactivos y solventes que pueden ser peligrosos. En contra de los principios de la química verde.

Características generales a considerar

Propiedades Fisicoquímicas del analito: Estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedad acido-base (pK_a) y *respuesta frente al detector seleccionado para el análisis*.

Concentración de analito en la muestra: Si la concentración es alta, la preparación de muestra es sencilla (la pérdida de analito entre los pasos será insignificativa). Si la *concentración es baja*, puede requerir métodos mas complejos con numerosos pasos.

- Respuesta baja o nula a nuestro detector
- Baja concentración de analito en la muestra



Derivatización



Naturaleza de la matriz: Remoción de componentes de la matriz suele ser paso crítico cuando la concentración de analito se detecta con dificultad. La matriz puede contener impurezas cuyos picos (señal) interfieren con el pico de nuestro analito. También estas impurezas pueden dañar nuestro equipo de análisis.

Compatibilidad con el detector: No es conveniente utilizar solventes como acetona o tolueno si se utiliza un detector UV, estos solventes poseen elevada abs de base y pueden producir picos o señales que interfieran en nuestro análisis.

Preparación de muestras

Naturaleza de la muestra y tratamiento previo



Muestras líquidas (poco complejas)

- 1-Filtración, concentración
- 2-Preparación de muestra
- 3-Análisis

Muestras sólidas

- 1-Molienda, homogeneización, secado
- 2- Preparación de muestra (QuEChERS, SPE). Los analitos deben solubilizarse en solvente adecuado
- 3-Análisis

Muestras gaseosas

- 1-Desorción con solvente
- 2-Análisis

Preparación de muestras

Naturaleza de la muestra y tratamiento previo

Desproteínización

Las proteínas se eliminan ya que pueden ser interferentes durante el análisis.

Se separan por precipitación por el agregado de varios agentes: solventes orgánicos, sales, ácidos o por ultracentrifugación.

- **Solventes orgánicos** (ACN, MeOH, EtOH) agregados a una solución acuosa, disminuyen la solubilidad de las proteínas e inducen su precipitación.
- **Salting in**, agregado de sales neutras (NaCl), disminuye la atracción de las moléculas de las proteínas y aumenta su solubilidad.
- **Salting out**, se aumenta la cc de sales, estas compiten con las moléculas de proteínas por el agua, logrando la precipitación de la proteína por deshidratación.
- **Ácidos** (perclórico, metafosfórico) forman sales insolubles con las proteínas cargadas positivamente.



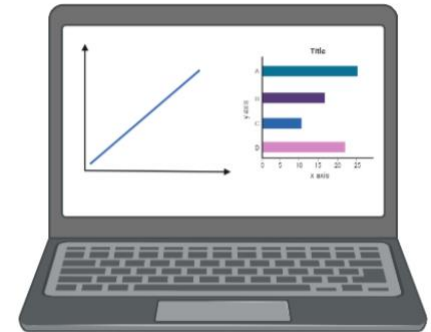
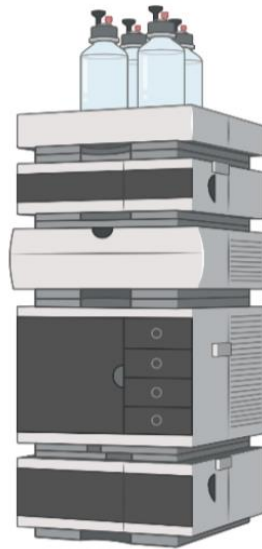
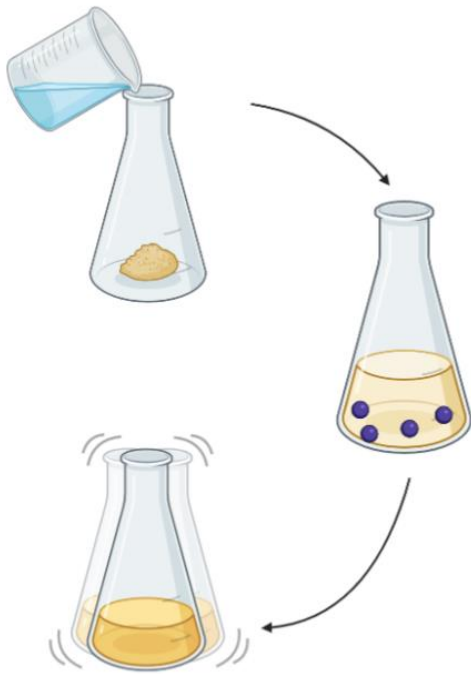
Muestras biológicas

- 1- Homogeneización
- 2- **Desproteínización**
- 3- Preparación de muestra
- 4- Análisis

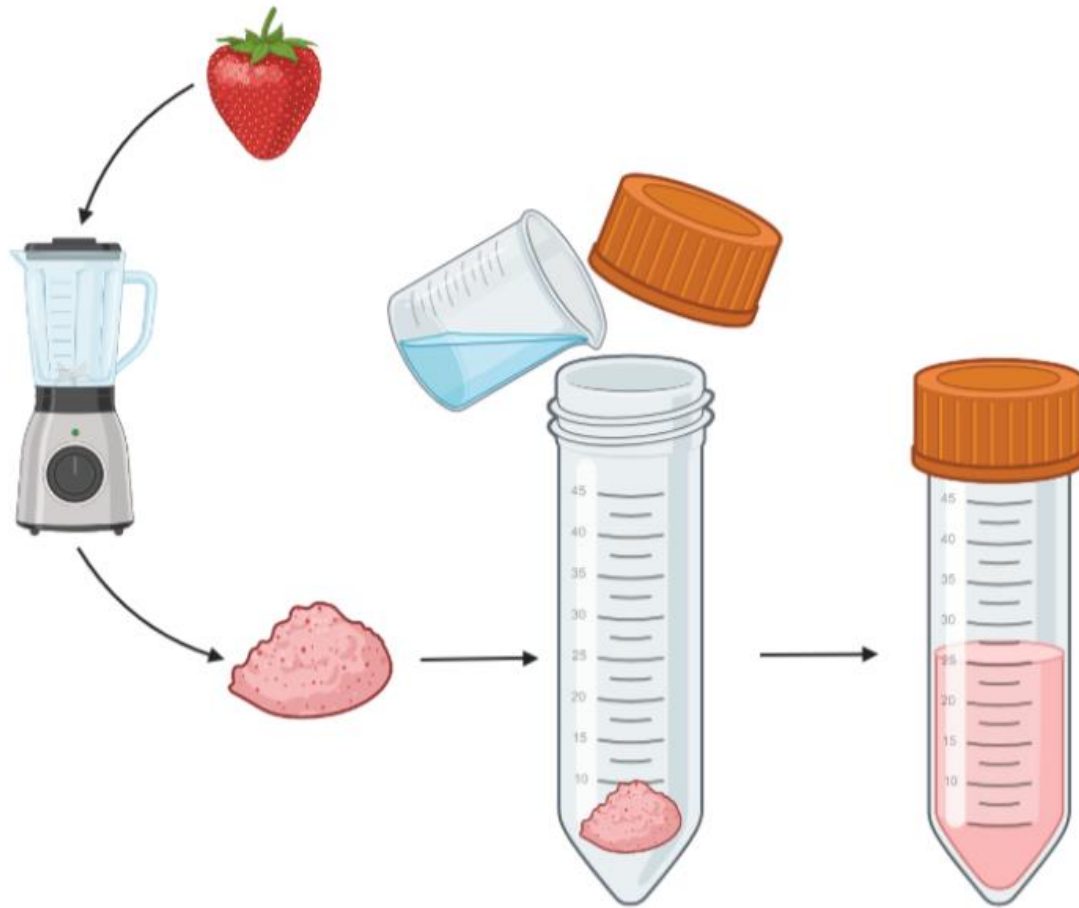
Preparación de muestra

Análisis

Interpretación
de resultados y
reporte



Extracción sólido-líquido



A considerar:

- Las características del solvente
- El n° de extracciones
- Velocidad y tiempo de agitación
- Temperatura



Características de Matriz y analito

Centrifugación-separación de sobrenadante-Análisis

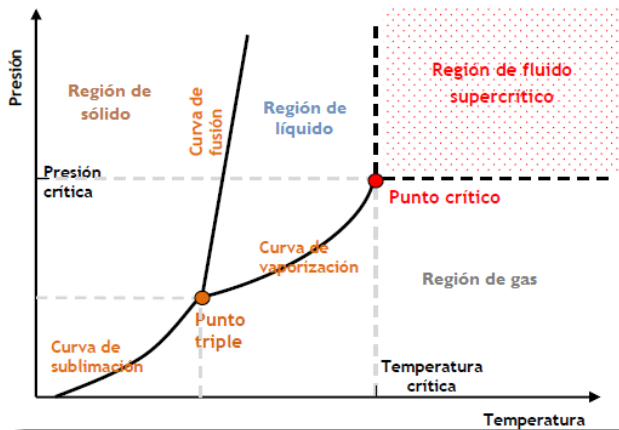
+Agitación: manual, mecánica o ultrasónica
+Temperatura en baño de agua
+ Múltiples agregados de solvente



Extracción sólido-líquido=Extracción por fluidos supercrítico (SFE)

Fluido supercrítico

El punto crítico es la presión y la temperatura a las cuales el gas y el líquido son indistinguibles, por encima de éste los fluidos presentan características de ambas fases.



Propiedades de un fluido supercrítico

- Viscosidad de un gas
- Densidad de un líquido
- Baja tensión superficial

En estos valores críticos se llega a efectos extractivos similares al de los líquidos.

Fluido supercrítico: CO₂



Presión



Densidad



Polaridad



Polar

Presión

Metanol

Acetato de etilo

Hexano

No polar

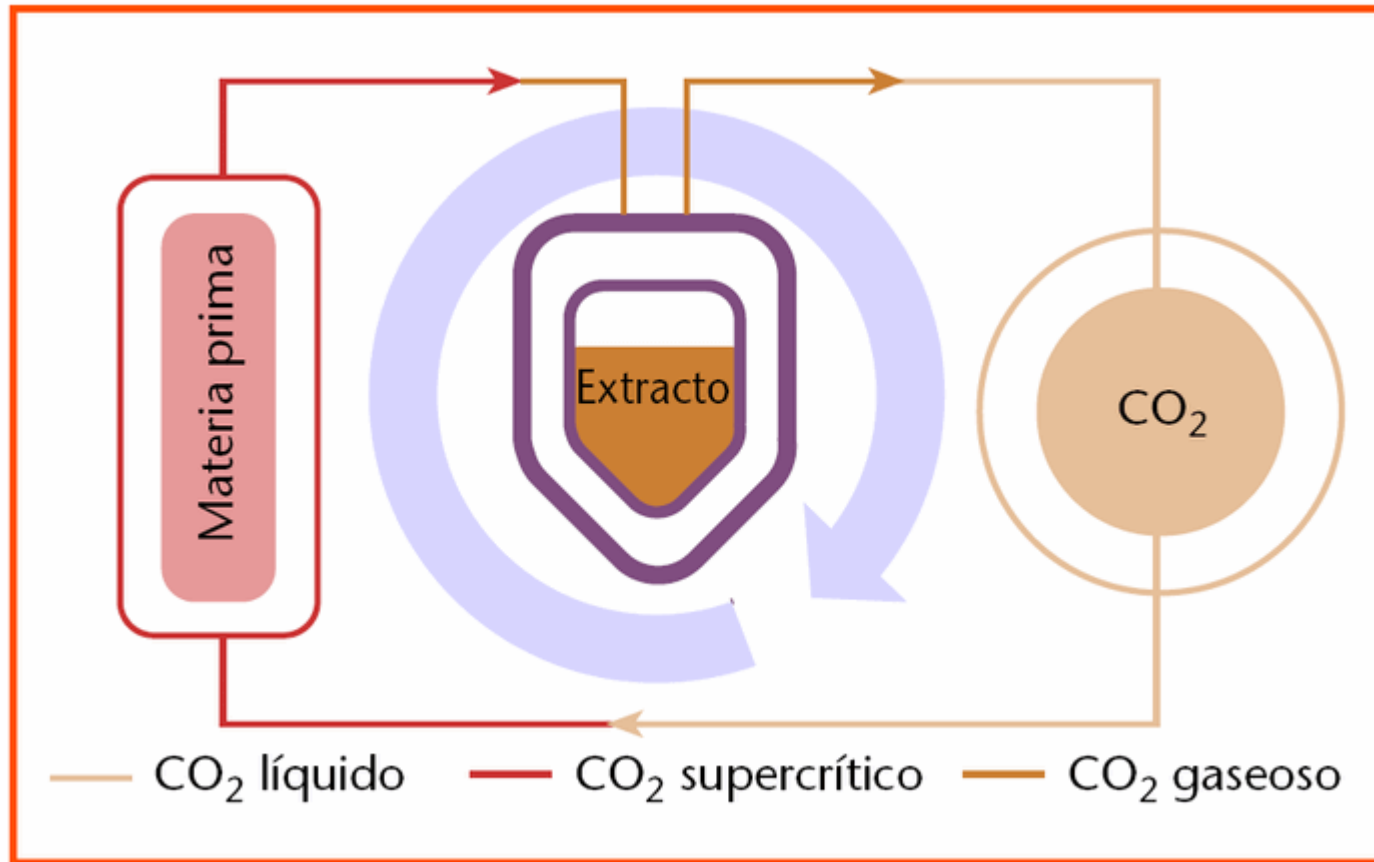
Extracción solido-liquido=Extracción por fluidos supercrítico (SFE)

Solvent	Critical Temperature (°C)	Critical Pressure (BAR)
Carbon Dioxide	31.1	73.8
Chlorotrifluoromethane	28.9	39.2
Propane	96.7	42.5
Cyclohexane	280.3	40.7
Isopropanol	235.2	47.6
Ethanol	243.4	72
Toluene	318.6	41.1
Water	374.2	220.5

Se liberan al aire o pueden permanecer en el extracto final, así que esto es una limitación de algunos debido a su toxicidad.

El CO₂ es uno de los más elegidos debido a su baja temp. critica ,baja toxicidad, no inflamable, se separa fácilmente del producto que se quiere extraer.

Extracción sólido-líquido=Extracción por fluidos supercríticos (SFE)



Extracción solido-liquido=Extracción por fluidos supercrítico (SFE)

Productos	Sustancias extraídas	Algunos de los componentes extraídos actualmente				
Café y Té	Cafeína	Compuesto Extraído	Solvente	Condiciones de Extracción		
	Teína			Presión MPa	T °C	Flujo
Germen	Humolina y lupolina	Extracto de romero (antioxidantes)	CO2	10 - 16	37 - 47	-
	Aceites esenciales	Carotenoides de paprika	CO2	> 50	100	25Kg/h
Zumos de frutas	Despectinación	Extracto de orégano (antioxidantes)	CO2 / 4% etanol	25	40	-
	Aromas	Vitamina E de germen de trigo	CO2	34,5	43	1,7mL/min
Bebidas alcohólicas	Etanol	Esteroles y tocoferoles del aceite de oliva	CO2	20	40	2L/h
	Aromas	Flavonoides del jugo de naranja	CO2	16	40	2400 mL/h
	Sabores					
Cárnicos	Colesterol					
	Lípidos					
	Ácidos grasos volátiles					
	Antioxidantes					
Vegetales y Frutas	Fosfolípidos					
	Ácidos grasos					
	Aceites de semillas					
	Antocianinas					
	Aceites esenciales					
	Terpenos, Oleorresinas					
	Caroteno, Bixina, Licopeno					

Muchas de las sustancias extraídas son usadas para enriquecer otros alimentos. Esto se debe a que los extractos obtenidos no contienen residuos ni contaminantes.

Extracción liquido-liquido

Es la distribución de un analito entre dos líquidos inmiscibles (orgánico – acuoso)

Analitos neutros → extracción directa

Analitos ionizables → modificando pH del medio

- Analitos ácidos → acidificando el medio
- Analitos básicos → alcalinizando el medio



A considerar
+ Agitación
+ Temperatura
+ Múltiples agregados de solvente
+ Combinación de solventes



Centrifugación-separación de
sobrenadante-Análisis

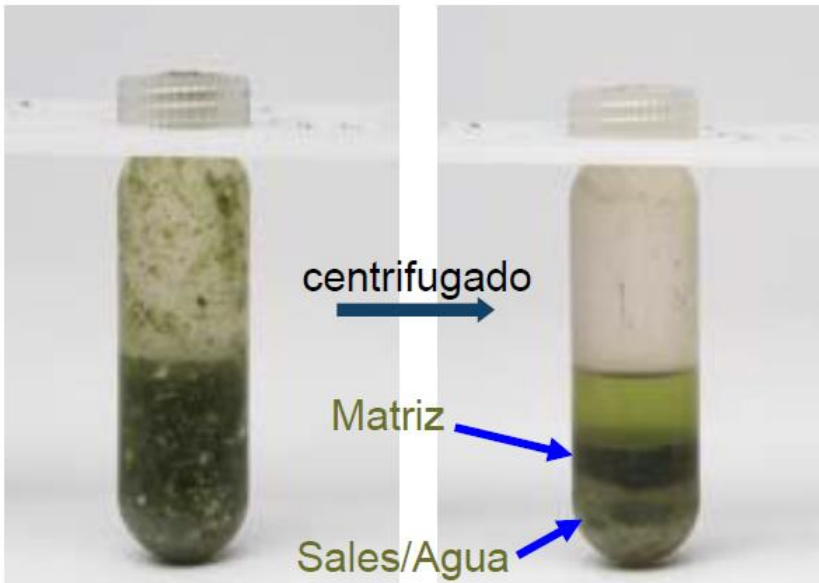
Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe



1-etapa de extracción.
2-etapa de clean-up.

Salas y adsorbentes
deben interaccionar
solo con
componentes de la
matriz

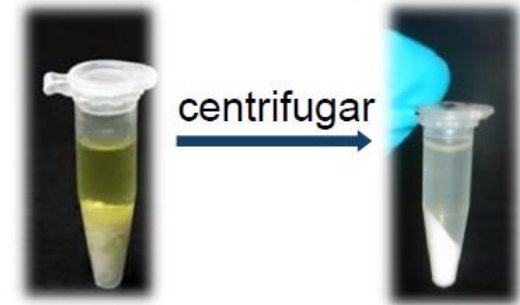
1) Extracción



Sobrenadante:
contiene los
analitos de
interés



2) Agente Dispersivo



1-Etapa de extracción

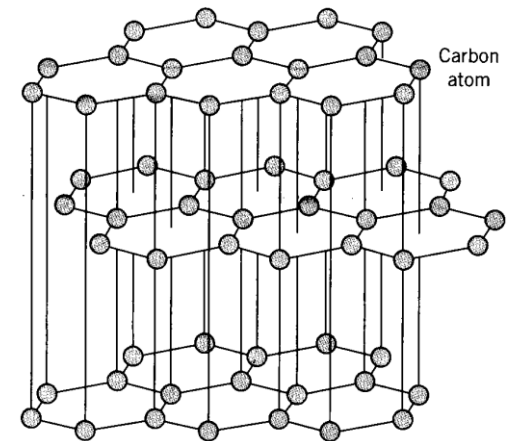
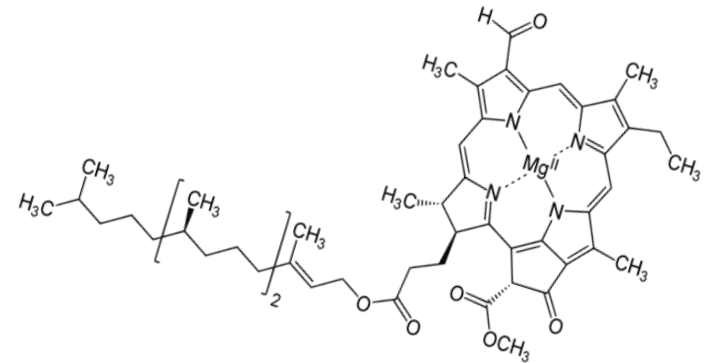
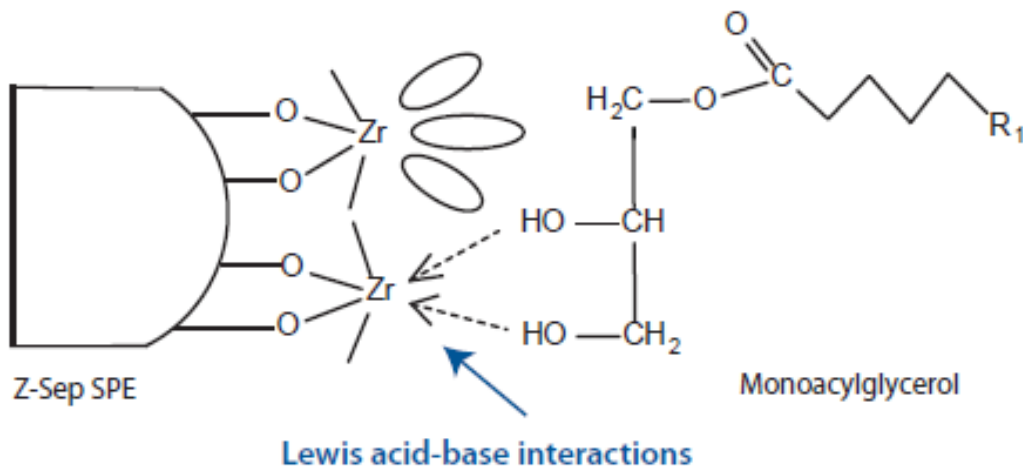
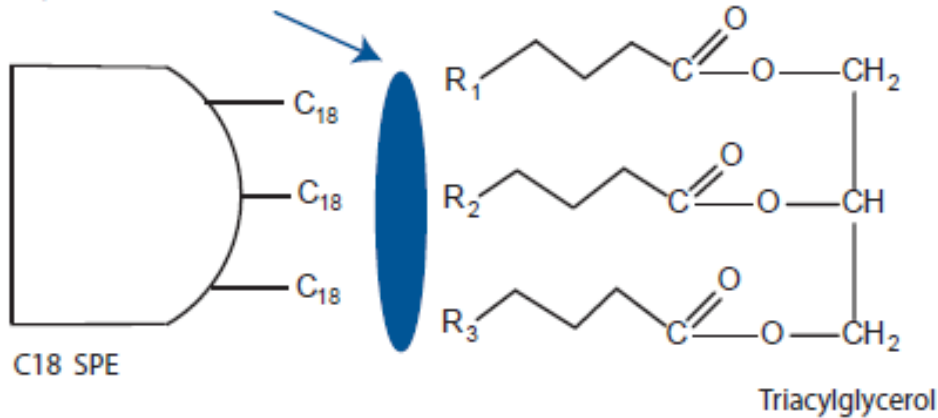
- Acetonitrilo: es un buen solvente para la extracción, en lugar de acetona o acetato de etilo, debido a que presenta una mayor capacidad y selectividad para extraer pesticidas en un amplio rango de polaridades.
- Sales: MgSO_4 provee una separación de fases completa (organica-acuosa), posee buena capacidad de adsorción de agua. NaCl en conjunto con MgSO_4 favorece la separación de las fases.

2-Etapa de clean-up

- Sales: MgSO_4 para proporcionar una limpieza adicional eliminando el agua residual y otros compuestos mediante quelación.
- Adsorbentes:
 1. Amina secundaria primaria (primary secondary amine, PSA), eficaz para retener los ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares y pigmentos presentes en los alimentos.
 2. Carbon grafitizado (GCB), elimina eficazmente los pigmentos (por ejemplo, clorofila y carotenoides), pero muestra una gran afinidad por las moléculas planas (incluidos algunos pesticidas)
 3. Octadecilsilano (C_{18}), elimina los compuestos lipofílicos (muestras de origen animal).

Figure 1. Retention Mechanism for Fats on Supel QuE Z-Sep Sorbents

Hydrophobic Interactions



Carbón grafitizado

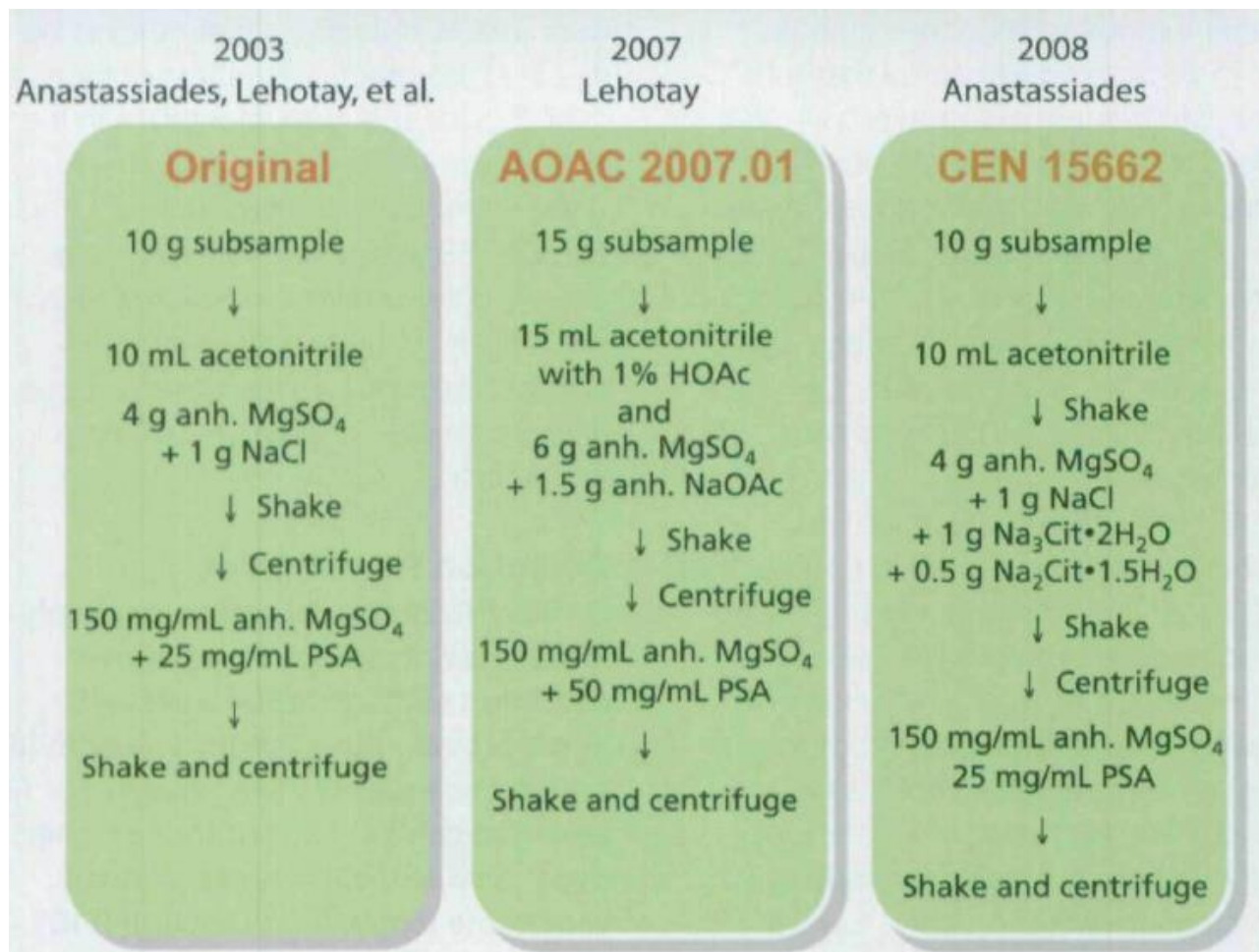
Clean-up de diferentes muestras

Tipo de matriz	Ejemplos	Requisitos de sorbente para la limpieza
Matrices generales	• Manzana • Pepino • Melón	MgSO₄, PSA Eliminación del exceso de agua Ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares
Matrices Grasas	• Leche • Cereales • Pescado	MgSO₄, PSA, C18 Eliminación adicional de lípidos y esteroides
Matrices pigmentadas	• Lechuga • Zanahoria • Vino	MgSO₄, PSA, C18, GCB Eliminación adicional de pigmentos y esteroides
Matrices pigmentadas altas	• Espinaca • Pimientos rojos	MgSO₄, PSA, C18, GCB, Chlorofiltr™ Eliminación adicional de clorofila

Métodos oficiales para análisis de múltiples pesticidas en alimentos (frutas y verduras) – **en continua expansión hacia nuevas matrices y analitos**

AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) International Official method 2007.01

EN method EN 15662



SPE

Extracción en fase solida (Solid Phase Extraction)



Basada en interacciones con sorbentes

Ventajas

- Alta eficiencia en separaciones de analitos e impurezas
- Útil para enriquecimiento de trazas (analitos en bajas cc)
- Fácilmente automatizada
- Gran variedad de fases disponibles

Desventajas

- Adsorción irreversible de algunos analitos
- Desarrollo de métodos complejo

SPE

Extracción en fase solida (Solid Phase Extraction)



Las columnas o cartuchos de polipropileno están rellenos con materiales similares a los de las columnas de HPLC.

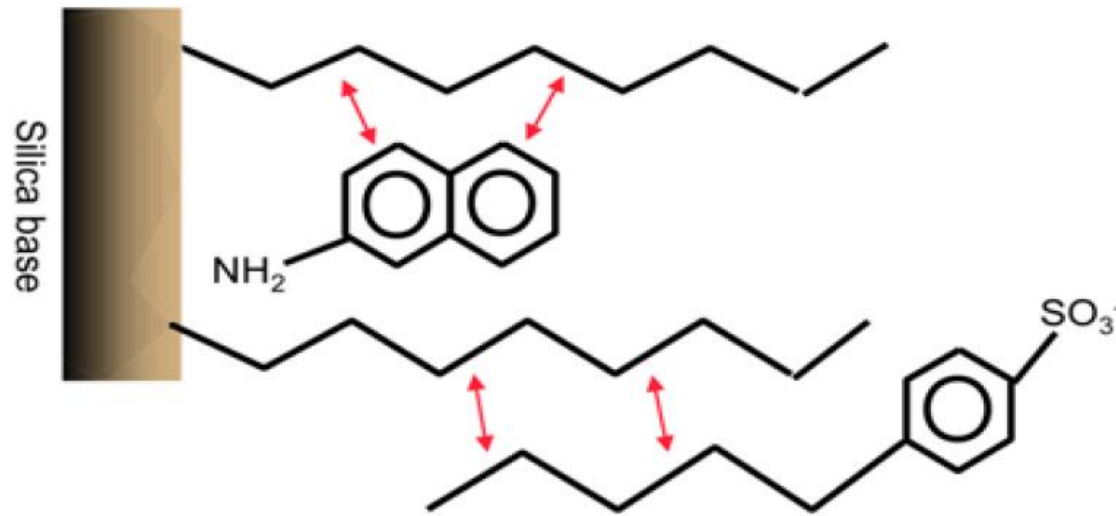
- Adsorbentes muy polares: silica
- Adsorbentes poco polares: silica unida a grupos C18
- Materiales de intercambio iónico.

SPE

TIPO DE RELLENO		CARACTERISTICAS
Diamino *	$-(CH_2)_3NHCH_2CH_2NH_2$	Intercambiador aniónico débil
Amonio cuaternario *	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3Cl^-$	Intercambiador aniónico fuerte
Acido carboxílico *	$-(CH_2)_3COOH$	Intercambiador catiónico débil
Acido sulfónico *	$-C_6H_4-SO_2OH$	Intercambiador catiónico fuerte
Alúmina		Sorbente polar
Florisil	Silicato de Magnesio activado	Sorbente polar
Silicagel		Sorbente polar
Tierra de diatomea		Sorbente polar
Ciano *	$-(CH_2)_3CN$	Sorbente de polaridad media
Amino *	$-(CH_2)_3NH_2$	Sorbente de polaridad media
Fenilo *	$-C_6H_5$	Sorbente no polar
Octilo *	$-C_8H_{17}$	Sorbente no polar

Tabla 9.III Materiales de relleno de los cartuchos de extracción en fase sólida, los indicados con * representan fases ligadas

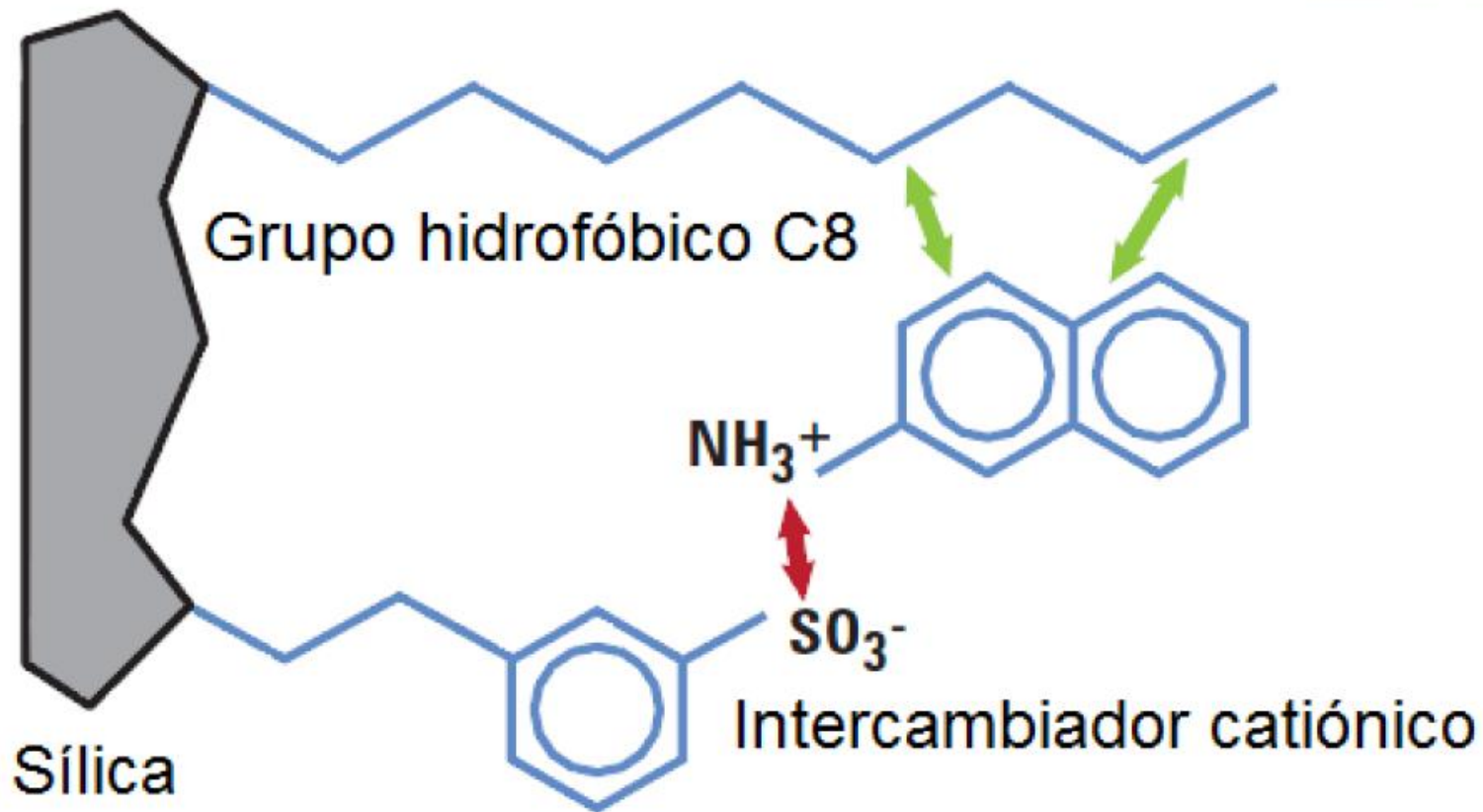
Fases hidrofóbicas



Fase reversa/no polar
Interacción con grupos funcionales C8

↔ Fuerzas de Van der Waals

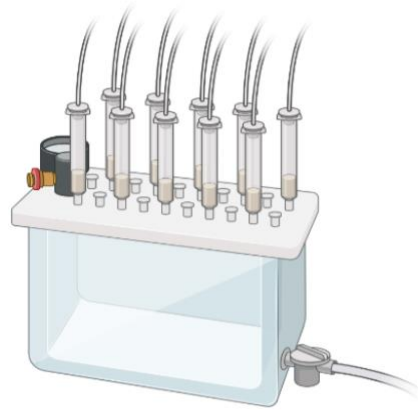
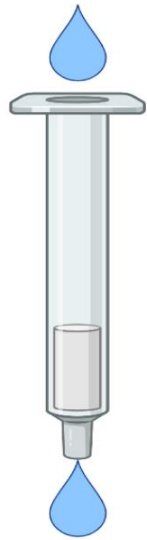
Modo mixto



↔ Fuerzas de Van der Waals

↔ Atracción electrostatica

Manifold

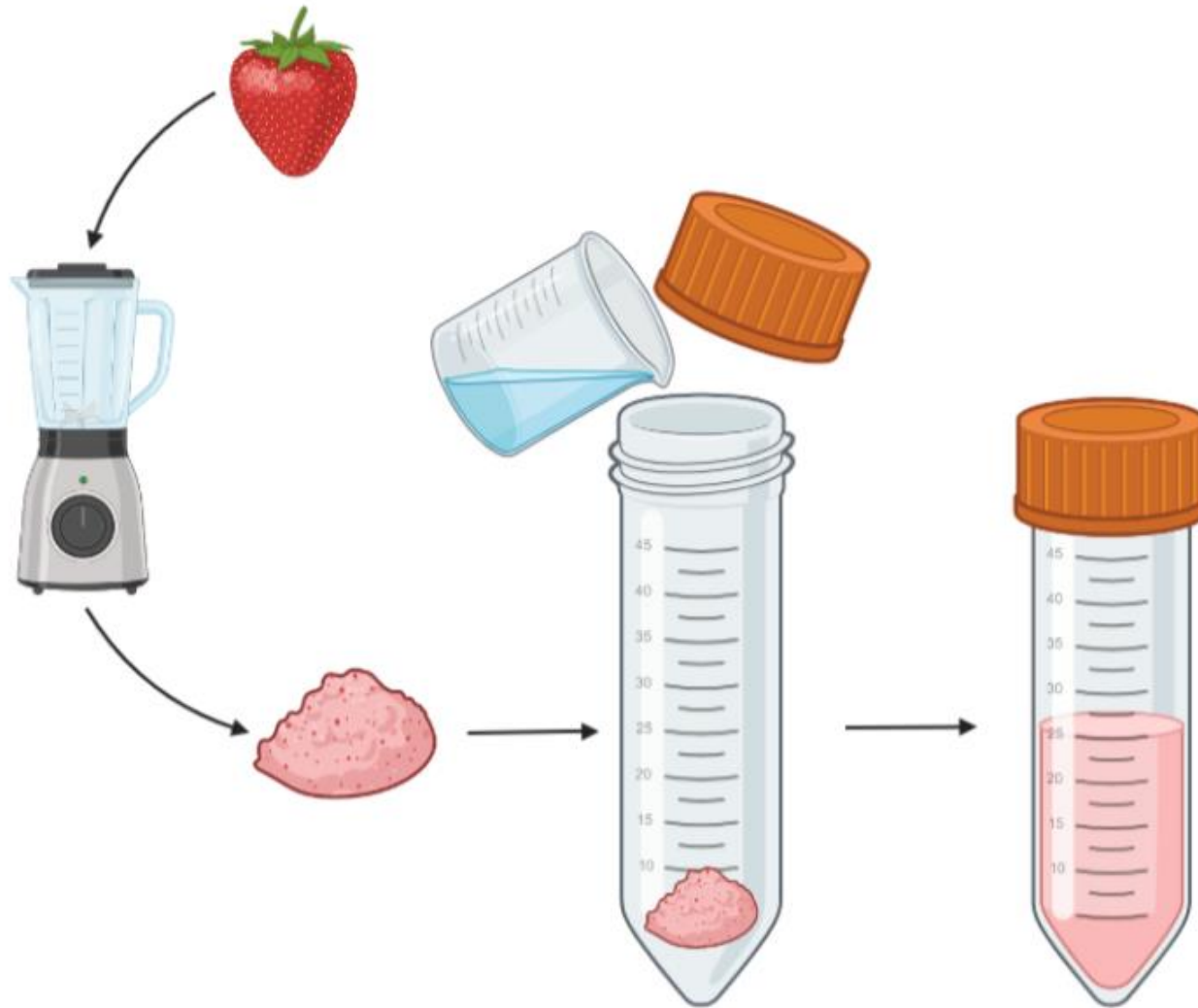


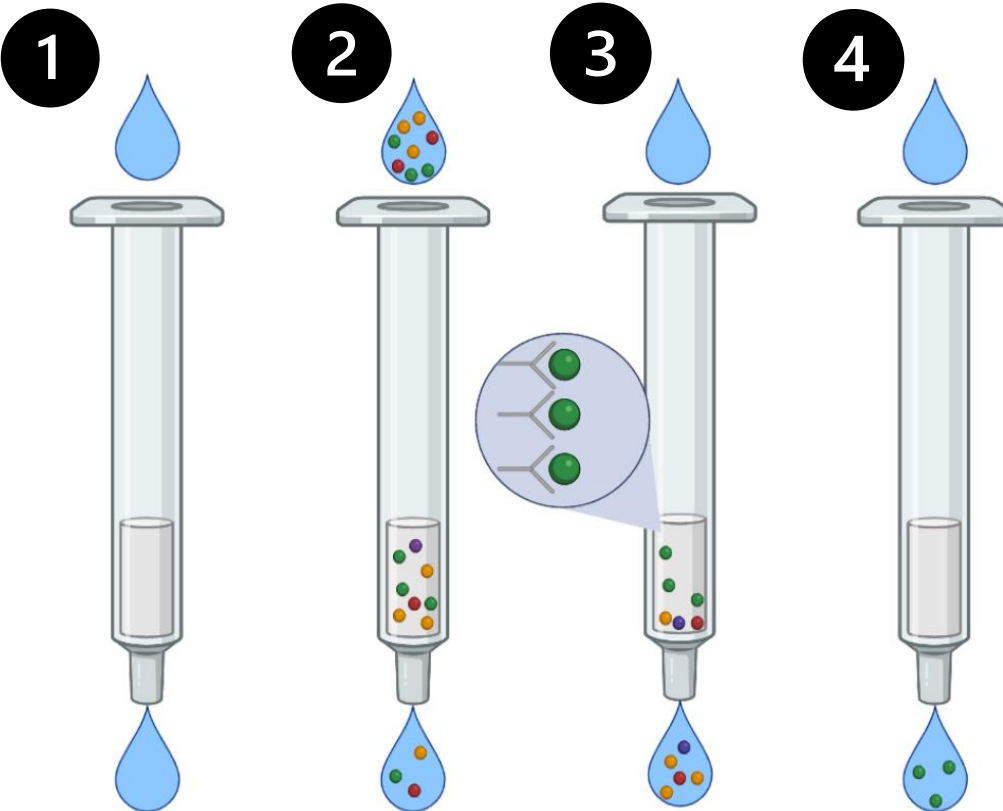
Presión negativa



Presión positiva

SPE - procedimiento



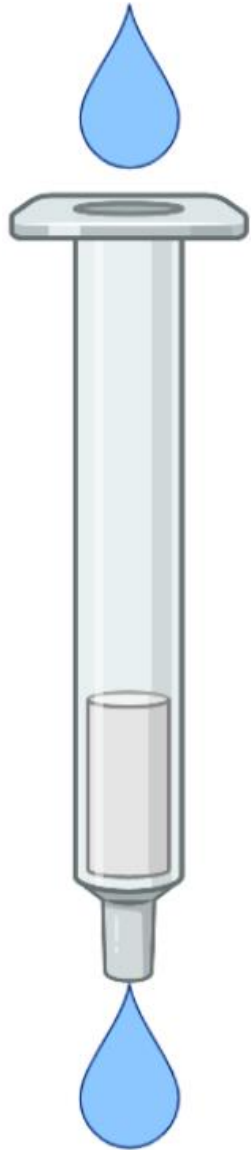


Metodología de extracción

La selección de las condiciones óptimas para la extracción dependen de la naturaleza del analito y de la matriz.

Pasos:

- 1- Lavado y activación de la columna.
- 2- Aplicación de la muestra.
- 3- Lavado de la columna.
- 4- Elución del analito.



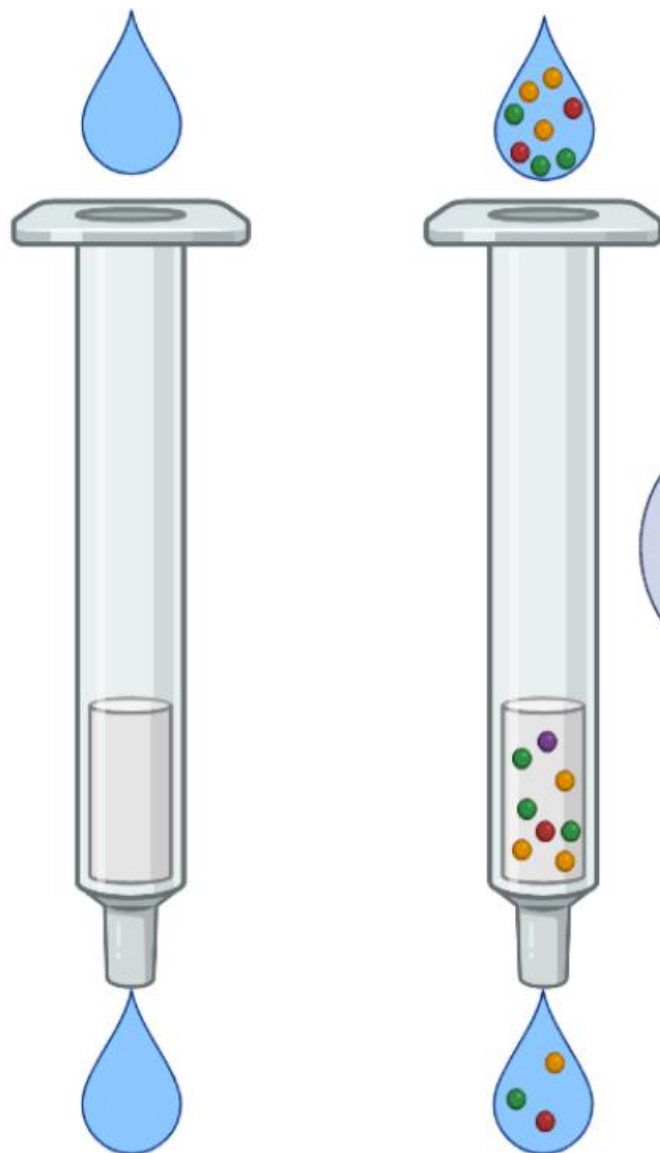
1- Lavado y activación de la columna.

El objetivo es solvatar los grupos funcionales de la columna. Los analitos no pueden interactuar con el relleno si los grupos no se encuentran “activados”. Por ej, las cadenas de fase reversa (C18 o C8) deben “estirarse” para lograr la interacción.

En fase reversa se suele utilizar: 2 volúmenes de columna de un solvente orgánico + 2 volúmenes de agua o buffer acuoso.

Lavado: Elimina sustancias provenientes de muestras anteriores. Se hace fluir metanol u otro solvente menos polar como ACN.

Activación: Equilibra la columna. Se hace fluir un solvente igual o similar al empleado como medio de disolución de las muestras.

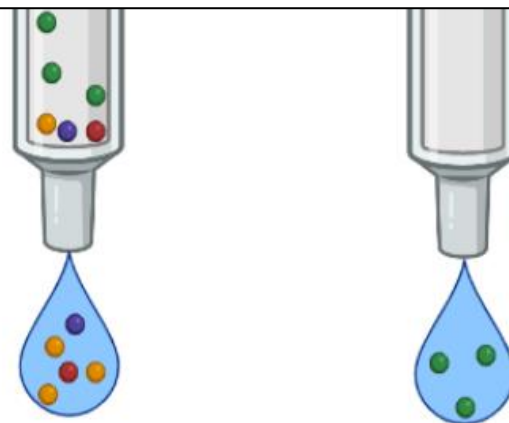


2- Aplicación de la muestra.

La muestra se aplica en la columna a un flujo determinado (1 a 5 mL/min).

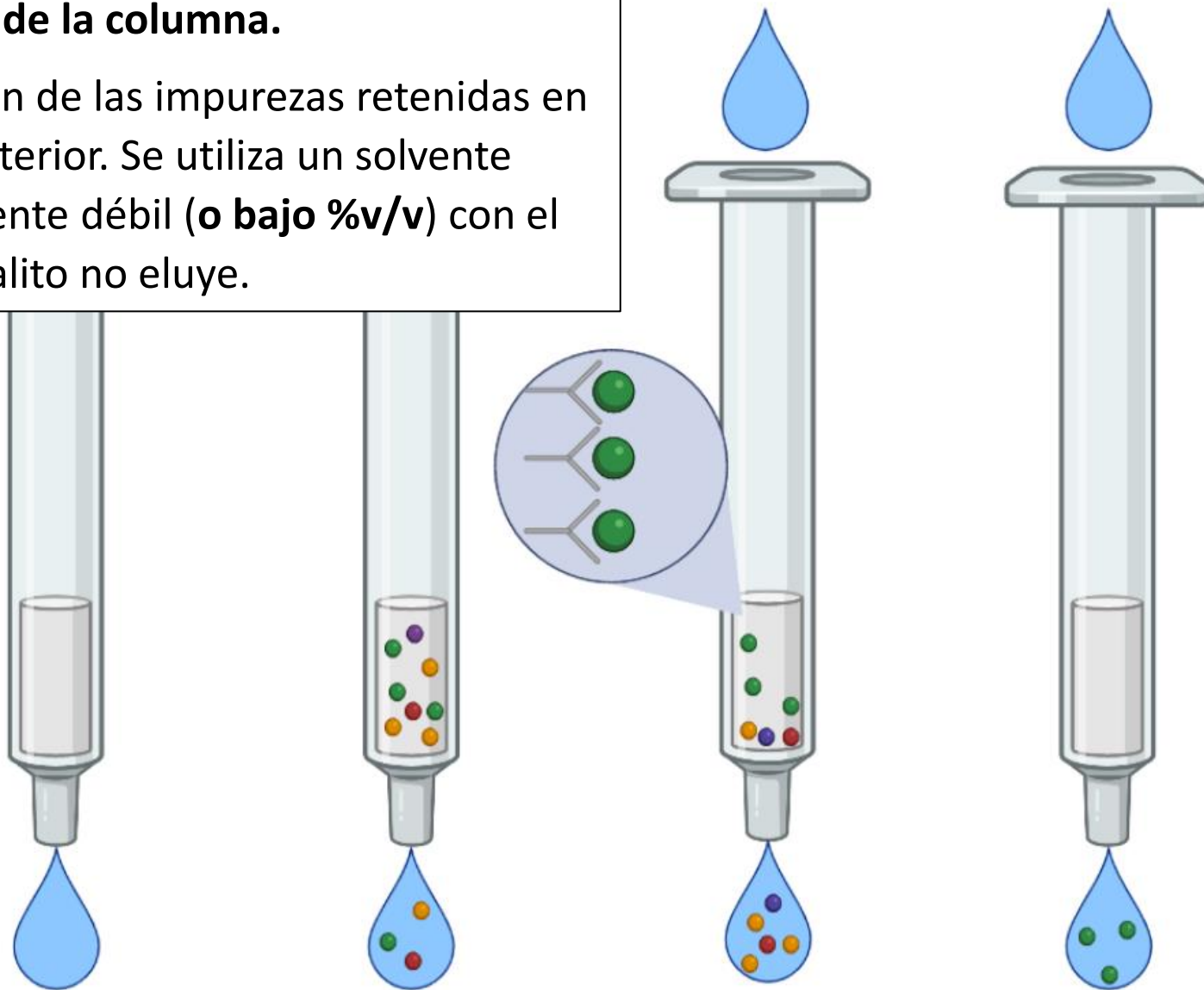
Si las muestras poseen una alta proporción de sólidos suspendidos puede taponar la columna. Por lo que se recomienda filtrar las muestras que son muy turbias o con materia en suspensión.

Se retiene fuertemente el analito y también algunas impurezas.



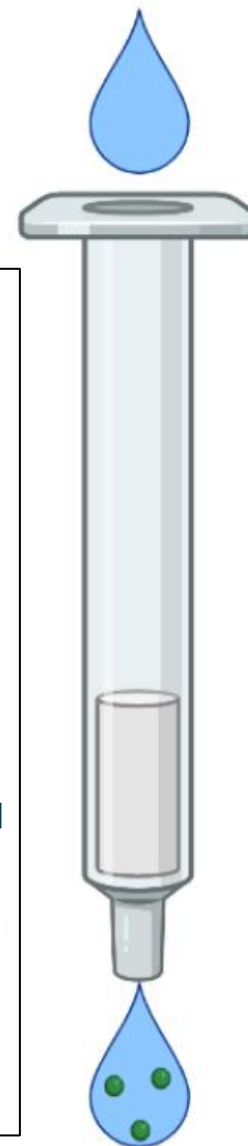
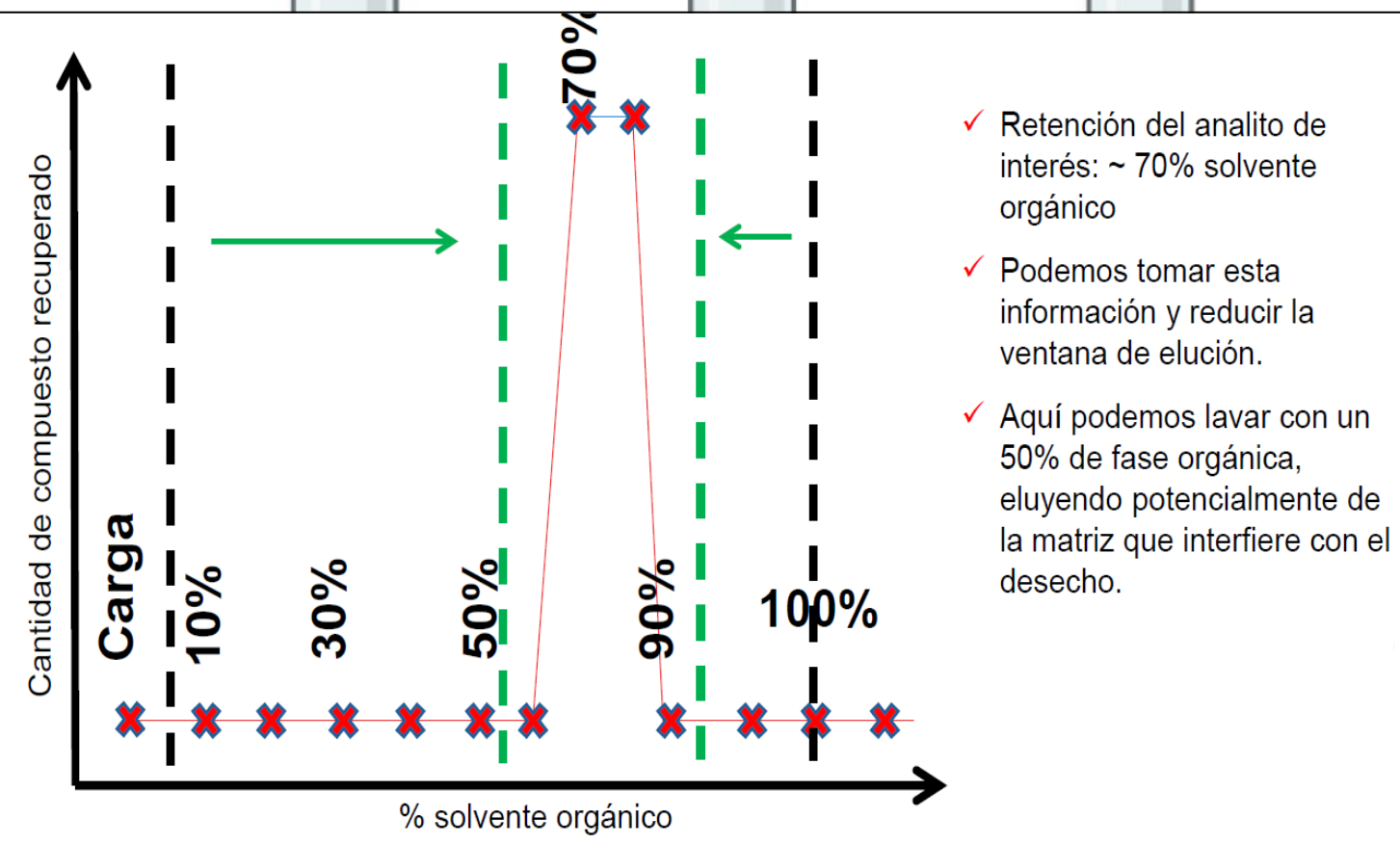
3- Lavado de la columna.

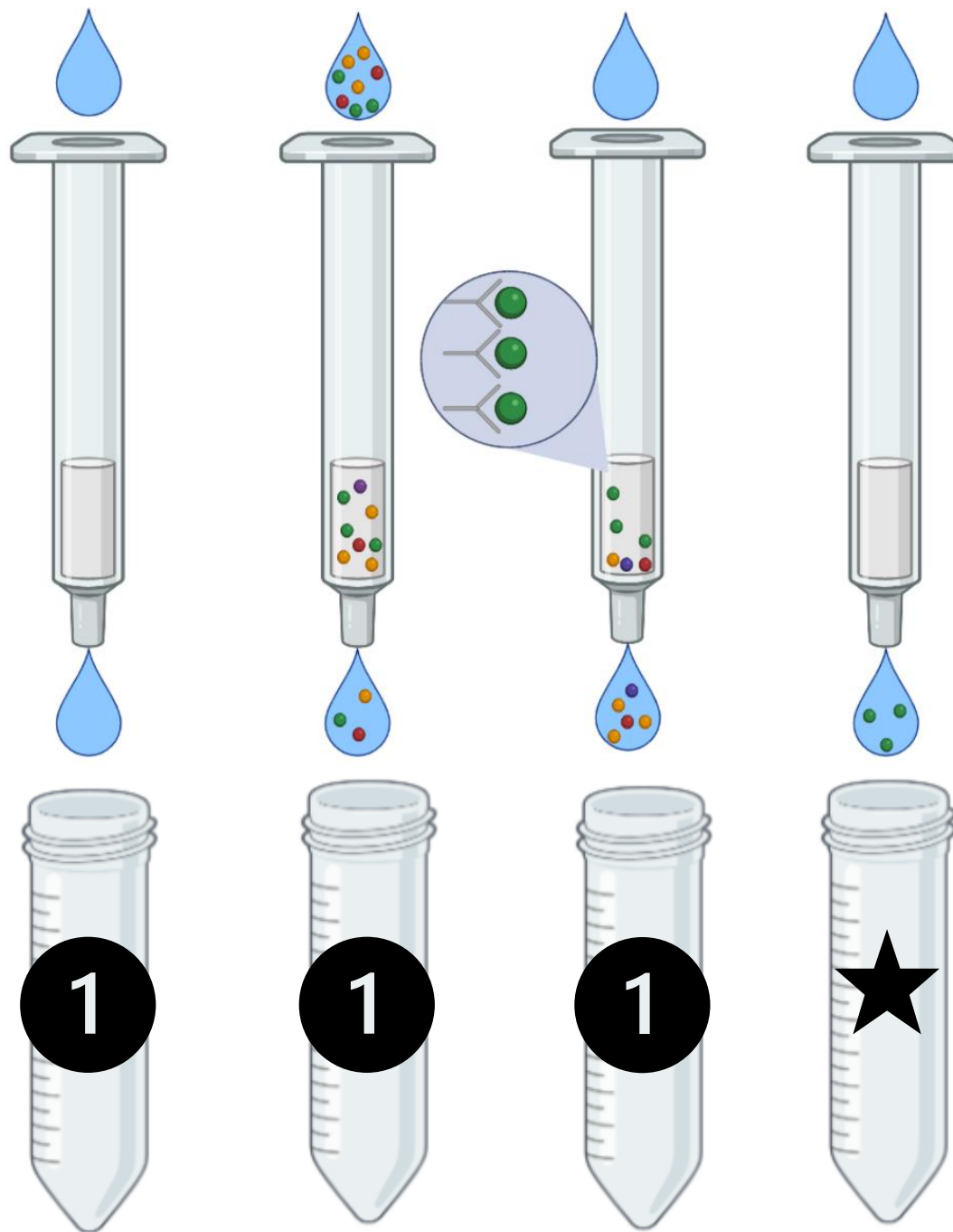
Eliminación de las impurezas retenidas en el paso anterior. Se utiliza un solvente relativamente débil (**o bajo %v/v**) con el cual el analito no eluye.



4- Elución del analito.

Se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada para liberar al analito.





SPE

MATERIAL DE RELLENO	TIPOS DE ANALITOS	NATURALEZA DE LA MATRIZ	ACTIVACION DE LA COLUMNA	SOLVENTE DE ELUCION
C18/C8	Sustancias no polares Sustancias ionizables, en su forma no ionizada	Acuosa	Metanol Agua	MeOH/AcN o mezclas de éstos con agua o buffers de pH adecuado
Sílice Diol CN	Sustancias polares	Solución en solventes no polares Aceites	Cloroformo Hexano	Solventes polares IPA, MeOH
Aniónico	Aniones Carboxilatos/Sulfonatos	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffers de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con MeOH o AcN
Catiónico	Cationes Aminas	Soluciones acuosas de baja I	Metanol Buffer	Buffers de alta de pH adecuado sólo o en mezclas con MeOH o AcN

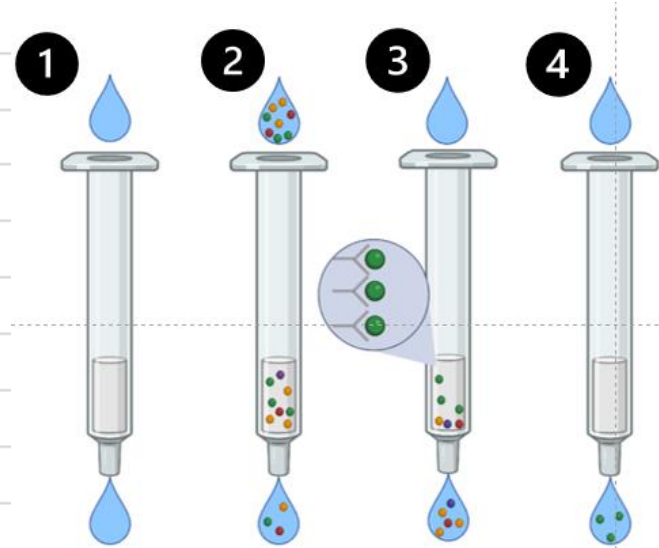
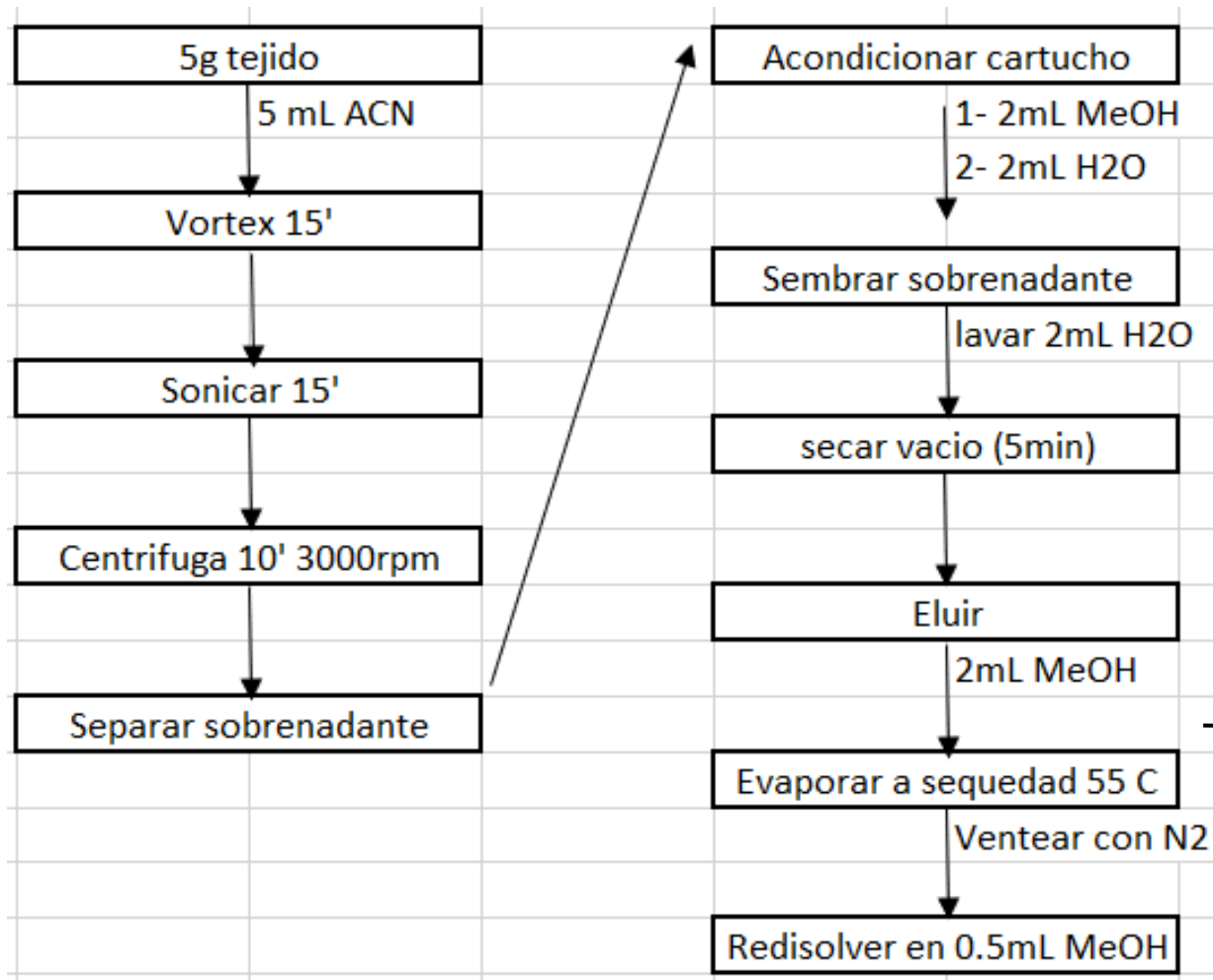
MeOH: metanol
ACN: acetonitrilo
IPA: isopropanol

Tabla 9.IV Sorbentes más comunes y sistemas de preparación

Modelos de cartucho SPE

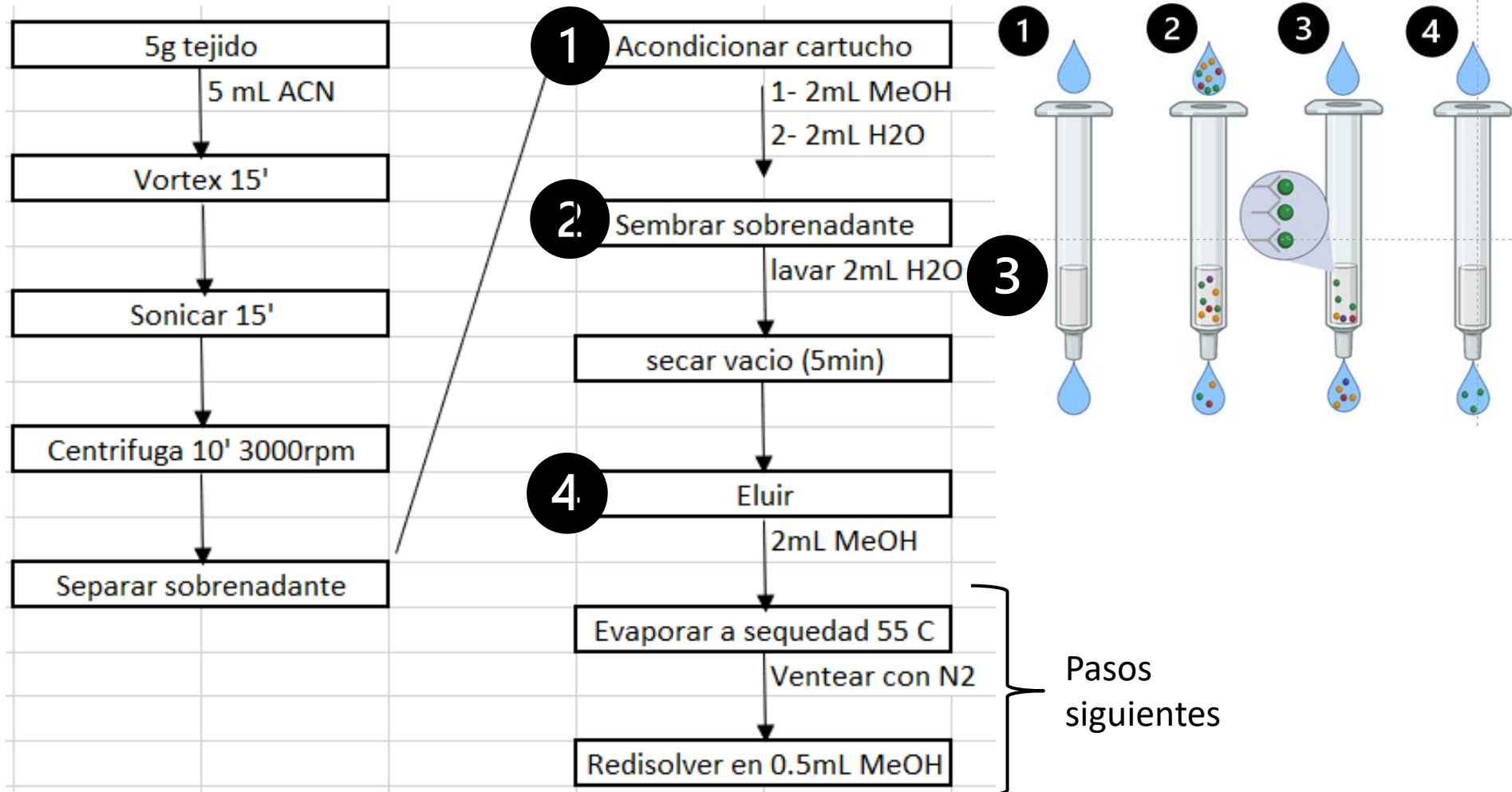
	HRP	SCX	SAX
Equilibrar	Metanol	Metanol	Metanol
Acondicionar	Agua	Agua	Agua
Carga de muestra	Muestra diluida	Muestra diluida	Muestra diluida
Lavar	n% Metanol	2% Acido Fórmico	5% Amoníaco
Lavar	-	Metanol	Metanol
Eluir	n% Metanol	5% Amoníaco en Metanol	2% Acido Fórmico en Metanol
	Extracto Final	Diluir o llevar a seco y reconstituir	

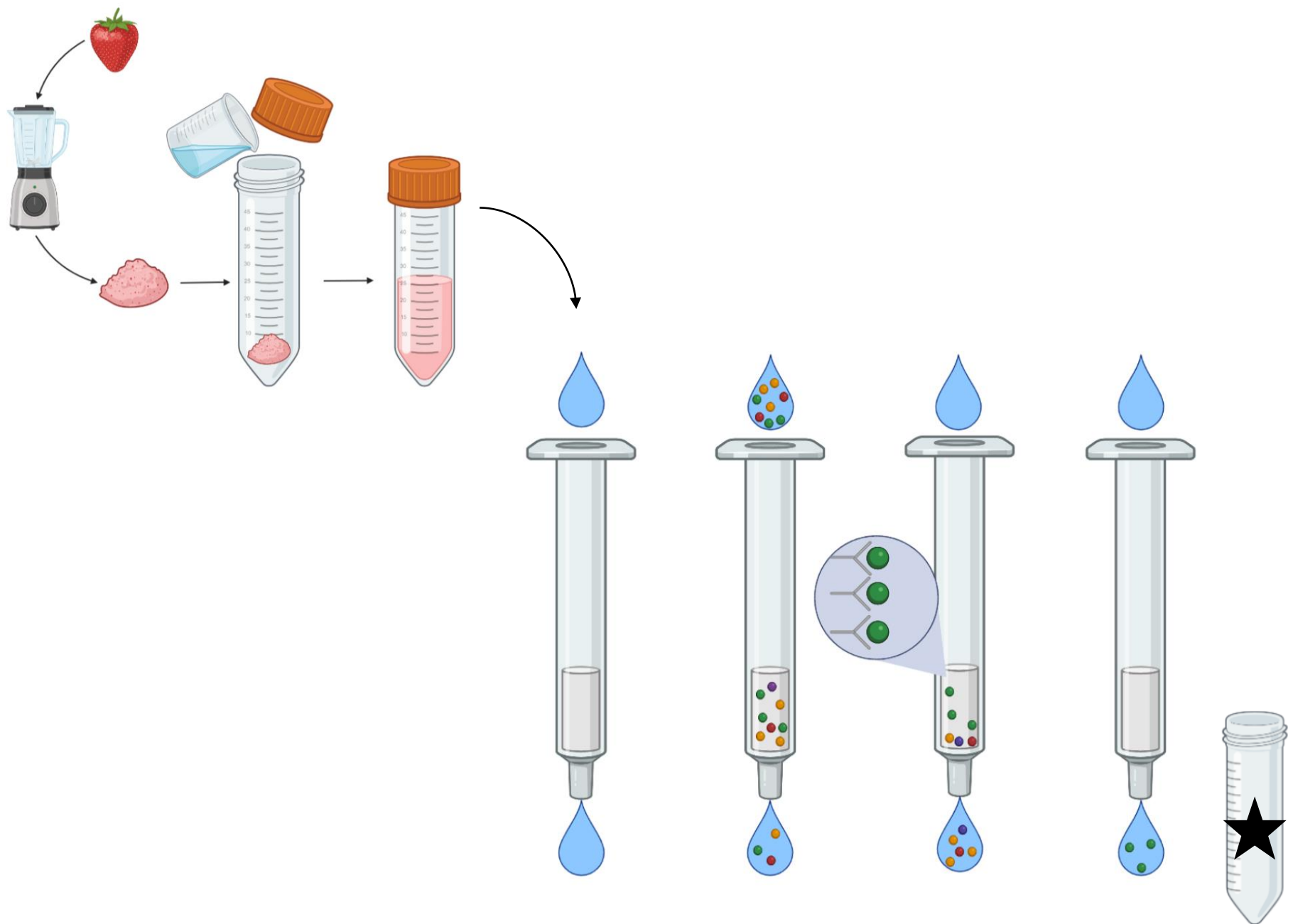
ej de método SPE



Pasos siguientes

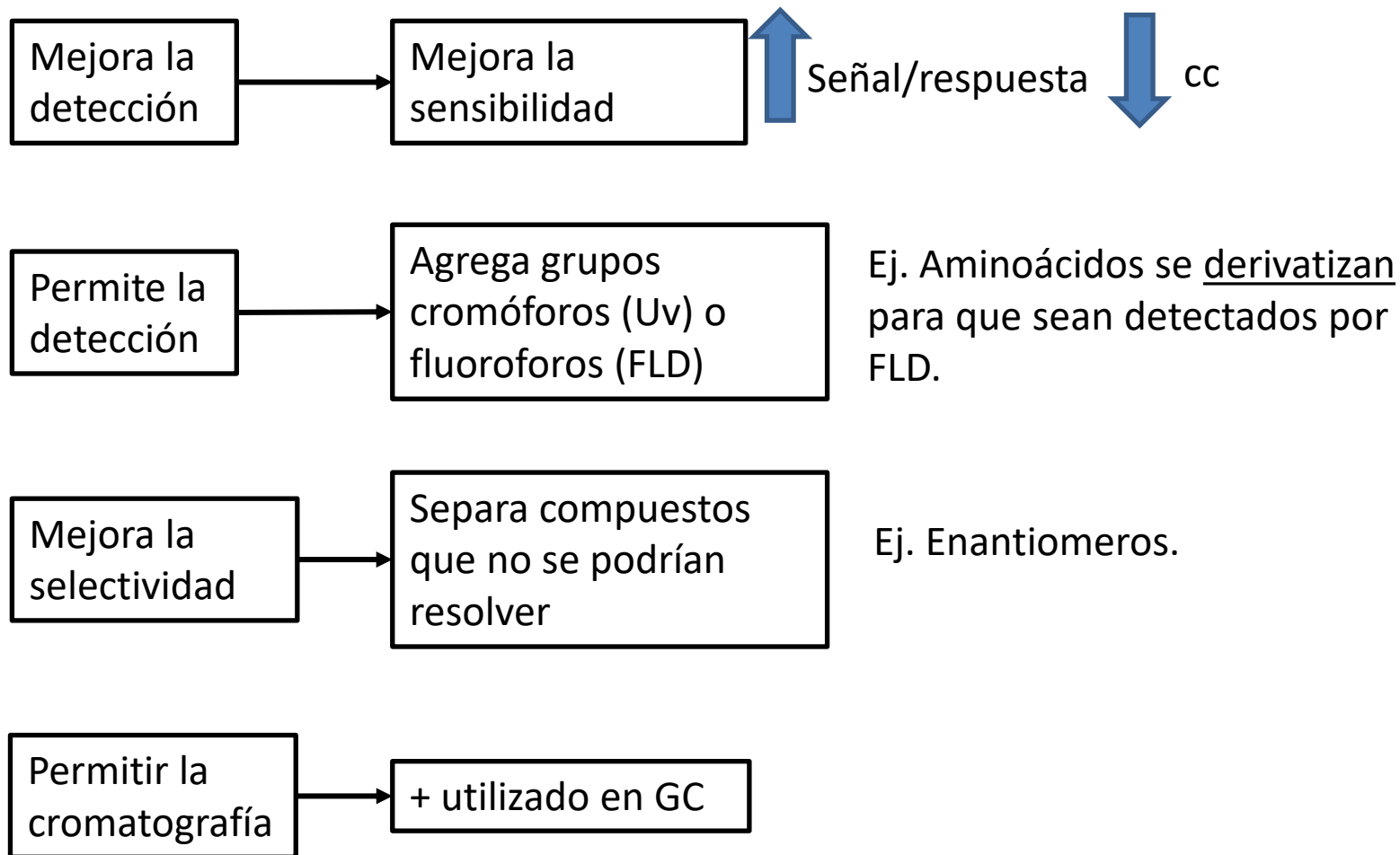
ej de método SPE



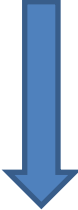


Derivatización

Objetivos

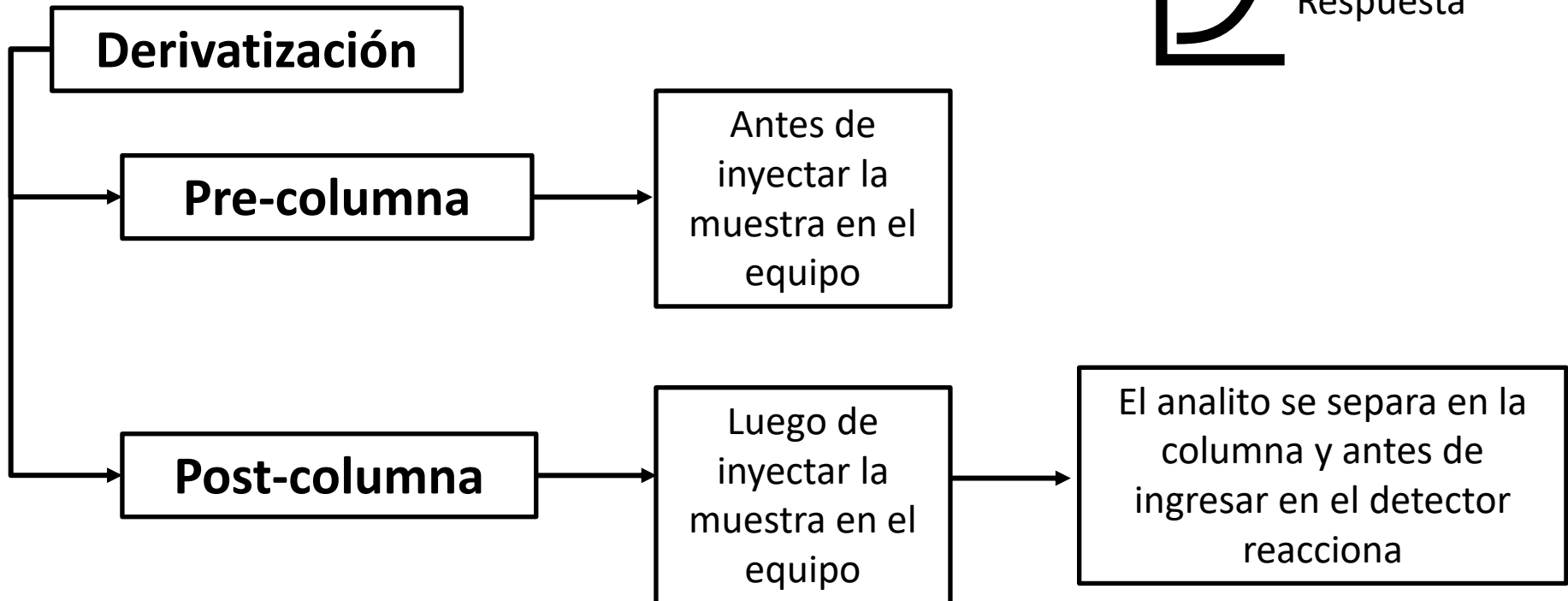
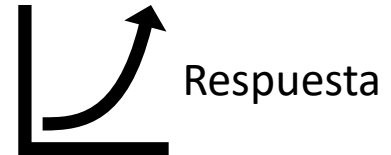


Derivatización

- 
- Respuesta baja o nula a nuestro detector
 - Concentración de analito en la muestra

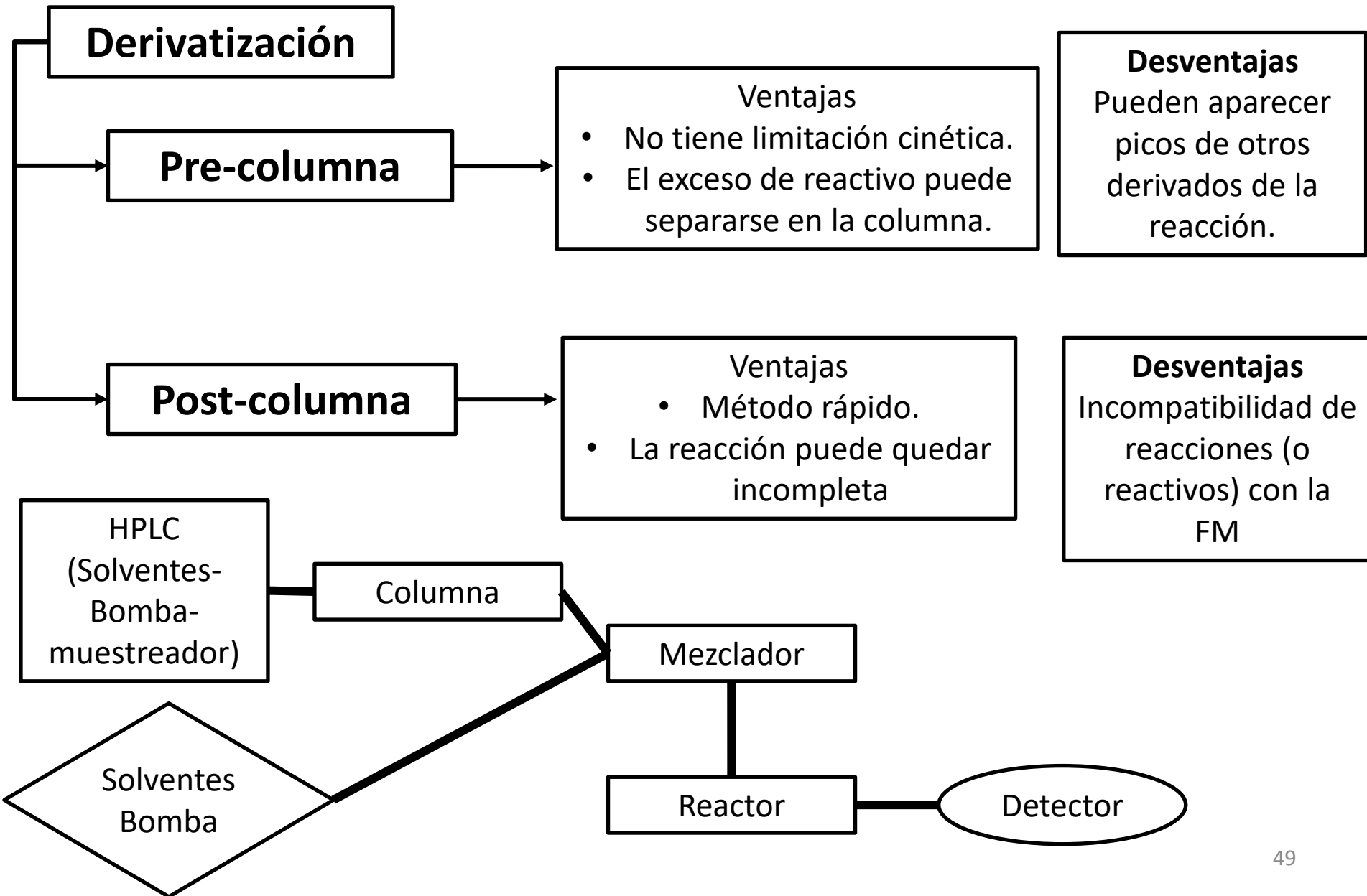


Derivatización

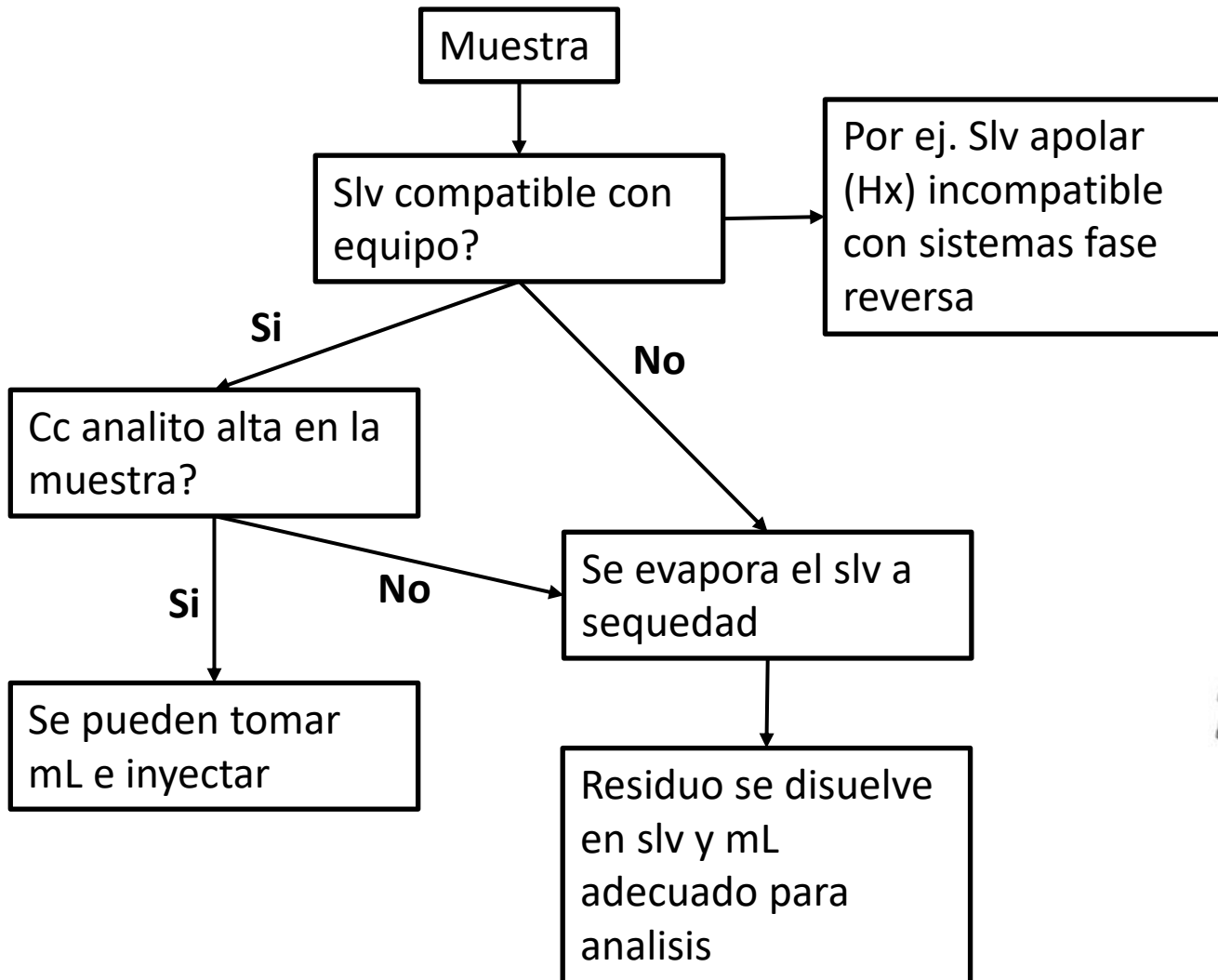


La elección de cada método depende de la velocidad de reacción y la compatibilidad de la reacción (y reactivos) con la fase móvil.

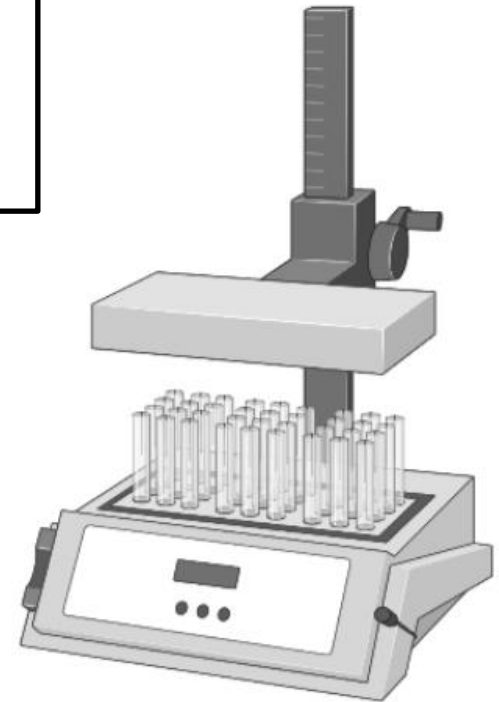
Derivatización



Concentración de muestra

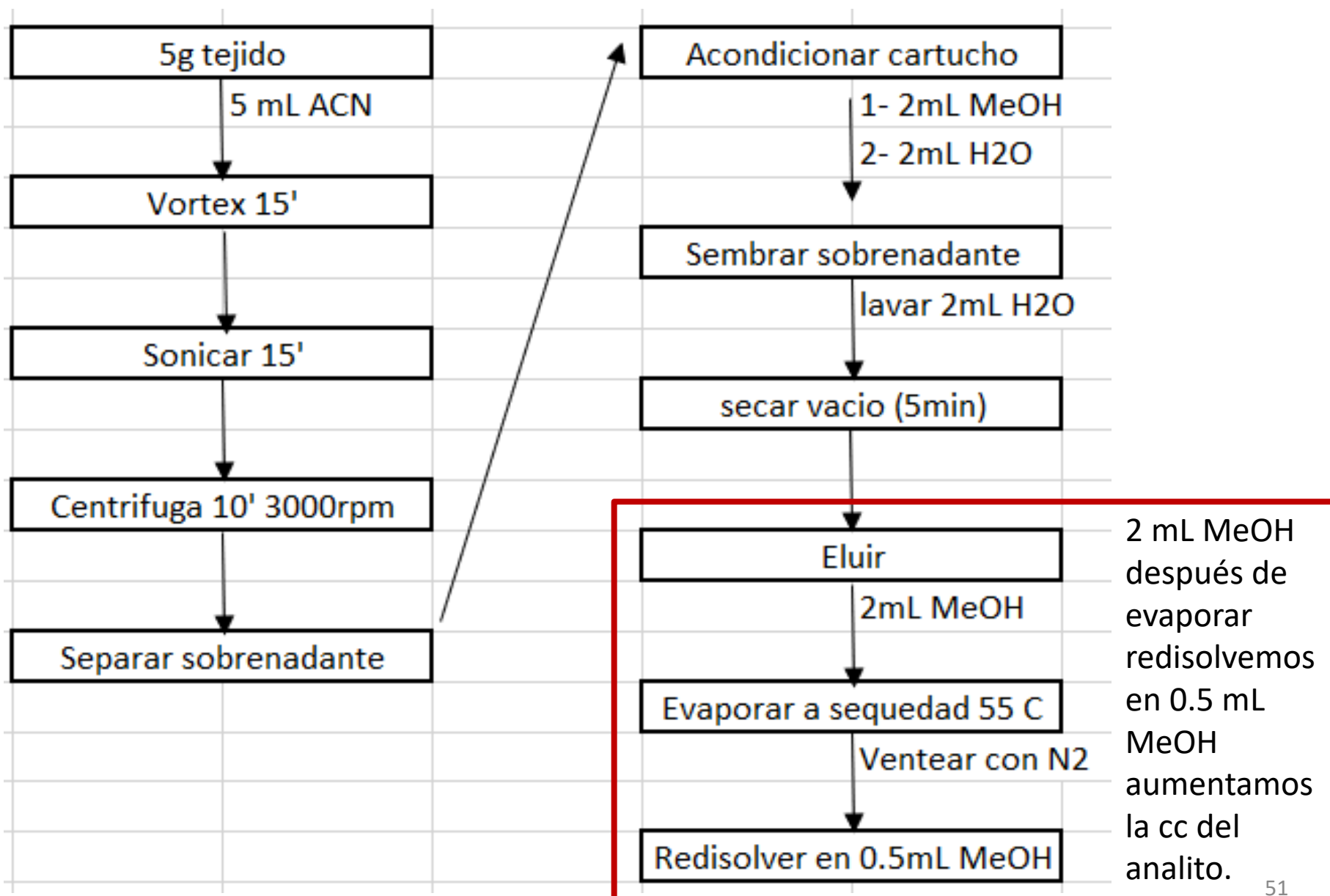


Nitrógeno o aire



El analito tiene que ser estable térmicamente y no debe volatilizarse junto con el solvente, generalmente este paso se realiza luego de secar la muestra con un desecante como MgSO_4 anhidro, ya que si tenemos agua será muy difícil eliminarla sin descomponer el analito.

Retomando el ej de método SPE



Filtración – Filtros de jeringa

Se realiza después de la preparación de muestra y antes del análisis en el equipo



- Técnica rápida y económica de remover particuladas e interferencias.
- Hay una amplia variedad de materiales de membrana
- Protege elementos vitales del instrumento. Ej Columna Analítica.

La compatibilidad química entre la membrana de filtración y la muestra es clave

A tener en cuenta:

- Resistencia de la membrana al solvente
- Unión del analito a la membrana
- Tamaño y cantidad del particulado de la muestra
- Tipo de interferencias a separar
- Requerimientos especiales. (ejemplo: pre filtrado)
- Porosidad del filtro: depende de la cantidad de partículas a separar. $0.2 - 0.45 \mu\text{m}$
- Diámetro de filtro: depende del volumen de muestra. $4 - 30 \text{ mm}$

Filtración – Filtros de jeringa



Características de las membranas

Nylon

Compatibilidad muestras acuosas y orgánicas.

Membrana hidrofílica.

Incompatible:

Ácidos > 1N

Solventes halogenados

Celulosa Regenerada

Membrana hidrofílica

Compatible con prácticamente todos los solventes de HPLC

Tolera rango de pH de 3 a 12

Incompatible:

Ác. Sulfúrico, HCl, nítrico, fosfórico, DMF

Politetrafluoroetileno/Teflon (PTFE)

Membrana Hidrofóbica

Gran estabilidad térmica

Resistente a casi todos los solventes, ácidos y bases

Puede usarse para bloquear el vapor de agua

Incompatible

Ácido perclórico, dioxano, DMF

Filtración – Filtros de jeringa

Elección de membrana: depende del solvente y equipo

- Solventes No-polares y agresivos: PTFE (Politetrafluoroetileno/*teflon*)
- Solventes orgánicos/acuoso: PTFE-L
- Preparación de muestras biológicas: Cel. Regenerada
- Electroforesis capilar: PES (Polietersulfona)
- Matriz con alto contenido de sólidos: GMF (Microfibra de Vidrio)/pre-filtro
- Cromatografía HPLC: PVDF (Difluoruro de Polivinilideno)/Nylon/RC (Celulosa Regenerada)/PTFE-L
- Cromatografía iónica: PES/PVDF
- Análisis de proteínas: PVDF
- Trazas de metales: PES
- Espectrofotometría UV-Vis: PVDF

Solventes

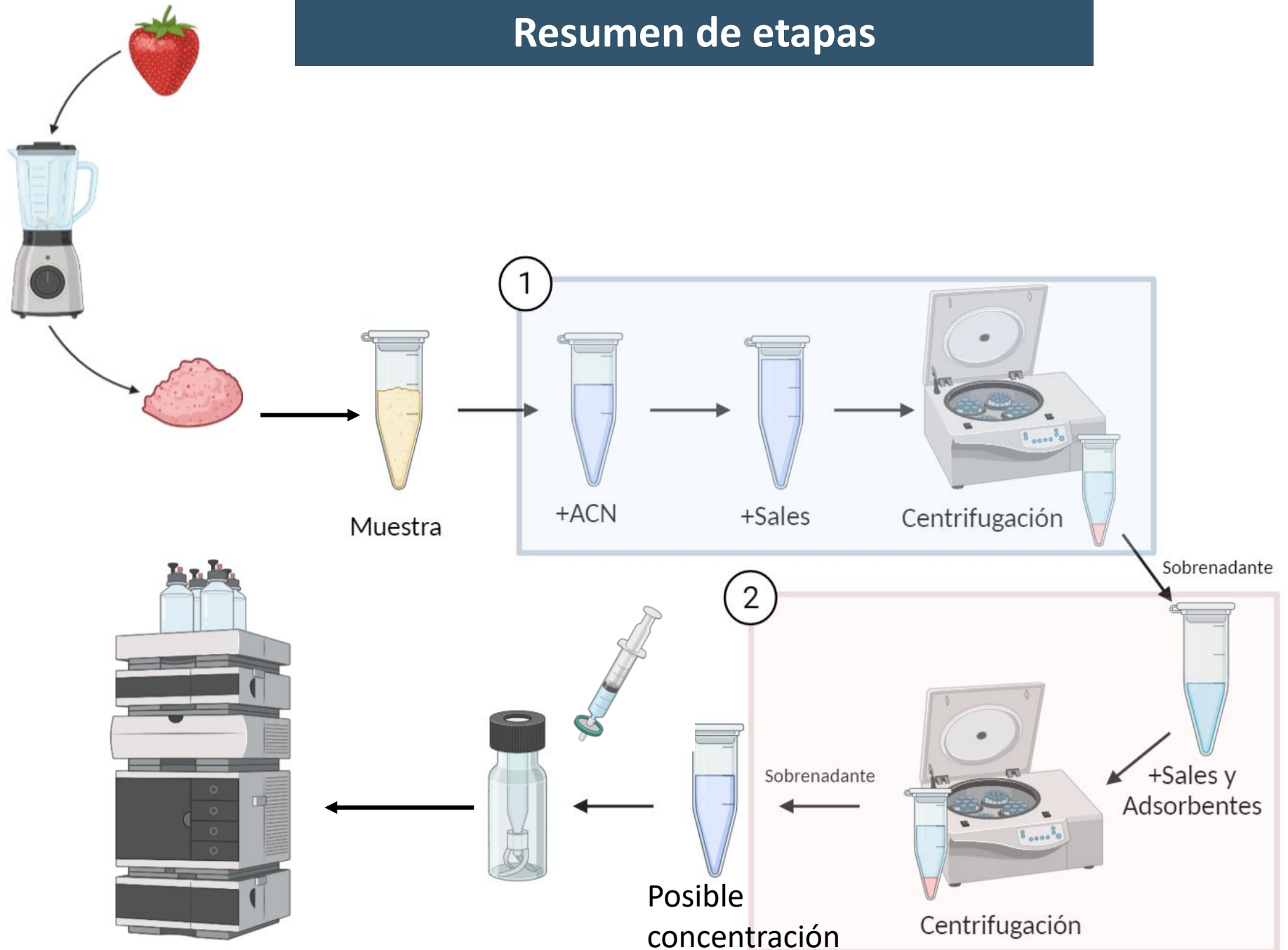
Acuosos

- Acetato de Celulosa
- Nylon
- PES
- PTFE-L

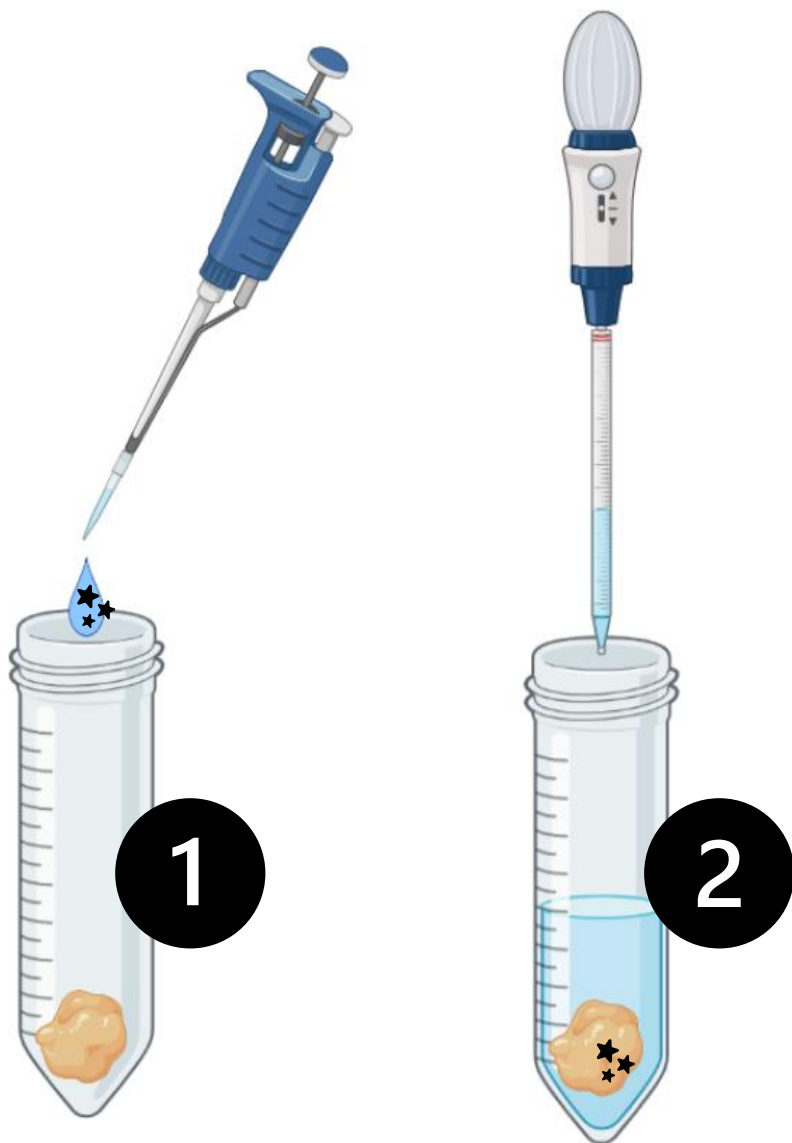
Solventes orgánicos

- PTFE
- PTFE-L
- PVDF
- Cel. Regenerada

Resumen de etapas



Fortificación/Spike de muestra



Para determinar cuan efectivo es nuestro método de extracción.

- 1- A una muestra blanco que conocemos que está libre de nuestro analito a determinar, se le agrega una concentración conocida del analito de interés.
- 2- A la muestra fortificada se la trata con el método de extracción/prep de muestra.
- 3- Se procede con el método de análisis. Se determina si la concentración hallada coincide con la concentración agregada. A partir de esta información se saca un porcentaje, denominado %Recuperación.

Cc agregada o mg _____ 100%
Cc hallada o mg _____ x=%Rec.

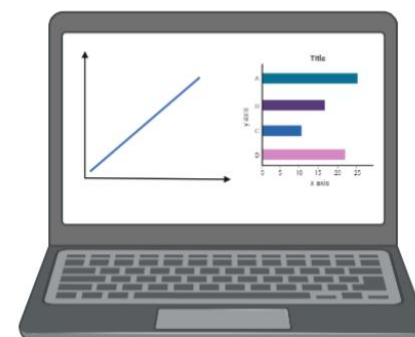
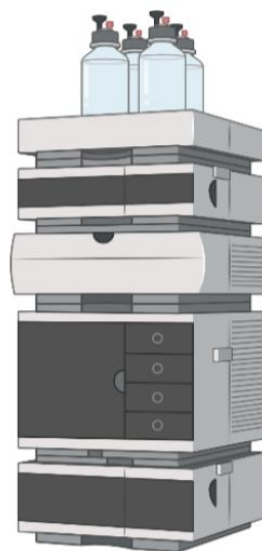
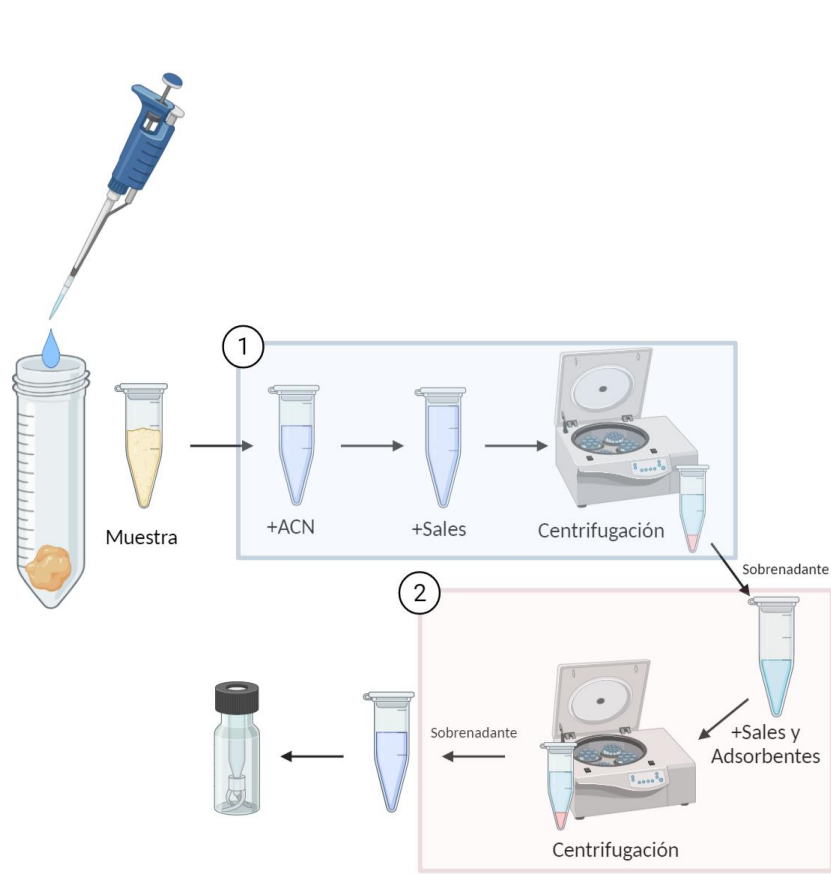
Fortificación/Spike de muestra

Fortificación

Preparación de muestra

Análisis

Interpretación
de resultados y
reporte



Reprocesamiento?
Muestra (+)
y Fortificación baja
recup

Conclusiones



- Existen múltiples métodos, siempre se busca utilizar el que menos tiempo y costos requiera.
- Cada combinación muestra-analito tendrá un proceso diferente. No es lo mismo aplicar la preparación de muestras de una muestra vegetal a una muestra de agua. Ej. SPE muestra vegetal $\neq$ SPE muestra agua.
- Se utilizan para extraer analitos de interés de distintos tipos de muestras. Los analitos pueden ser contaminantes (se controla una cc mínima) o benéficos para la salud (se utilizan como aditivos en otros alimentos).