



Preparación de muestra mediante la técnica de **EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**

Apellidos, nombre	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) Fuentes López, Cristina (crifuelp@upvnet.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de los alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

La preparación de muestra es una etapa clave en cualquier proceso analítico. Es la actividad que más tiempo puede requerir en el trabajo rutinario de laboratorio y, si no se emplea la metodología adecuada o no se lleva a cabo correctamente, puede ser una fuente de error muy importante. Uno de los objetivos de la preparación de muestra es extraer los analitos de interés, separándolos de otros componentes de la muestra que podrían interferir en nuestro análisis. La preparación de muestra en el análisis cromatográfico es una etapa esencial para lograr una adecuada selectividad y sensibilidad de nuestro método, pero también es importante para prolongar la vida de nuestros equipos cromatográficos. Existen procedimientos muy diferentes para la preparación de muestra empleados en cromatografía, una de las técnicas más utilizadas es la **Extracción en Fase Sólida** (EFS o SPE). En este objeto de aprendizaje vamos a describir el fundamento de esta técnica de preparación de muestra, analizaremos las diferentes opciones de trabajo e identificaremos el material básico necesario para llevar a cabo este procedimiento.

2 Objetivos

Una vez que el alumno lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Identificar las diferentes etapas en la preparación de muestra empleando la técnica de extracción en fase sólida
- Seleccionar el material necesario para llevar a cabo este procedimiento.
- Reconocer los distintos materiales que hay en el mercado para la preparación de muestra según este procedimiento.

3 Introducción

Un proceso analítico implica una secuencia de etapas que comprenden desde el planteamiento del problema hasta la evaluación de los resultados obtenidos (Imagen 1).



Imagen 1. Etapas del proceso analítico

La preparación de la muestra es una de las primeras etapas en cualquier procedimiento analítico y puede ser la tarea a la que más tiempo le dedicamos en el laboratorio. Además, si no se lleva a cabo correctamente puede suponer una fuente de errores importantísima.

En las determinaciones cromatográficas, como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución, las muestras precisan de una preparación previa al análisis cromatográfico, que puede perseguir distintos fines:

- **Extraer analitos de la matriz**, con lo que conseguimos compatibilizar la matriz de la muestra con el sistema cromatográfico. Por ejemplo, disolver los analitos de una muestra sólida, extraer los compuestos volátiles de una muestra líquida o sólida, etc.
- **Eliminar interferentes** o “limpiar la muestra”, eliminando aquellos compuestos que pueden afectar a la determinación analítica posterior, conseguimos mejorar la selectividad de nuestro método, es decir, mejorarnos la identificación de los analitos. Por ejemplo, eliminar proteínas o grasas de la matriz.
- **Concentrar los analitos**, con lo que conseguimos mejorar la cuantificación.
- **Transformar los analitos en nuevas especies compatibles con el sistema cromatográfico**, lo que denominamos derivatización.
- **Extender la vida del sistema cromatográfico** al eliminar contaminantes que podrían dañar nuestros equipos.



La preparación de muestra es una etapa esencial para conseguir unos resultados analíticos fiables; sin embargo, puede ser una importante fuente de error si no se realiza correctamente o no seleccionamos la técnica adecuada.

Existen diferentes procedimientos de preparación de muestra, que debemos conocer para seleccionar aquella técnica que mejor se adapte a nuestras necesidades analíticas. Así, podemos encontrar desde las prácticas más sencillas hasta procedimientos más complejos. Entre las preparaciones más simples, rápidas y económicas encontramos la dilución, filtración o precipitación que, aunque son muy poco selectivas pueden ser suficientes para nuestro objetivo. Sin embargo, la mayoría de análisis cromatográficos requieren de técnicas más complejas, necesarias cuando buscamos una mayor selectividad, obtener extractos “muy limpios”, y elevada sensibilidad.

La tendencia actual en el trabajo de laboratorio es el empleo de procedimientos de preparación de muestra donde se minimice el uso de disolventes, requieran menor tiempo de ejecución y que permitan la automatización. Algunas de las técnicas que reúnen estas características son:

- Espacio de cabeza estático ⇒ *Static headspace*
- Espacio de cabeza dinámico ⇒ *Dinamic headspace*
- Microextracción en fase sólida ⇒ *Solid Phase Microextraction* (SPME)
- **Extracción en fase sólida** ⇒ **Solid Phase Extraction (SPE)**
- Extracción en fase sólida dispersiva (método QuEChERS) ⇒ *Dispersive Solid Phase Extraction* (dSPE)
- Extracción Acelerada con Disolventes ⇒ *Accelerated Sorbent Extraction* (ASE)
- Extracción Asistida por Microondas ⇒ *Microwave Assisted Extraction* (MAE)
- Extracción con Fluidos Supercrítico ⇒ *Supercritical Fluid Extraction* (SFE)

Aunque todas ellas pueden considerarse técnicas independientes, en algunas ocasiones se requiere la combinación de varias de ellas para llevar a cabo el análisis cromatográfico posterior.

Una de las técnicas de preparación de muestra más selectivas y ampliamente utilizada en los últimos años es la **Extracción en Fase Sólida**.

4 Desarrollo

4.1 La técnica de Extracción en Fase Sólida

La **Extracción en Fase Sólida** (EFS), también conocida por el acrónimo de su nombre en inglés **SPE** (*Solid Phase Extraction*) es una de las técnicas de preparación de muestra más utilizadas para muestras líquidas o sólidas en disolución. La EFS consiste en la extracción de los compuestos de interés por retención sobre un adsorbente sólido. En realidad, este tipo de preparación de muestra es una forma de cromatografía, que consigue separar selectivamente los analitos de los interferentes de la matriz.

En su forma más sencilla, la extracción en fase sólida se realiza en **cartuchos** o **columnas**, que generalmente tienen formato de jeringa, fabricados con polipropileno o vidrio (Imagen 2). Estos cartuchos contienen un material adsorbente confinado entre dos fritas de PTFE (politetrafluoroetileno), polietileno o teflón que tienen un tamaño de poro de unas 10-20 μm . Los materiales adsorbentes utilizados como relleno son muy similares a los utilizados en las columnas de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), generalmente se trata de partículas esféricas o irregulares, pero con un tamaño de partícula mayor (40 μm aproximadamente). El tipo y cantidad de material adsorbente de estos cartuchos es variable para adaptarse a las distintas necesidades analíticas. En el mercado hay una gran variedad de estos cartuchos de extracción, con volúmenes que oscilan desde 0,5 hasta 10 mL y con una carga de relleno también variable, desde 35 mg hasta 2 g. Existen también otros formatos adaptados a necesidades especiales.

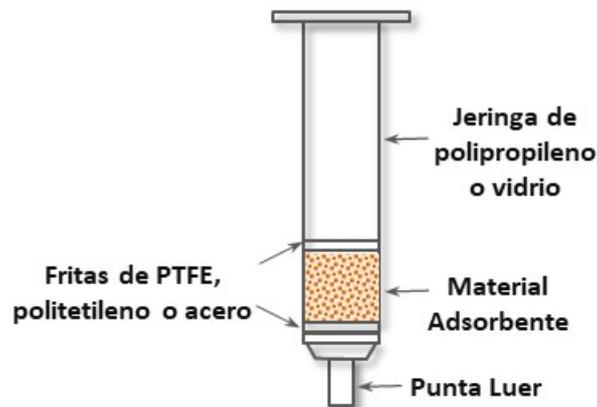


Imagen 2. Configuración de los cartuchos empleados en la Extracción en Fase Sólida (SPE)

Además de los cartuchos, hay otros formatos muy utilizados en este tipo de procedimiento como son discos, puntas de pipeta o placas de 96 pocillos.

La principal diferencia de los **discos SPE** respecto a los cartuchos son sus dimensiones (Imagen 3), de forma que mientras que la relación longitud/diámetro (L/d) en un cartucho es superior a 1 ($L/d > 1$), en los discos esta relación es inferior a la unidad ($L/d < 1$). Esta configuración hace que los discos SPE permitan un flujo de trabajo mayor y por tanto la extracción sea más rápida.

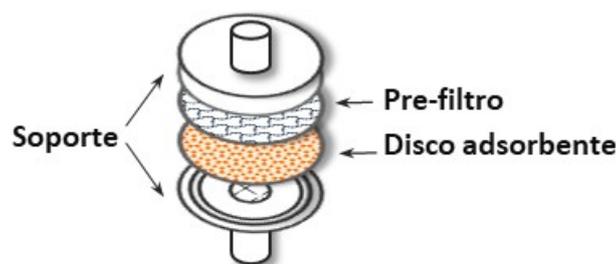


Imagen 3. Configuración de los discos empleados en la Extracción en Fase Sólida (SPE)

Otros formatos son las **puntas de pipeta** en cuyo interior se encuentra la fase adsorbente y las **placas multi-pocillos** (Imagen 4). Estos formatos son cada vez más utilizados ya que permiten una fácil automatización.

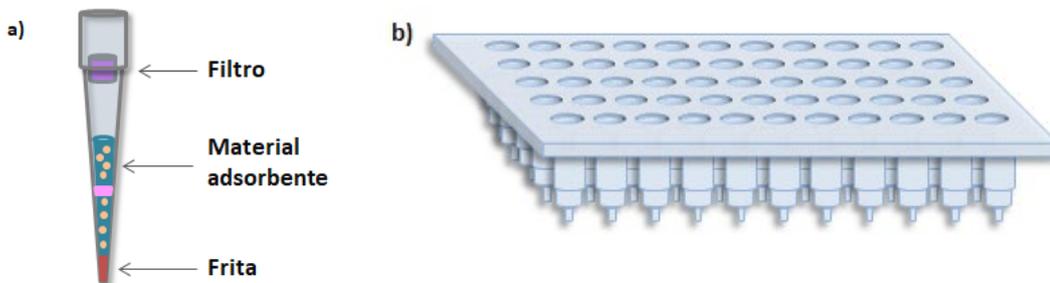


Imagen 4. Puntas SPE (a) y placas de 96-pocillos SPE (b)

4.2 Tipos de adsorbentes empleados en Extracción de Fase Sólida

La selectividad de la extracción está relacionada con la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos de interés y el resto de compuestos de la matriz o interferentes.

La selección del material adsorbente es determinante para conseguir la selectividad adecuada de nuestro procedimiento de extracción; para ello deberemos considerar las características de la matriz de la muestra, la naturaleza y la concentración de los analitos de interés, así como los compuestos presentes en la muestra que pueden provocar interferencias.

Los materiales adsorbentes pueden clasificarse en:

- Adsorbentes hidrofóbicos
- Adsorbentes hidrofílicos
- Adsorbentes de intercambio iónico
- Adsorbentes de afinidad
- Adsorbentes mixtos

Dependiendo del tipo de adsorbente el mecanismo de retención con el analito de interés será diferente. En algunas ocasiones se emplean etapas consecutivas de SPE combinando el uso de diferentes adsorbentes para mejorar la extracción.

4.3 Etapas en el proceso de Extracción en Fase Sólida

Aunque podemos encontrar algunas variaciones en el procedimiento de extracción en fase sólida, en general, las etapas de esta técnica son las siguientes:

1. Pre-tratamiento de la muestra

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, de los analitos a determinar o del proceso de retención química, puede ser necesario llevar a cabo algunas etapas previas al



procedimiento de extracción. Entre las etapas más utilizadas destacan el ajuste del pH, centrifugación, filtración, dilución, etc. Aunque en algunas ocasiones se requiere también algún tratamiento relacionado con la determinación analítica posterior, como la adición de patrón interno o la derivatización.

2. Acondicionamiento

2a. Acondicionamiento, donde se pasa el disolvente a través del cartucho que contiene el relleno, con el objetivo de eliminar cualquier posible impureza y solvatar el adsorbente. Esta etapa permitirá al adsorbente interactuar de forma más efectiva con el analito objetivo.

2b. Equilibrado, donde se elimina el exceso del disolvente de acondicionamiento y el relleno del cartucho es tratado con una disolución similar a la matriz de la muestra (en condiciones de polaridad, pH, etc.). Con este equilibrado conseguimos maximizar la retención del analito en el adsorbente.

3. Carga de la muestra

Consiste en la introducción de la muestra en el cartucho que contiene el adsorbente acondicionado y que permite que los analitos de interés sean retenidos en el relleno. Algunos componentes de la matriz pueden pasar por el cartucho sin ser retenidos, mientras que otros pueden retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. La carga de la muestra se puede realizar de manera manual o automática, y para obtener la máxima eficacia del proceso se deberá controlar el caudal de la muestra.

4. Lavado

Mediante esta etapa se consigue eliminar selectivamente las interferencias no deseadas, que no se han unido al adsorbente pero que permanecen en el cartucho. En el lavado se puede utilizar un disolvente o una mezcla de diferentes disolventes para mejorar la eficacia de esta etapa, pero siempre hay que tener cuidado de no eluir el analito.

5. Elución de los analitos

Una vez eliminados los interferentes se eluye el analito de interés, lo que se consigue utilizando un disolvente que anule las interacciones entre el adsorbente y dicho analito. El disolvente empleado deberá tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con algunos interferentes que podrían haber quedado atrapados en el adsorbente. En esta etapa debemos conseguir que el volumen de elución sea lo menor posible para garantizar la concentración del analito.

6. Evaporación o concentración

En la mayoría de los procedimientos, se finaliza la preparación de la muestra con la evaporación del eluato que contiene el analito, lo que nos permite concentrar el compuesto a analizar. Opcionalmente, tras la evaporación se puede reconstruir en un disolvente que, en el caso de querer analizar por HPLC, podría ser la fase móvil a usar posteriormente en el análisis cromatográfico.

A continuación, podemos ver un esquema con los diferentes pasos de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) que acabamos de comentar (Imagen 5).

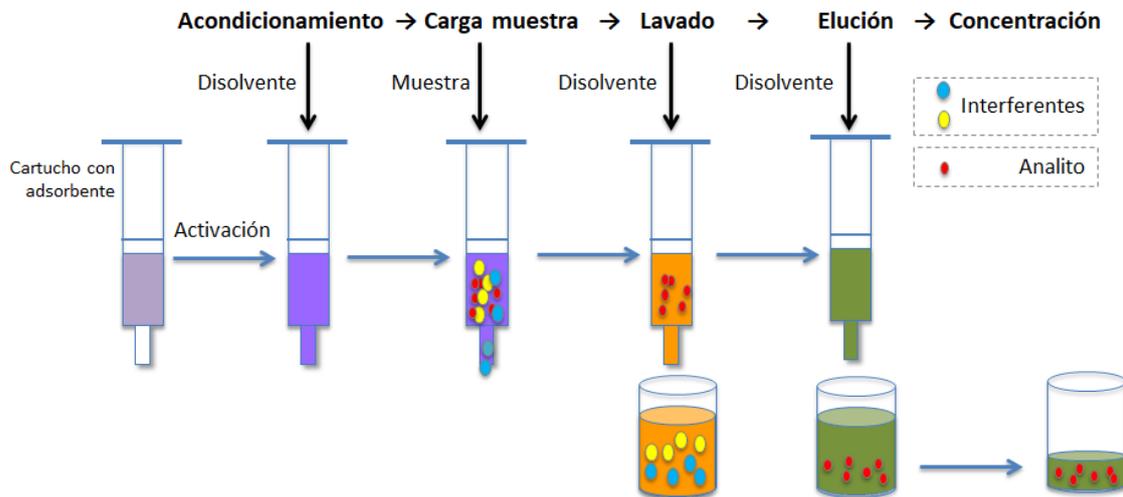


Imagen 5. Esquema del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE)

Podemos identificar tres posibilidades de trabajo en este tipo de procedimiento:

1. Retención y elución

El analito queda retenido, y la matriz no requerida se lava para eliminar interferencias. Finalmente, el analito se eluye, tal y como hemos explicado anteriormente. Este es el procedimiento más comúnmente utilizado.

2. Retención de interferencias

Los compuestos no deseados de la matriz quedan retenidos y el analito pasa por el tubo durante la etapa de introducción de la muestra sin ser retenido.

3. Fraccionamiento

Los analitos son retenidos en el material adsorbente y se lleva a cabo una elución secuencial de los distintos analitos, por modificación de pH o de la proporción de disolvente orgánico del eluyente

¿Cuáles son las principales ventajas de la Extracción en Fase Sólida?



- ✓ Procedimiento rápido y sencillo
- ✓ Alta capacidad de automatización
- ✓ Reducción en el uso de disolvente con el consiguiente ahorro económico y menor impacto medioambiental y para la salud de analistas
- ✓ Gran disponibilidad de materiales adsorbentes que amplían su campo de aplicación

4.4 Variables a controlar en el proceso de Extracción en Fase Sólida

Para seleccionar y/o optimizar el proceso extracción en fase sólida a utilizar en cada caso deberemos considerar los siguientes factores:

- Tipo de fase sólida
- Tipo de eluyente
- Volumen del lecho
- Velocidad de carga de la muestra
- Porosidad de la fase sólida adsorbente

Entre estas variables, las que tienen un mayor impacto sobre la efectividad del proceso son la elección adecuada del adsorbente y del disolvente de elución.

En la actualidad hay disponibles una gran variedad de adsorbentes, cada uno de los cuales ofrece una selectividad diferente. Hay diferentes fases que pueden utilizarse en este tipo de preparación de muestra, la elección de un tipo de material adsorbente u otro depende de las características del analito a determinar. Aunque en algunas ocasiones, para el análisis de un analito pueden emplearse adsorbentes diferentes, conocer las características del analito objetivo es esencial para seleccionar con éxito la fase de extracción.

5 Cierre

La preparación de la muestra es una de las primeras etapas en cualquier procedimiento analítico y una tarea decisiva para garantizar la fiabilidad de nuestros resultados. A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto el fundamento de uno de los procedimientos de preparación de muestra más utilizados, como es la técnica de extracción en fase sólida, conocida comúnmente como SPE. Esta técnica es muy empleada en los análisis cromatográficos, por su sencillez y selectividad. También hemos visto las diferentes etapas

que constituyen este procedimiento de trabajo, los materiales adsorbentes que pueden emplearse y los factores que influyen en el proceso de extracción.

6 Bibliografía

Majors, R. E. (2013). Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Technologies, Mississauga, Canada. Disponible en:
https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf

Phenomenex (2017). The Complete Guide to Solid Phase Extraction (SPE). A method development and application guide. Disponible en:
<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/13868f78-8e68-4e8f-8eb7-d36ec8787b93.pdf>