

Nuevas técnicas de preparación de la muestra: MAE, ASE, SFE, SPE y SPME

F. Javier Señoráns

<http://www.uam.es/javier.senorans>

E-mail: javier.senorans@adi.uam.es

Área de Tecnología de Alimentos

<http://www.uam.es/otros/gruta/Research/Principal.htm>

Asignatura de Análisis Avanzado de Alimentos

Esquema

- **Introducción a las nuevas técnicas de preparación de la muestra**
- **Extracción analítica con Fluidos Supercríticos (SFE, Supercritical Fluid Extraction)**
- **Extracción Acelerada con Disolventes (ASE, Accelerated Solvent Extraction)**
- **Extracción Asistida por Microondas (MAE, Microwave Assisted Extraction)**
- ✍ **Extracción en Fase Sólida (SPE, Solid Phase Extraction)**
- ✍ **Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME, Solid Phase Micro-Extraction)**

Técnicas modernas de preparación de la muestra

✍ La mayoría de las muestras de alimentos que se analizan por métodos instrumentales de separación son demasiado complejas, están demasiado diluidas o son incompatibles con el sistema cromatográfico, lo que impide su introducción directa

Consecuencia: se necesita preparar la muestra antes de su introducción en el sistema, mediante fraccionamiento, extracción o pre-separación.

Necesidad de nuevas técnicas de preparación de muestras de alimentos

Problemas actuales de métodos oficiales y tradicionales:




- lentitud y laboriosidad
- empleo de grandes cantidades de disolventes tóxicos
- poca selectividad
- poco rendimiento

Métodos tradicionales de preparación de la muestra:

- más de 2/3 del tiempo del analista
- responsable de al menos 1/3 del error en el análisis
- enorme volumen de disolventes

Técnicas modernas de preparación de la muestra

 Existe gran interés en desarrollar nuevas técnicas de extracción rápidas y fiables para preparación de muestras para su análisis que mejoren las actuales

Metas: posibilidad de automatización
técnicas limpias y selectivas
mayor rapidez y eficacia

Idealmente, además, baratas, sencillas,
sin disolventes tóxicos

Necesidad de nuevas técnicas de preparación de muestras de alimentos

Métodos tradicionales de extracción (ej. Soxhlet) :
líquido en ebullición en contacto con muestra sólida

⇒ difusividad del disolvente lenta
intercambio de energía poco eficaz
procesos estáticos o semi-estáticos

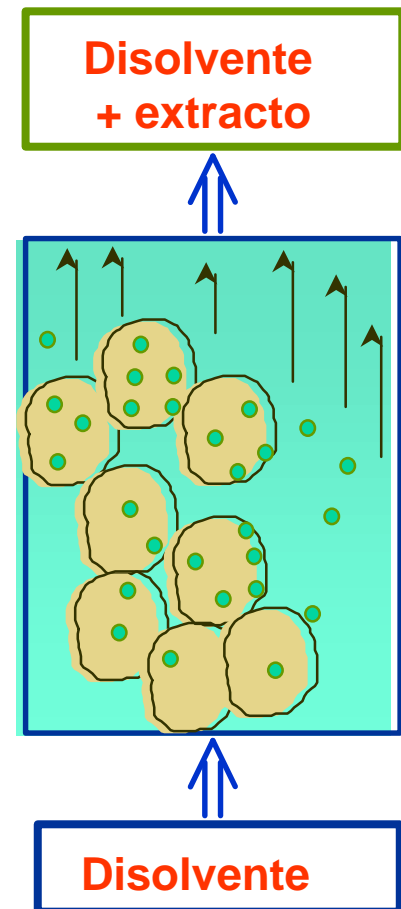


Extracción lenta y poco eficaz

⇒ disolventes convencionales
calor como única energía



Extracción lenta y poco selectiva



Fundamentos de la preparación de muestra mediante extracción

Principio de la extracción:

Separación de una sustancia de una mezcla mediante un disolvente

Factor clave:

Gradiente o diferencia de concentración de dicha sustancia entre la mezcla y el disolvente

Extracción de alimentos sólidos:

- naturaleza de la matriz importante
- difusividad del fluido en las partículas lenta
- intercambio de energía poco eficaz
- conviene disminuir el tamaño de partícula del sólido para aumentar la superficie de contacto
- los procesos no son continuos

Técnicas instrumentales de extracción de muestras sólidas de alimentos

Principio Teórico

El proceso de extracción de compuestos de sólidos es muy complejo, por lo que se simplifica suponiendo que:

- la concentración inicial de los compuestos es uniforme
- los compuestos no están enlazados con la matriz
- las partículas del alimento son esféricas y homogéneas
- el medio de extracción tiene una dilución constante



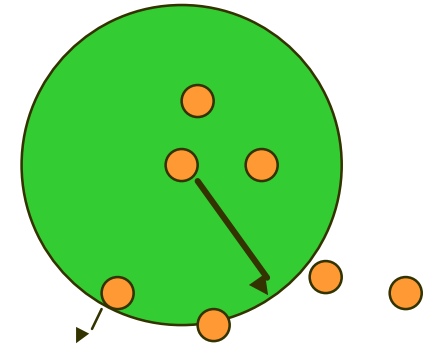
Modelo de “hot ball” de Bartle

Técnicas instrumentales de extracción de muestras sólidas de alimentos

Principio Teórico de la extracción de sólidos

Modelo de “hot-ball” de Bartle

$$\ln (m_1/m_0) = K - D t / r^2$$



Relación entre la masa de un compuesto que permanece en la matriz m_1 y la masa inicial, m_0 , a un tiempo t

D = coeficiente de difusión

r = radio de las partículas

$$(m_0/m_1) ? f (D t / r^2)$$

Extracción más efectiva con:

- menores diámetros de partícula
- mayores coeficientes de difusión

Técnicas instrumentales de extracción de muestras sólidas de alimentos

Principios comunes a las nuevas técnicas de extracción:

Extracción asistida por microondas (MAE).

Extracción acelerada con disolventes (ASE).

Extracción supercrítica analítica (SFE).



Se emplean disolventes de alta difusividad elevando la temperatura y controlando la presión



Debido a los mayores coeficientes de difusión, las extracciones se aceleran considerablemente

Principios de la Extracción Asistida por Microondas (MAE)

Se extrae la muestra aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado.

Energía de microondas:

- ✍ calienta selectivamente unas especies químicas frente a otras
- ✍ produce extracciones rápidas y con cierta selectividad.

El calentamiento producido depende de la naturaleza química de la matriz y del disolvente

Cuanto mayor es la constante dieléctrica, mayor es la absorción de energía.

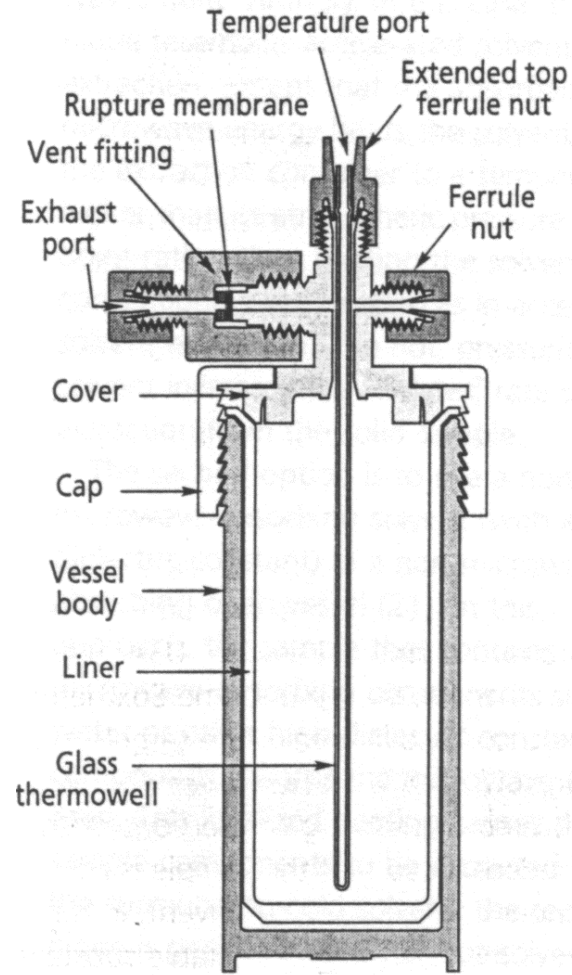
Extracción Asistida por Microondas (MAE)

Procedimiento habitual

Quando el disolvente absorbe energía microondas:

- ✍ La muestra se coloca en un recipiente cerrado
- ✍ se calienta a temperaturas mayores que su punto de ebullición durante un tiempo muy corto (aumenta la presión)
- ✍ después se enfría y se despresuriza
- ✍ se separa o filtra el extracto

Extracción Asistida por Microondas (MAE)



Además de no absorber microondas, las celdas para MAE deben ser inertes, fáciles de abrir y cerrar, reutilizables y resistentes a altas P y temperaturas

Esquema de una celda comercial con control de presión y de temperatura para MAE

Extracción Asistida por Microondas (MAE)

Ventajas

- ✍ MAE es más rápida (30 seg.-15 min) y emplea menos disolvente (1-15 mL) que los procedimientos de extracción líquida tradicionales
- ✍ La energía está localizada y se aprovecha mejor (menor consumo)
- ✍ El tamaño de muestra puede ser muy variado
- ✍ MAE es una técnica robusta y fácil de usar
- ✍ MAE puede extraer varias muestras a la vez
- ✍ No hace falta deshidratar o procesar la muestra

Extracción Asistida por Microondas (MAE)

Desventajas

- ✍ MAE plantea problemas de seguridad**
- ✍ MAE depende de la matriz y limita los disolventes que se pueden utilizar (conviene que no absorban la energía de microondas)**
- ✍ El extracto queda en contacto con la muestra al acabar la extracción y necesita una posterior filtración o separación**
- ✍ MAE es difícil de automatizar o acoplar a técnicas de análisis**
- ✍ Degradación de compuestos térmicamente lábiles**
- ✍ Poca selectividad en la extracción**

Ejemplo de Extracción Asistida por Microondas (MAE)

Extracción de grasa de carne, huevo y sólidos lácteos

Homogeneización de la muestra

La muestra se coloca en un recipiente abierto adecuado

Se añade el disolvente: éter de petróleo o hexano

Se irradia a 300 W durante 60 + 90 segundos

El extracto se filtra a vacío y se evapora en rotavapor

Extracción Acelerada con Disolventes (ASE)

Principios de la Técnica

- nueva técnica de extracción
- disolventes habituales
- presiones y temperaturas elevadas
- extracciones rápidas y efectivas de muestras sólidas

Efectos interesantes que se producen a temperaturas elevadas:

- mejores solubilidades de los analitos en líquidos
- aumento de las cinéticas de desorción de los compuestos de la matriz

Extracción Acelerada con Disolventes (ASE)

Parametros típicos de la Técnica

Temperaturas: 30 - 200 °C

Presiones: 100 - 140 atm

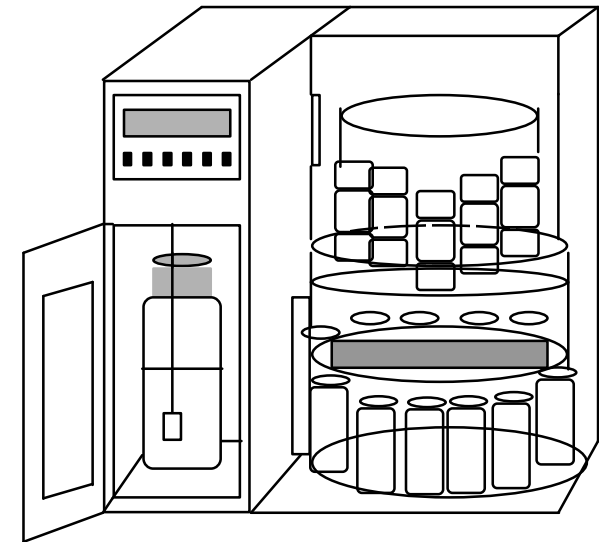
Disolventes: orgánicos, agua, etc.

Muestras: sólidas

Extracción Acelerada con Disolventes (ASE)

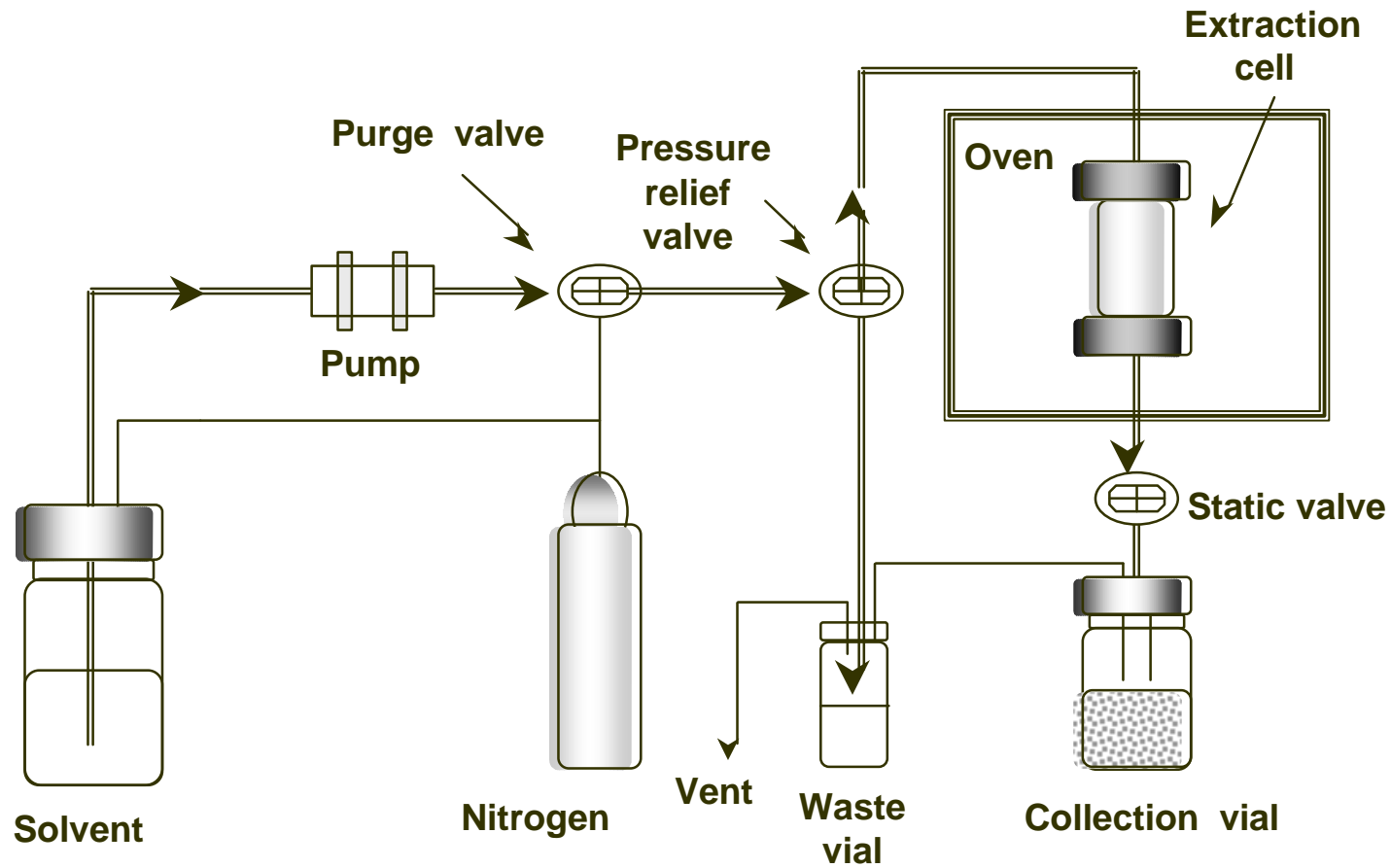
Procedimiento

La muestra sólida se coloca en un recipiente que se sella, se llena con disolvente y se calienta a temperatura mayor que el punto de ebullición del disolvente, provocando un gran aumento de la presión en la celda.



Durante el tiempo de extracción parte del líquido es liberado y recogido en un vial. Al final de la extracción, el extracto se expulsa de la celda con nitrógeno y se transfiere automáticamente a un vial.

Extracción Acelerada con Disolventes (ASE)



Extracción Acelerada con Disolventes (ASE) de alimentos

Ventajas

- ✍ **ASE™ es más rápida que los procedimientos de extracción líquida tradicionales**
<15 min versus 2-24 h
- ✍ **ASE emplea menos disolvente**
<15 mL para 10 g de muestra vs. 50-500 mL
- ✍ **ASE es más eficaz independientemente de la matriz**
- ✍ **ASE es automatizable y puede extraer muestras secuencialmente**

Extracción Acelerada con Disolventes (ASE) de alimentos

Desventajas

- ✍ Las extracciones son más completas, pero menos selectivas
- ✍ ASE requiere el empleo de temperaturas más altas que en SFE
- ✍ El equipo tiene un precio elevado

Extracción Analítica con Fluidos Supercríticos (SFE)

Principios de la Técnica

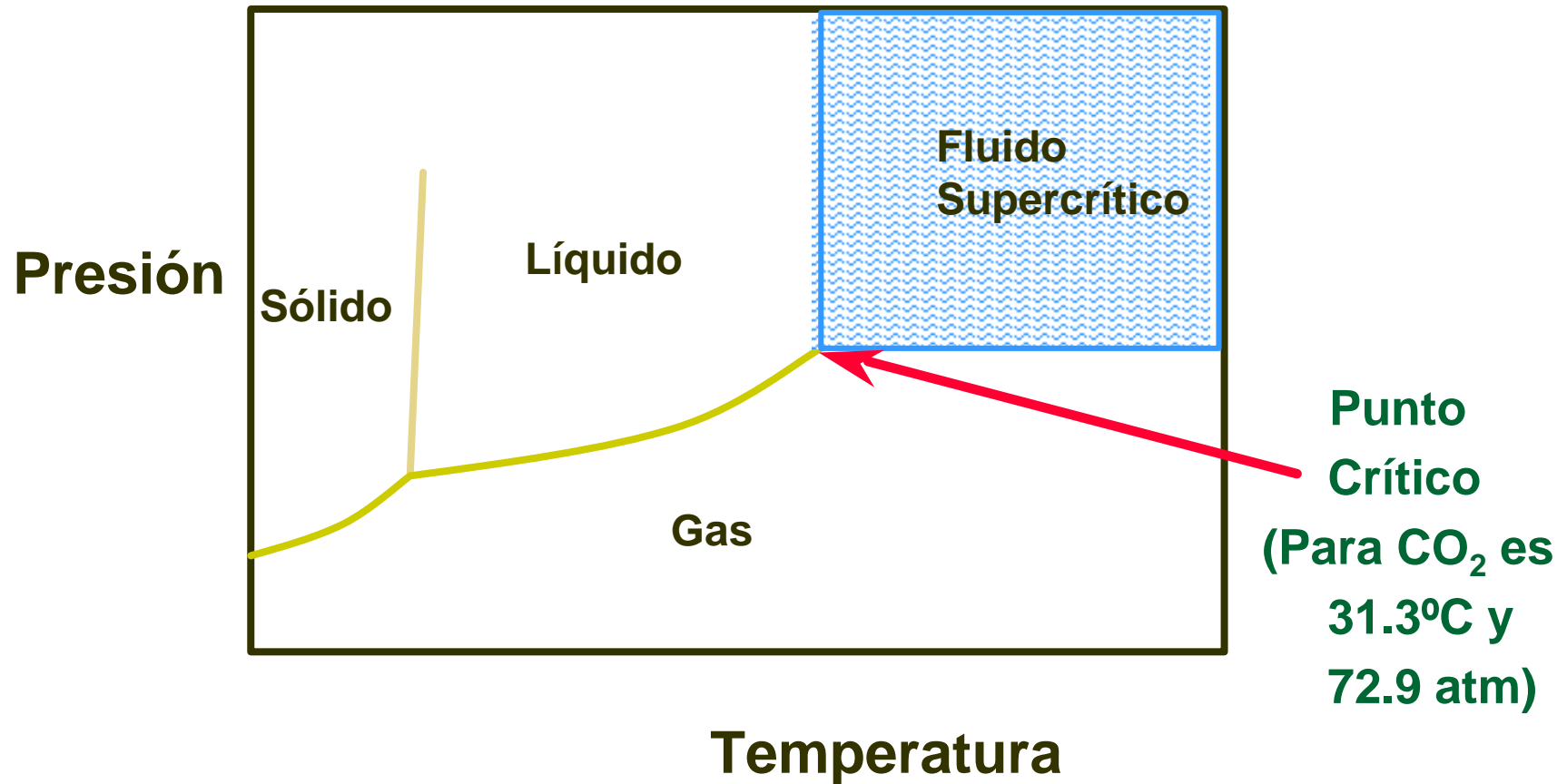
Se extrae con un fluido a presiones y temperaturas mayores que las de su punto crítico

✍ extrae rápida y selectivamente algunos compuestos

Variando la presión (la densidad del fluido) se controla la solubilidad de los analitos en dicho fluido.

¿Qué es un Fluido Supercrítico?

Diagrama de fases



Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

Propiedades físicas de los fluidos supercríticos

Tienen densidades y difusividades similares a las de los líquidos, pero viscosidades similares a las de los gases:

<u>Estado</u>	<u>Densidad</u> (g/mL)	<u>Viscosidad</u> (poise)	<u>Difusividad</u> (cm ² /seg)
Gas	10 ⁻³	0.5 - 3.5 (x 10 ⁻⁴)	0.01-1.0
Fluido Sup.	0.2-0.9	0.2 - 1.0 (x 10 ⁻³)	0.1 - 3.3 (x10 ⁻⁴)
Líquido	0.8-1.0	0.3 - 2.4 (x 10 ⁻²)	0.5 - 2.0 (x10 ⁻⁵)

Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE): fundamentos

Cinética de extracción determinada por:

Velocidad de Transferencia de materia en la interfase superficial

Difusión en la mezcla

Diferencia en concentración

Propiedades químicas del disolvente: agua, disolventes orgánicos, fluidos supercríticos

Solubilidad en dióxido de carbono:

Sustancias lipofílicas apolares (p.ej. Hidrocarburos, éteres, ésteres, cetonas): **Fácilmente solubles en CO₂**

Sustancias con grupos funcionales polares (p. ej. -OH, -COOH):

Solubilidad disminuye

Oligómeros apolares: Menos solubles

Sustancias polares (p. ej. Azúcares, Glicósidos, Aminoácidos, Lecitina):

No solubles

Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

Propiedades del dióxido de carbono

- Moderadas presión (72.9 atm) y temperatura (31.3°C) críticas
- Gas a temperatura ambiente, no deja residuos
- No es tóxico ni inflamable
- Precio moderado y sin problemas de eliminación
- Baja polaridad, se pueden añadir modificadores en pequeña proporción para extraer compuestos polares

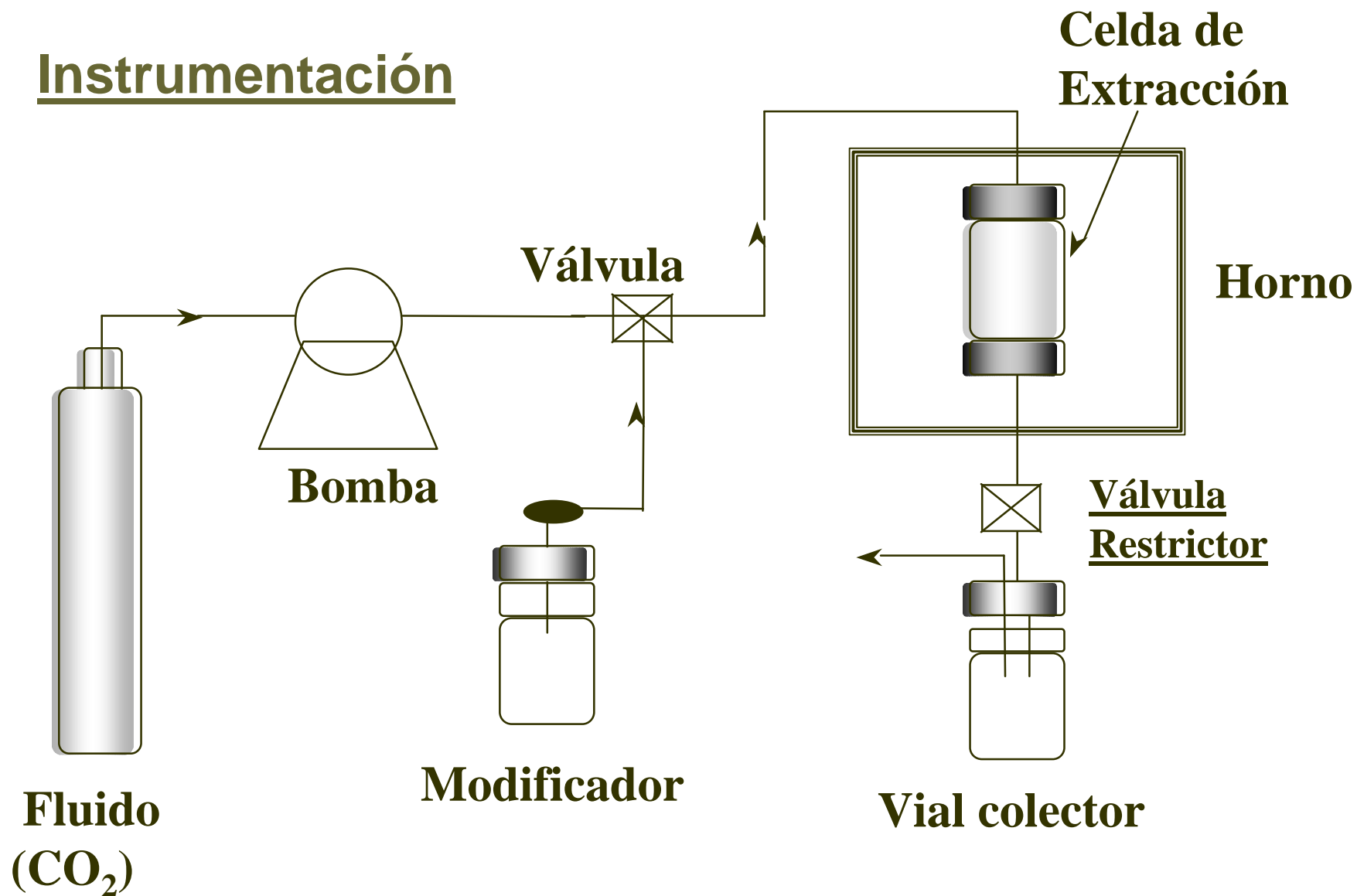
Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

Procedimiento

La muestra se coloca en una celda de extracción, y se bombea el fluido correspondiente hasta alcanzar la Presión y Temperatura deseadas (mayores que su punto crítico). Después de un tiempo de extracción estática o dinámica, el fluido con el extracto se despresuriza y se recoge el extracto limpio en una trampa adsorbente o en un disolvente para su análisis.

Extracción Analítica con Fluidos Supercríticos (SFE)

Instrumentación



Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

Ventajas

- ✍ **SFE es más rápida que los procedimientos de extracción líquida tradicionales (<10-60 min vs. 2-24 h)**
- ✍ **SFE emplea menos disolvente <0-15 mL para 10 g de muestra vs. 50-500 mL**
- ✍ **SFE es muy selectiva**
- ✍ **El extracto puede estar concentrado y puro al eliminarse inmediatamente el dióxido de carbono al acabar la extracción**
- ✍ **SFE es automatizable y puede extraer varias muestras a la vez**
- ✍ **Es una técnica analítica muy extendida, con numerosas aplicaciones en la bibliografía**
- ✍ **Se puede acoplar directamente a GC y SFC**

Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

Desventajas

- ✍ **La técnica es más compleja y difícil de optimizar (hay más factores a controlar)**
- ✍ **El efecto de la matriz es muy importante y no siempre existe un método desarrollado**
- ✍ **SFE no es muy efectiva para extraer compuestos polares y requiere la adición de modificadores**
- ✍ **El equipo tiene un precio elevado**

Extracción en fase sólida (SPE)

Principios de la Técnica

Se basa en la retención sobre un adsorbente sólido de los compuestos deseados disueltos en una muestra líquida.

- La adición de un eluyente permite eliminar los componentes de la matriz que interfieren
- Después se eluyen y concentran los analitos de interés.

La extracción en fase sólida sustituye a la extracción líquido-líquido clásica.

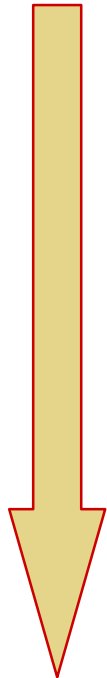
Extracción en Fase Sólida (SPE)

Tipos de rellenos	Fase inversa	Fase normal	Intercambio iónico
Aplicación	Aislamiento de componentes no polares de una matriz polar	Aislamiento de componentes polares de una matriz no polar	Aislamiento de componentes ionizables
Fases de SPE	<u>-(S) C18</u> -O-Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	<u>-(S) Silica</u> -O-Si-OH	<u>-Intercambio Aniónico</u> --Si-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₂) ₃ Cl ⁻
	<u>-(S) C8</u> -O-Si-(CH ₂) ₇ CH ₃	<u>-NH₂</u> --O-Si-(CH ₃) ₂ NH ₂	<u>-Intercambio Catiónico</u> --Si-(CH ₂) ₃ SO ₃ -H ⁺
	<u>-Resina (gel)</u> -Copolímero de poliestireno/ divinil benzeno entrecruzado	<u>-Florisil</u> -MgO·3,6SiO ₂ ·0,1OH	<u>-Mixtas</u> -C8 + SCX
	<u>-Fenil</u> --O-Si-C ₆ H ₅	<u>-Diol</u> --O-Si-(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)	
	<u>-Hypercarb</u> -100% C poroso grafitizado	<u>-Ciano</u> --O-Si-(CH ₂) ₃ CN	
	<u>- Mixtas</u>	<u>- Hypercarb</u>	

Extracción en fase sólida (SPE): Fuerza de elución de los disolventes

Fase Normal

Menor



Hexano
Isooctano
Tolueno
Éter
Cloroformo
Diclorometano
Tetrahidrofurano
Acetona
Acetato de etilo
Acetonitrilo
Isopropanol
Metanol
Agua

Mayor

Fase Inversa

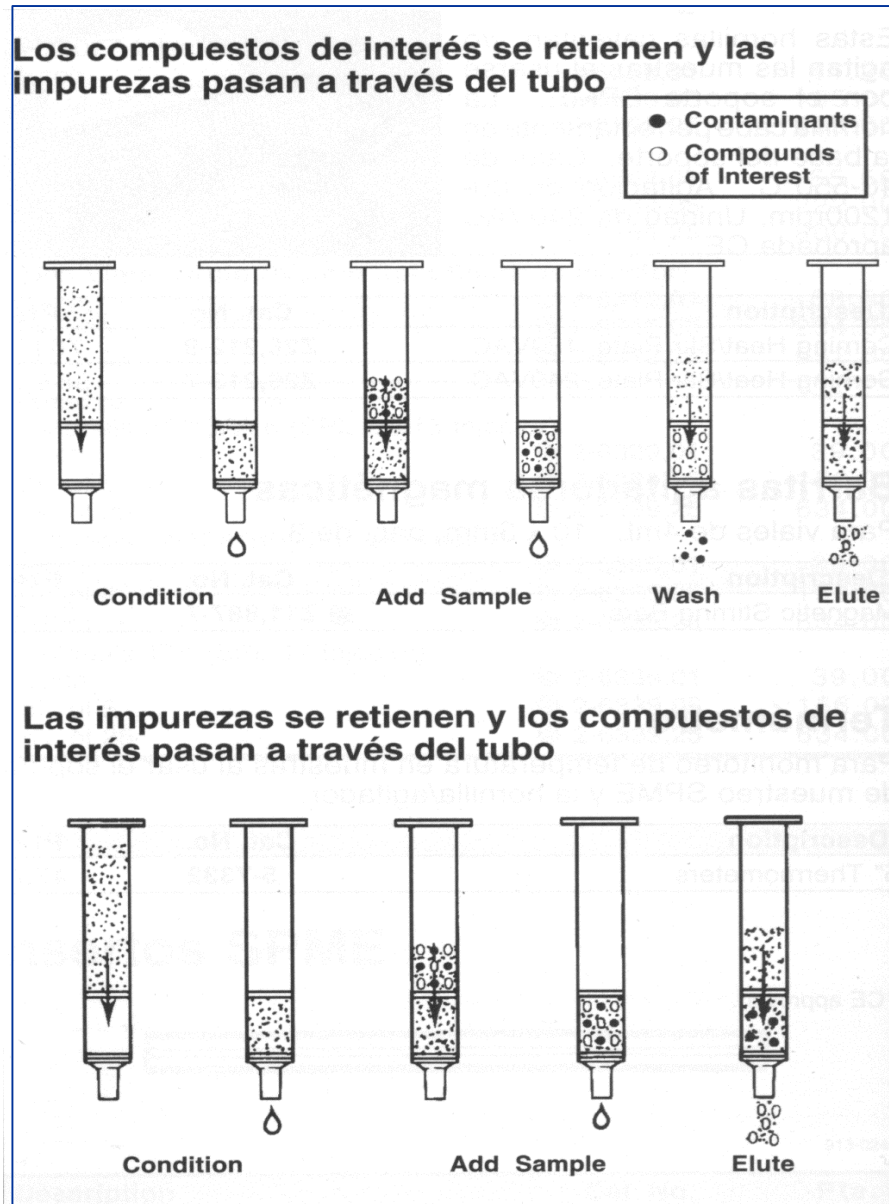
Mayor



Hexano
Isooctano
Tolueno
Éter
Diclorometano
Tetrahidrofurano
Isopropanol
Acetato de etilo
Cloroformo
Acetona
Acetonitrilo
Metanol
Agua

Menor

Procedimiento de la Extracción en Fase Sólida (SPE)



Limpieza y
concentración
de los analitos

Limpieza de la
muestra sin
concentración

Ventajas y desventajas de SPE

- ✍ **Es una técnica muy sencilla y barata**
- ✍ **Existen numerosos adsorbentes disponibles en el mercado para SPE**
- ✍ **Se pueden acoplar a otras técnicas de separación**
- ✍ **Emplean poco o ningún disolvente**
- ✍ **SPE es muy efectiva para extraer compuestos polares o apolares de muestras líquidas**
- ✍ **Está limitada a muestras líquidas**

Extracción en Fase Sólida (SPE)

Aflatoxins

SPE, LC

Sample: cornmeal spiked with aflatoxins
(30ppb G₂ and B₂, 100ppb G₁ and B₁)
Blend 50g sample for 1 min in 100mL
methanol:water (8:2) and filter.

Extraction Tube: **Supelclean LC-CN, 3mL, 0.5g packing**

Cat. No.: **5-7013**

Conditioning: 2mL 0.5% aqueous acetic acid

Sample Addition: 1mL filtered extract + 4mL 0.5% aqueous acetic acid

Washing: 500µL 20% THF in 0.5% aqueous acetic acid
2mL hexane

Dry packing under nitrogen.

3mL 25% THF in hexane

Dry packing 1 min under nitrogen.

Elution: 2 x 2mL 1% THF in methylene chloride

Evaporate eluate to dryness under nitrogen.

Reconstitute with 100µL of methanol, then dilute with
100µL of 0.5% aqueous acetic acid.

Column: **SUPELCOSIL LC-18, 25cm x 4.6mm ID, 5µm particles***

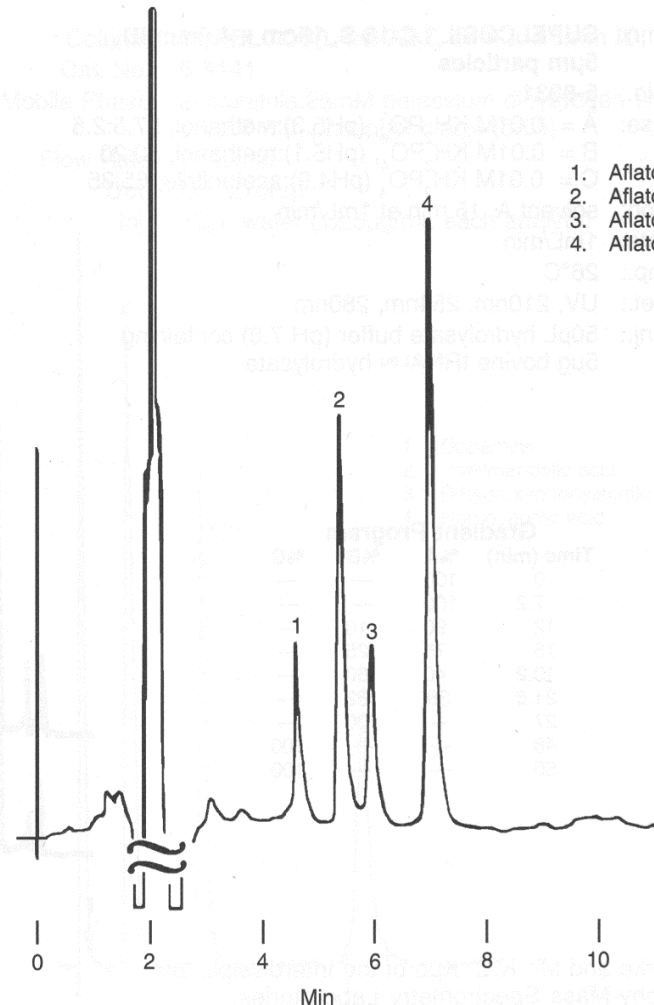
Cat. No.: **5-8298**

Mobile Phase: methanol:acetonitrile:water (22.5:22.5:55)

Flow Rate: 1.5mL/min

Det.: VIS, 365nm

Inj.: 100µL



**Ejemplo de SPE de aflatoxinas en maíz y análisis por
cromatografía de líquidos**

Micro-extracción en fase sólida (SPME)

Principios de la Técnica

Se basa en la adsorción de los compuestos orgánicos del alimento por una fase sólida inmovilizada sobre una fibra de sílice fundida.

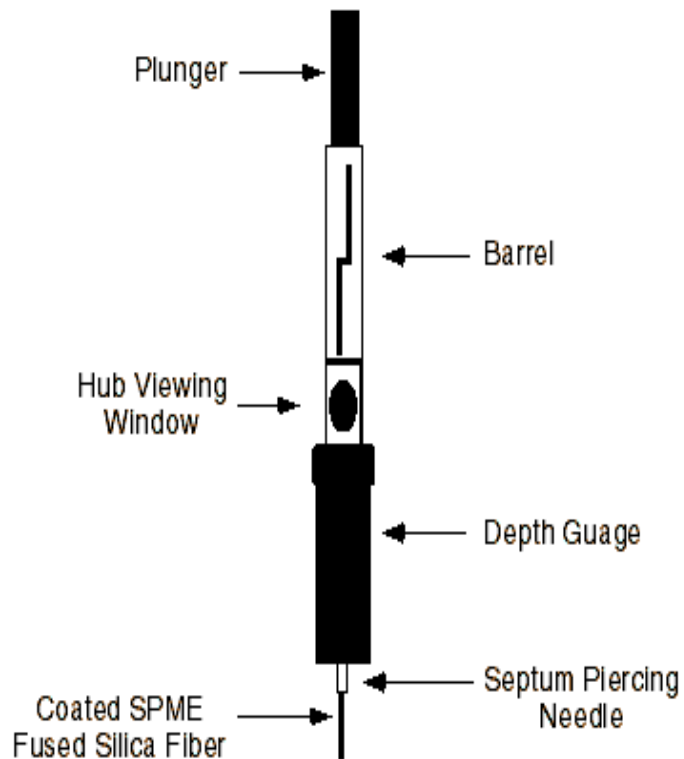
Una vez alcanzado el equilibrio, los compuestos adsorbidos se desorben térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases

La matriz puede ser aire, agua, muestras líquidas, etc.

Alternativamente, también se puede disolver el extracto en un disolvente orgánico para analizarlo por HPLC.

Microextracción en fase sólida (SPME)

Principio Teórico



$$n = \frac{K_{fh} V_f V_s C_o}{K_{fh} V_f + V_s}$$

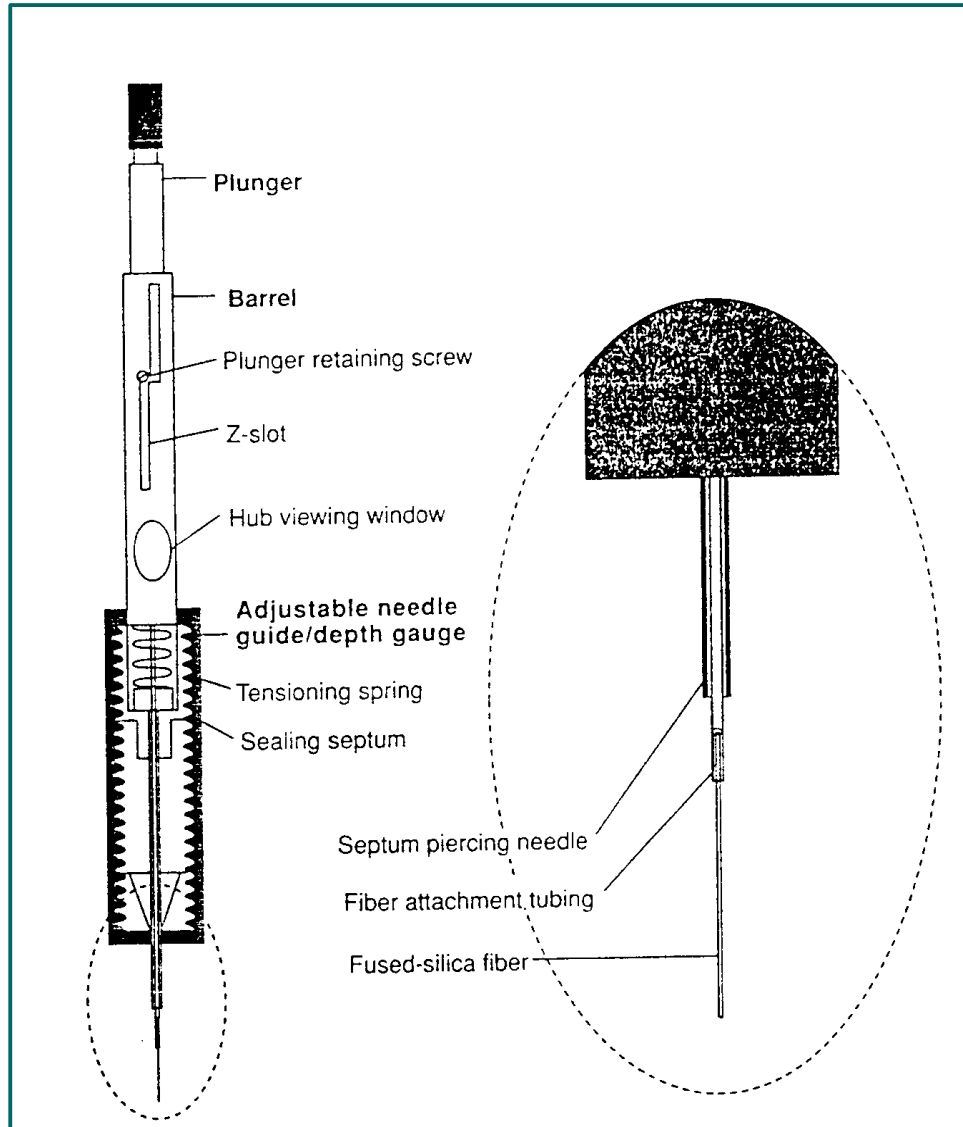
n : masa de analito adsorbida por el recubrimiento

V_f, V_s : Volumen de recubrimiento y de muestra

K : coeficiente de reparto del analito entre el recubrimiento y la muestra; [$K = f(T, \text{fibra})$]

C_o : concentración inicial del analito en la muestra

Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME)



Esquema del soporte de SPME y detalle de la fibra adsorbente.

Incluye un émbolo con una fibra retráctil y una aguja de acero inoxidable. La fibra es de sílice fundida recubierta del adsorbente correspondiente.

Ventajas y desventajas de SPME

- ✍ **Es una técnica rápida y relativamente sencilla**
- ✍ **Existen diferentes fibras adsorbentes disponibles en el mercado que permiten cierta selectividad**
- ✍ **Se pueden acoplar a otras técnicas de separación (GC y HPLC)**
- ✍ **No requiere ningún disolvente**
- ✍ **SPME es una técnica económica (reutilizable)**
- ✍ **Está limitada a muestras líquidas o a compuestos volátiles (espacio de cabeza)**
- ✍ **No permite conservar el extracto para otros análisis**

Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME)

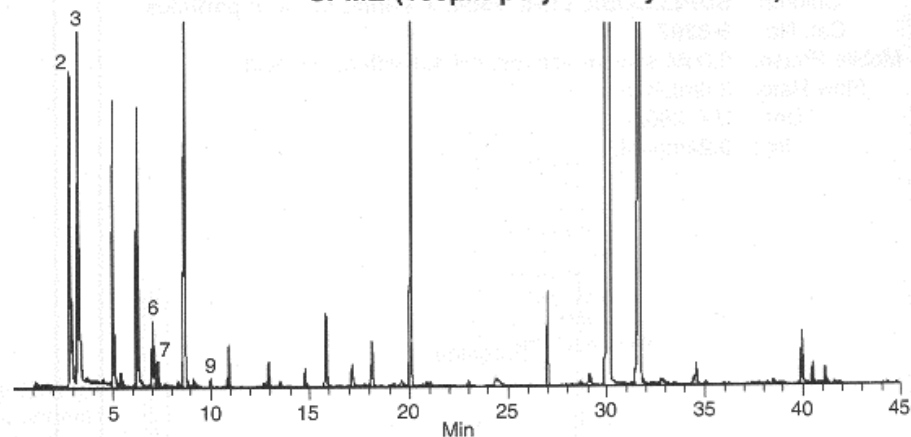
Flavor Compounds in Fruit Juice

Sample: 3mL juice, 0.6g NaCl added
 SPME Fiber: **polydimethylsiloxane, 100µm film**
 Cat. No.: **5-7300-U**
 Extraction: immersion (10 min), with stirring
 Desorption: 3 min
 Column: **Carbowax 20M-type phase, 30m x 0.25mm ID, 1µm film**
 Oven: 50°C (2 min) to 220°C at 4°C/min
 Carrier: helium, 20cm/sec
 Det.: MS (m/z = 35–400)
 Inj.: splitless (closed 2 min), 200°C (1mm ID injector liner)

- | | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| 1. Dichloromethane | 14. Linalool |
| 2. Ethyl butyrate | 15. β-Terpineol |
| 3. Ethyl isovalerate | 16. Butyric acid |
| 4. Limonene | 17. 2-Methylbutyric acid |
| 5. Ethyl hexanoate | 18. α-Terpineol |
| 6. Isoamyl butyrate | 19. Hexanoic acid |
| 7. Hexanyl acetate | 20. cis-Methyl cinnamate |
| 8. cis-3-Hexenyl acetate | 21. 1-(2-Furyl)-2-hydroxyethanone |
| 9. Hexanol | 22. Furanol |
| 10. cis-3-Hexenol | 23. trans-Methyl cinnamate |
| 11. cis-3-Hexenyl butyrate | 24. γ-Decalactone |
| 12. Furfural | 25. Dodecanoic acid |
| 13. Benzaldehyde | 26. (Hydroxymethyl)furfural |

SPME, GC

SPME (100µm polydimethylsiloxane)



Solvent Extraction (dichloromethane)

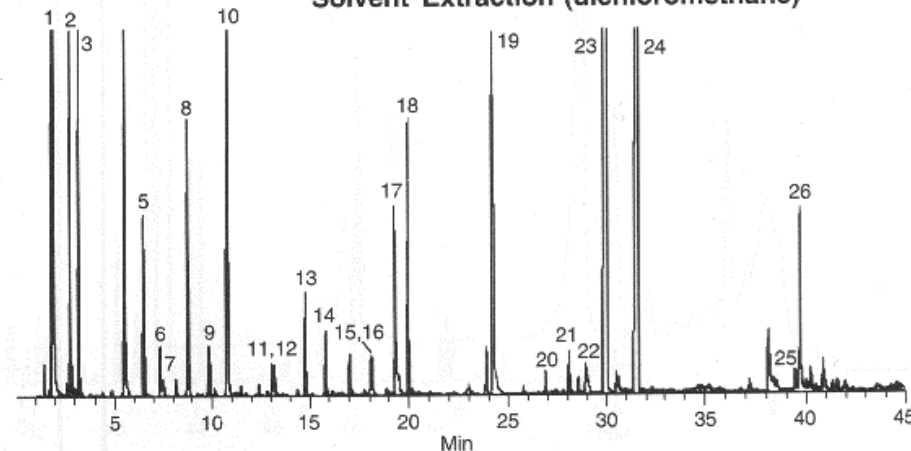


Figure courtesy of Xiaogen Yang and Terry Peppard, Givaudan-Roure Corporation, Clifton, NJ, USA.

Reproduced with permission from the Journal of Agricultural and Food Chemistry. Copyright 1994 American Chemical Society.

794-0865, 0868

Ejemplo de análisis de compuestos volátiles en un zumo de fruta sin usar ningún disolvente tóxico