



# Extracción y preconcentración en preparación de muestras

Edwar Fuentes Pérez

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile



## Bibliografía:

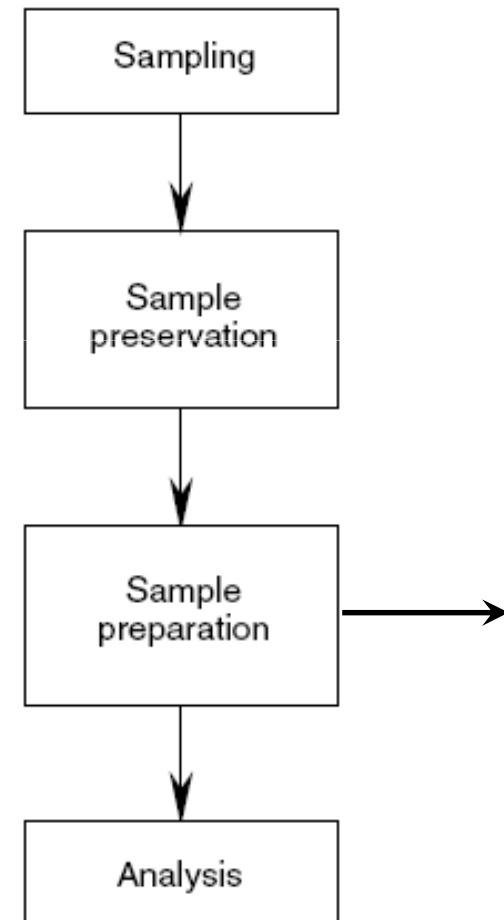
Texto: “Sample preparation techniques in analytical chemistry”  
Editado por Somenath Mitra, Ed Wiley Inter-Science, 2003. Capítulos  
2, 3 y 4.

Review: Lourdes Ramos, “Critical oreview of selected contemporary  
sample preparation techniques”, Journal of Chromatography A,  
artículo en prensa (doi; 10.1016/j.chroma.2011.11.011) .

## El proceso de medida químico (métodos analíticos)

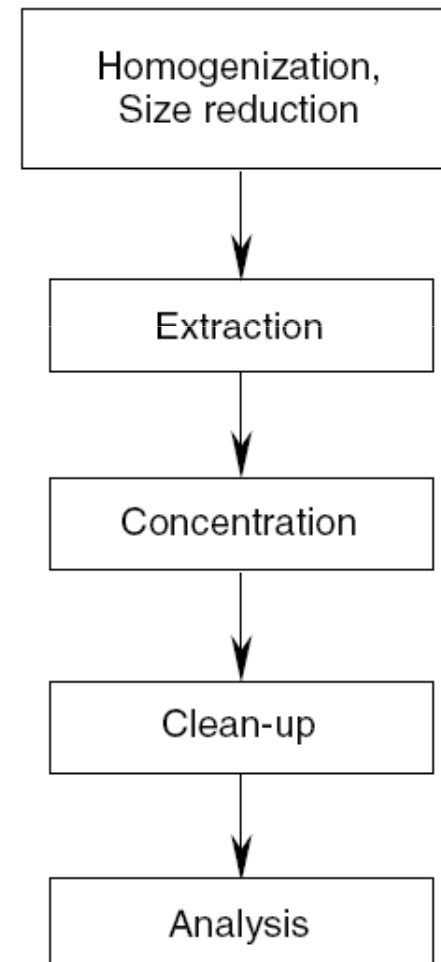
El propósito de un “**estudio analítico**” es obtener información sobre algún objeto o sustancia. La sustancia puede ser sólida, líquida, gaseosa o material biológico. La información obtenida puede ser química o física, estructural o de propiedades superficiales, una secuencia en proteínas o material genético, etc.

¿Cuáles son los pasos comúnmente involucrados en el proceso?



## La preparación de las muestras en un proceso de medida químico

Puede tomar un tiempo considerable dada la complejidad de las muestras y en muchos casos es el **“cuello de botella” de los análisis.**



**Table 1.1. Common Instrumental Methods and the Necessary Sample Preparation Steps Prior to Analysis**

Analytes	Sample Preparation	Instrument <sup>a</sup>
Organics	Extraction, concentration, cleanup, derivatization	GC, HPLC, GC/MS, LC/MS
Volatile organics	Transfer to vapor phase, concentration	GC, GC-MS
Metals	Extraction, concentration, speciation	AA, GFAA, ICP, ICP/MS
Metals	Extraction, derivatization, concentration, speciation	UV-VIS molecular absorption spectrophotometry, ion chromatography
Ions	Extraction, concentration, derivatization	IC, UV-VIS
DNA/RNA	Cell lysis, extraction, PCR	Electrophoresis, UV-VIS, fluorescence
Amino acids, fats, carbohydrates	Extraction, cleanup	GC, HPLC, electrophoresis
Microstructures	Etching, polishing, reactive ion techniques, ion bombardments, etc.	Microscopy, surface spectroscopy

<sup>a</sup>GC, gas chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS, mass spectroscopy; AA, atomic absorption; GFAA, graphite furnace atomic absorption; ICP, inductively coupled plasma; UV-VIS, ultraviolet-visible molecular absorption spectroscopy; IC, ion chromatography.

## 1) Extracción de analitos desde muestras líquidas

Principio: reparto de X entre dos fases no miscibles (fase líquida **a** y fase líquida, sólida o gas **b**)



$$K_D = \frac{[X]_b}{[X]_a}$$

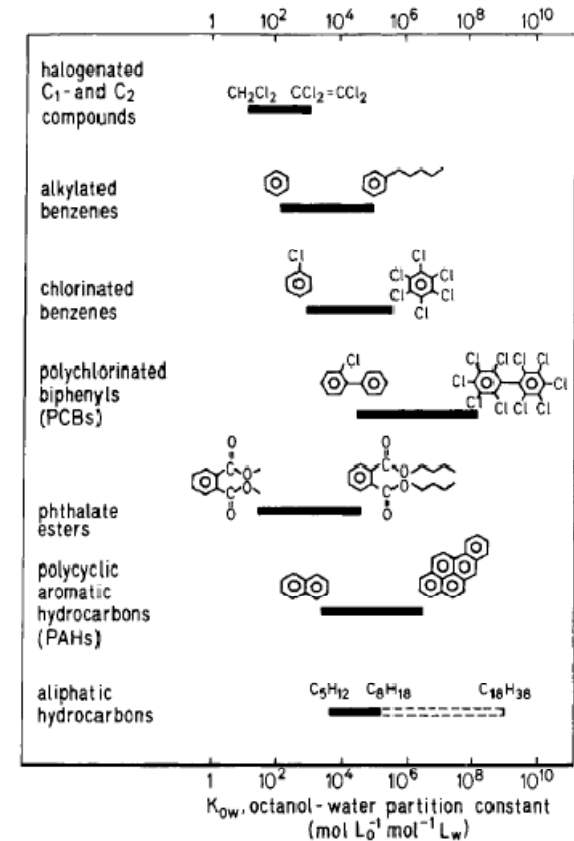
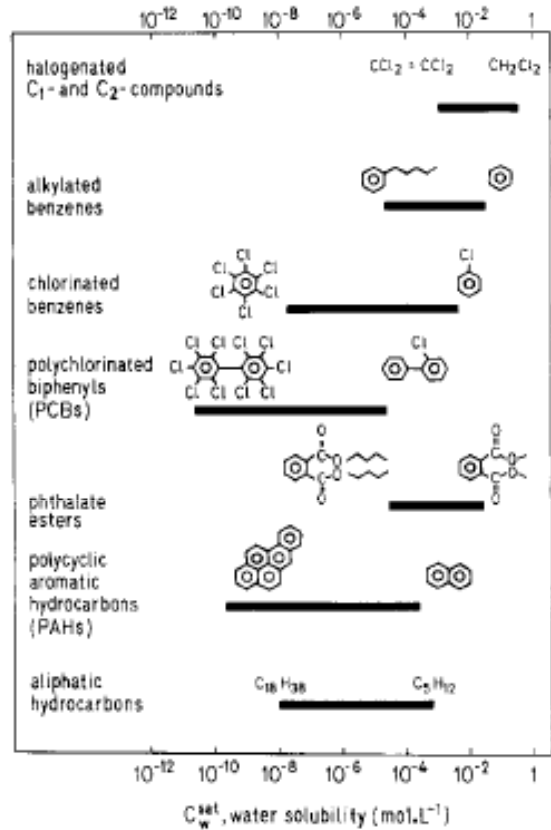
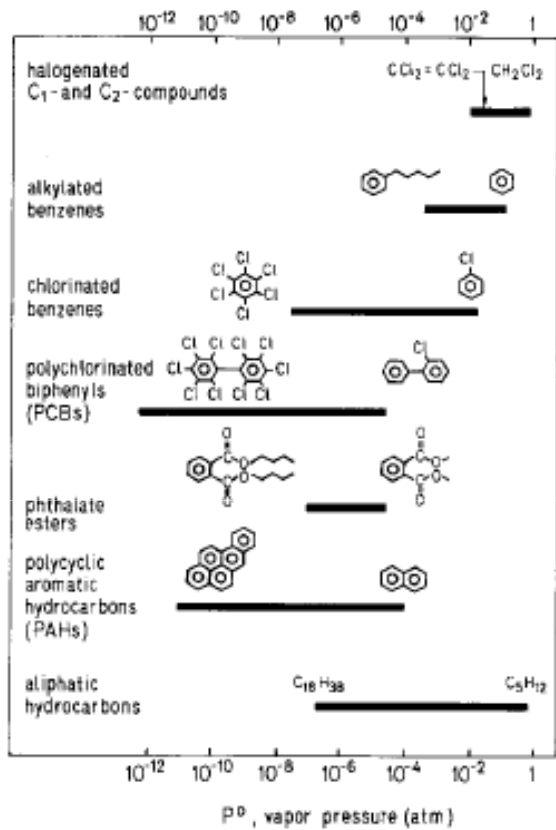
Factores que afectan la eficiencia del reparto de X desde una solución acuosa hacia la fase B (orgánica):

**Presión de vapor (+)**

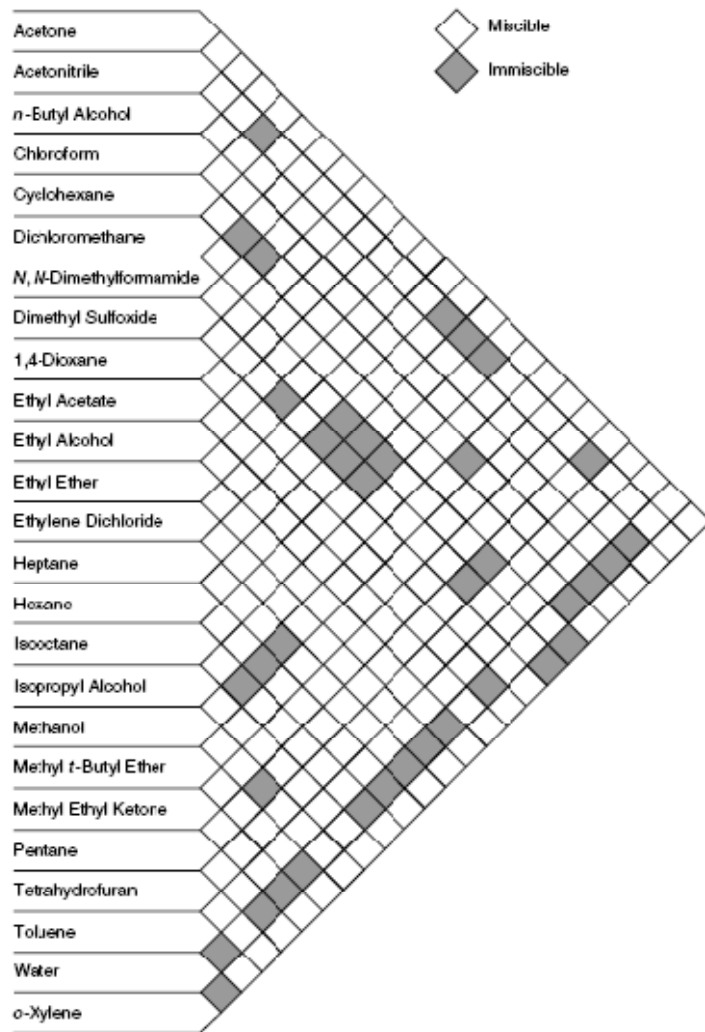
**solubilidad en agua (-)**

**Hidrofobicidad (+)**

**Disociación ácida (función del pH)**



## Extracción líquido-líquido: fases **a** y **b** líquidos no miscibles (LLE)



$$\% Rx = 100 \left[ \frac{K_D (V_E / V_M)}{1 + K_D (V_E / V_M)} \right]$$

$V_E$  = Volumen extractante

$V_M$  = Volumen muestra

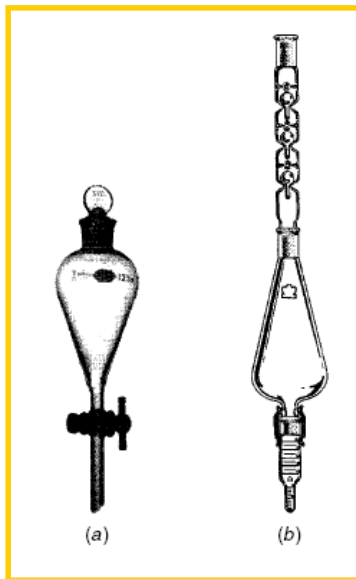
$$\% Rx = 100 \left( 1 - \left[ \frac{1}{1 + K_D (V_E / V_M)} \right]^n \right)$$



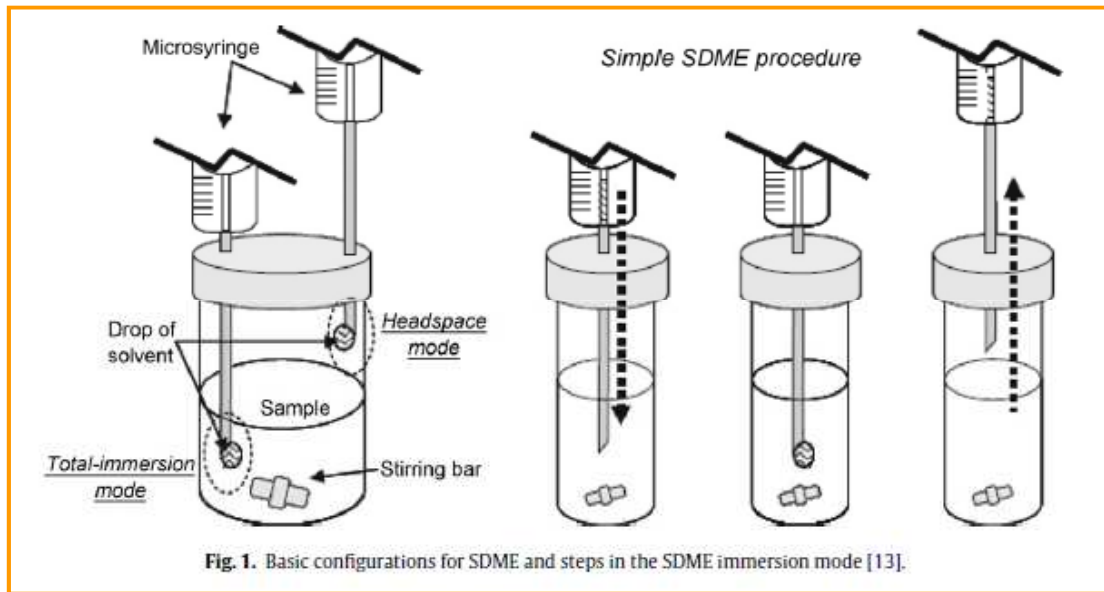
## 1.1) Métodos de extracción propuestos actualmente para muestras líquidas

Método	Fases	Sigla inglés
<b>Extracción líquido – líquido clásica</b> (referencia para muestras líquidas)	L - L	LLE
<b>Extracción L-L en vial</b> (Miniaturización de la ELL clásica) 1 a 2 mL muestra con 0,5 mL solvente orgánico	L-L	In-vial LLE
<b>Técnicas de micro-extracción con solventes</b> * Micro-extracción con gota * Micro-ext con gota desde espacio cabeza * Micro-ext líquido-líquido dispersiva	L-L L-G-L L-L-L	SDME HS-SDME DLLME
<b>Técnicas basadas en “sorción”</b> Extracción en fase sólida (cartuchos de extracción) Micro-ext en fase sólida Micro-ext en fase sólida desde espacio cabeza Extracción por sorción con barra agitada	L – S L-S L-G-L L-S	SPE SPME HS-SPME SBSE
<b>Extracción asistida por microondas (Instrumental)</b>	L – L	MAE / MASE

### 1.1.1) El método clásico



### 1.1.2) Micro-extracción en gota



(C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809).

### 1.1.3) Micro-extracción líquido-líquido dispersiva

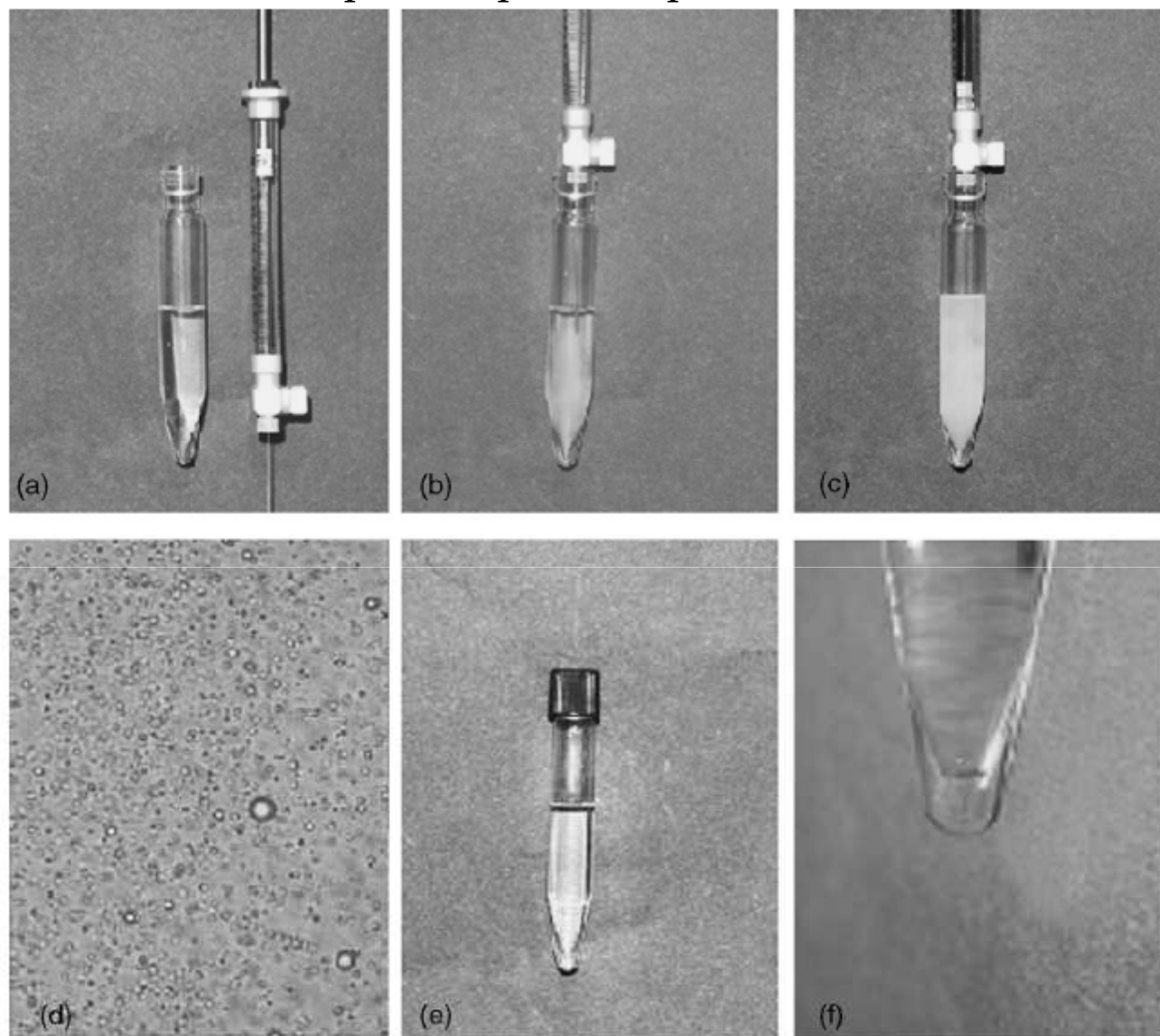
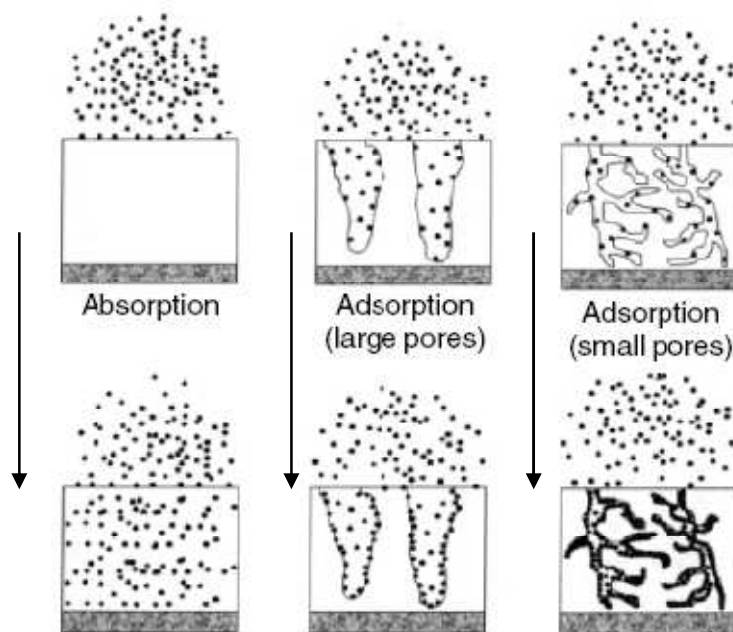


Fig. 1. Photography of different steps in DLLME: (a) before injection of mixture of disperser solvent (acetone) and extraction solvent ( $C_2Cl_4$ ) into sample solution, (b) starting of injection, (c) end of injection, (d) optical microscopic photography, magnitude 1000 (that shows fine particles of  $C_2Cl_4$  in cloudy state), (e) after centrifuging and (f) enlarged view of sedimented phase ( $5.0 \pm 0.2 \mu L$ ).

### 1.1.4) Extracción en fase sólida (fase **a** líquida y **b** sólida) (SPE)

Se produce debido a los fenómenos de **absorción** (3D) y/o **adsorción** (2D). En general se hace referencia a un proceso de “sorción” (sorption)



#### Tipos de Sorbentes:

##### i) Polares:

Sílica, Alumina, silicato de magnesio (Florisil), sílica-aminopropil, sílica-cianopropil, sílica-diol.

##### ii) Apolares:

Sílica-C8, Sílica-C18, carbón grafito

##### iii) Intercambio iónico

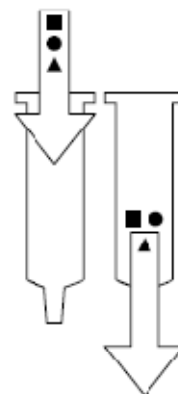
Sílica-sulfonato, Sílica-amina 3aria

# El método



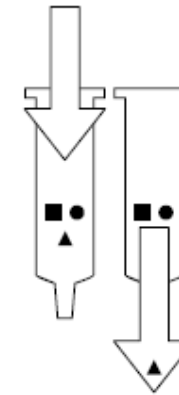
## CONDITIONING

Conditioning the sorbent prior to sample application ensures reproducible retention of the compound of interest (the isolate).



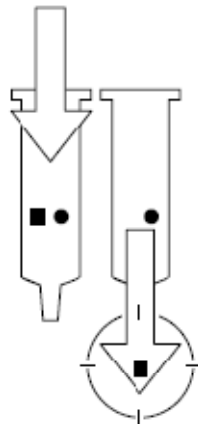
## RETENTION

■ Adsorbed isolate  
● Undesired matrix constituents  
▲ Other undesired matrix components



## RINSE

▲ Rinse the columns to remove undesired matrix components



## ELUTION

● Undesired components remain  
■ Purified and concentrated isolate ready for analysis

Table 2.6. SPE Sorbent–Analyte Interaction Mechanisms

Primary Interaction Mechanism	Sorbents	Energy of Interaction <sup>a</sup> (kcal/mol)
Van der Waals	Octadecyl, octyl, ethyl, phenyl, cyclohexyl, styrene–divinylbenzene, graphitized carbon	1–10
Polar/dipole–dipole	Cyano, silica, alumina Florisil	1–10
Hydrogen bonding	Amino, diol	5–10
Electrostatic	Cation exchange, anion exchange	50–200

### 1.1.5) Micro-extracción en fase sólida (SPME)

Implica la miniaturización de la SPE

Se han utilizado diferentes fases “sorbentes”

└───> Diferentes aproximaciones para este método

SPME

Fase **a** líquida / Fase **b** líquida  
soportada por una fase sólida

Fase **a** líquida / Fase **b** sólida

Supported PME

## SPME mediante fibras recubiertas:

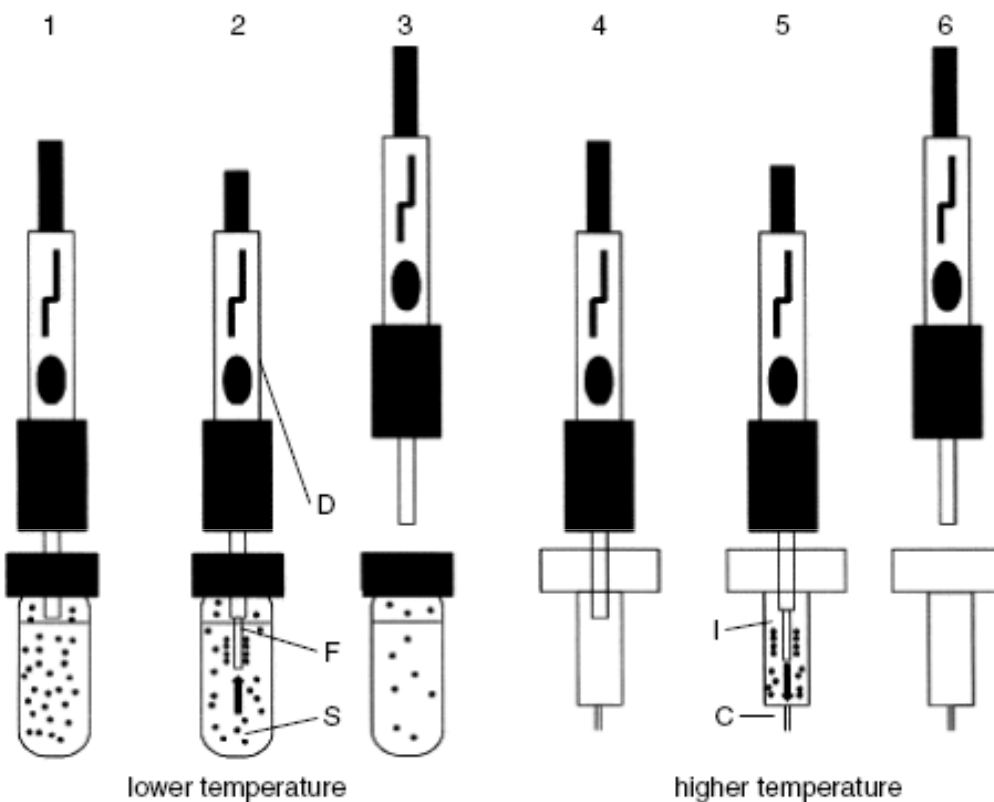


Figure 2.49. Principle of SPME: 1, introduction of syringe needle of the SPME device (D) into the sample vial and close to the sample (S), 2, moving the fiber (F) into the position outside the syringe and into the sample (extraction), 3, moving the fiber back into the syringe needle and subsequent transfer of the device to the GC injector port (1) and capillary head (C), 4, penetration of the septum with syringe needle, 5, moving the fiber into the position outside the syringe (desorption), 6, moving the fiber back into the syringe needle and withdrawing the needle. (Reprinted with permission from Ref. 130. Copyright © 2000 Elsevier Science.)

(S. Mitra, "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", 2003, Cap 2)

**Table 2.7. SPME Fiber Selection Guide**

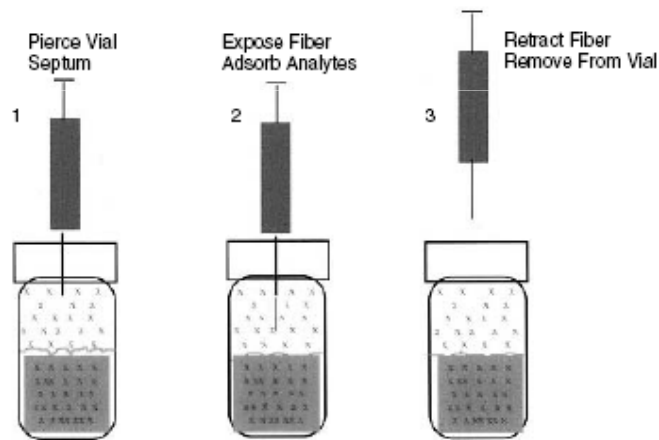
Analyte Class	Fiber Type	Linear Range
Acids (C2–C8)	Carboxen-PDMS	10 ppb–1 ppm
Acids (C2–C15)	CW-DVB	50 ppb–50 ppm
Alcohols (C1–C8)	Carboxen-PDMS	10 ppb–1 ppm
Alcohols (C1–C18)	CW-DVB	50 ppb–75 ppm
	Polyacrylate	100 ppb–100 ppm
Aldehydes (C2–C8)	Carboxen-PDMS	1 ppb–500 ppb
Aldehydes (C3–C14)	100 $\mu$ m PDMS	50 ppb–50 ppm
Amines	PDMS-DVB	50 ppb–50 ppm
Amphetamines	100 $\mu$ m PDMS	100 ppb–100 ppm
	PDMS-DVB	50 ppb–50 ppm
Aromatic amines	PDMS-DVB	5 ppb–1 ppm
Barbiturates	PDMS-DVB	500 ppb–100 ppm
Benzidines	CW-DVB	5 ppb–500 ppb
Benzodiazepines	PDMS-DVB	100 ppb–50 ppm
Esters (C3–C15)	100 $\mu$ m PDMS	5 ppb–10 ppm
Esters (C6–C18)	30 $\mu$ m PDMS	5 ppb–1 ppm
Esters (C12–C30)	7 $\mu$ m PDMS	5 ppb–1 ppm
Ethers (C4–C12)	Carboxen-PDMS	1 ppb–500 ppb
Explosives (nitroaromatics)	PDMS-DVB	1 ppb–1 ppm
Hydrocarbons (C2–C10)	Carboxen-PDMS	10 ppb–10 ppm
Hydrocarbons (C5–C20)	100 $\mu$ m PDMS	500 ppt–1 ppb
Hydrocarbons (C10–C30)	30 $\mu$ m PDMS	100 ppt–500 ppb
Hydrocarbons (C20–C40+)	7 $\mu$ m PDMS	5 ppb–500 ppb
Ketones (C3–C9)	Carboxen-PDMS	5 ppb–1 ppm
Ketones (C5–C12)	100 $\mu$ m PDMS	5 ppb–10 ppm
Nitrosamines	PDMS-DVB	1 ppb–200 ppb
PAHs	100 $\mu$ m PDMS	500 ppt–1 ppm
	30 $\mu$ m PDMS	100 ppt–500 ppb
	7 $\mu$ m PDMS	500 ppt–500 ppb

Source: Reprinted from Ref. 135. Copyright © (1999) Marcel Dekker, Inc.

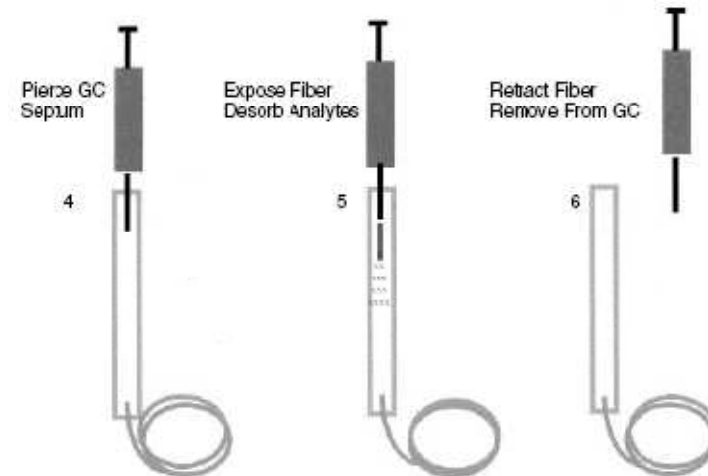


### 1.1.6) Microextracción en fase sólida desde el espacio de cabeza (HS-SPME)

Similar a la técnica anterior, pero aquí en lugar de recoger la fase gaseosa del espacio de cabeza, se realiza una “sorción” de los analitos presentes en este, sobre una fibra recubierta con un “sorbente”.



Etapa de extracción y pre-concentración  
(equilibrios L-G y G-L)



Etapa de desorción y determinación  
cromatográfica

### 1.1.7) Extracción por sorción en barra agitada (Stir Bar Sorptive Extraction)

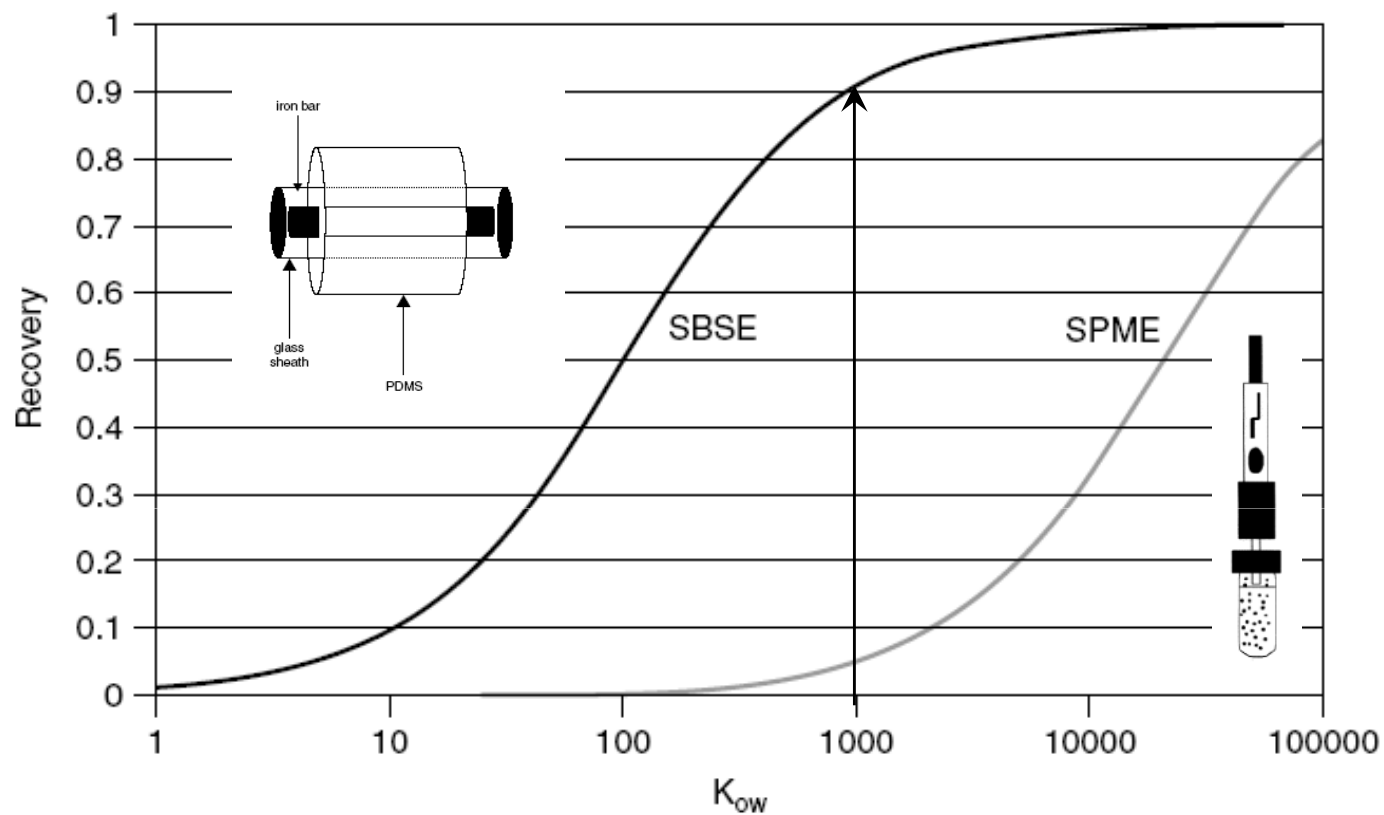
**Principio:** Una barra de agitación es recubierta con un sorbente (PDMS) y sumergida en una solución acuosa para extraer los analitos desde esta.

**Ventajas:** mayor volumen de sorbente que SPME (100 uL v/s 0,5 uL) mejora eficiencia de extracción para compuestos menos hidrofóbicos

$$K_D = \frac{[X]_B}{[X]_A} = K_{PDMS/W} \approx K_{OW}$$

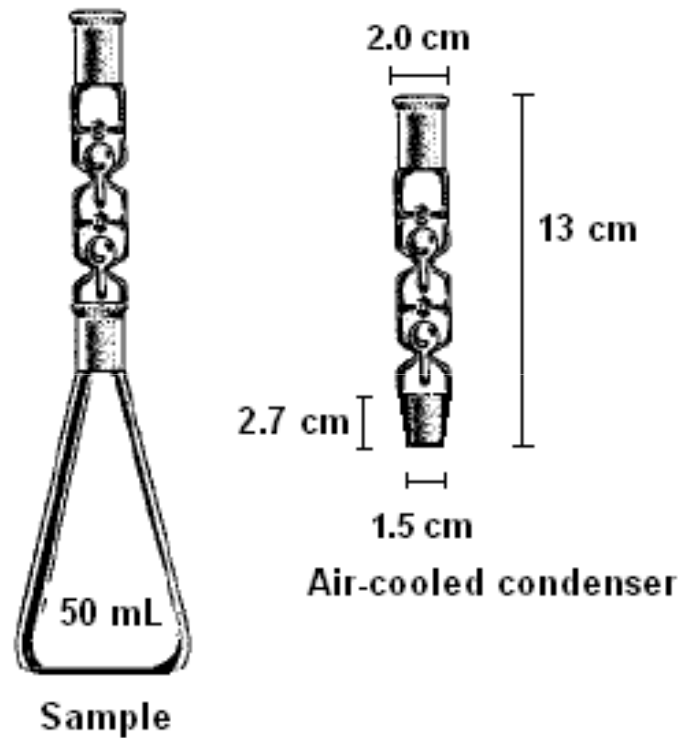
$$K_{OW} \approx K_{PDMS/W} = \frac{[X]_{PDMS}}{[X]_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}}$$

$$Rec = 1 - \left(1 + K_{OW} \times \frac{V_{PDMS}}{V_W}\right)^{-1}$$



**Figure 2.52.** Theoretical recovery of analytes in SBSE and SPME from a 10-mL water sample as a function of their octanol–water partitioning constant. Volume of PDMS on SPME fiber: 0.5  $\mu\text{L}$ ; volume of PDMS on SBSE stir bar: 100  $\mu\text{L}$ . (Reprinted with permission from Ref. 141. Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Inc.)

### 1.1.8) Extracción líquido-líquido asistida por microondas sistema abierto



¿Qué parámetros afectan la eficiencia de la extracción en MAE?

Potencia aplicada

Temperatura de extracción

Tiempo de extracción

Tipo de solvente usado

Volumen de solvente usado

Masa de muestra

## 2) Extracción de analitos desde muestras sólidas

Principio: reparto de X entre una fase sólida **a** y fase líquida o fluido supercrítico **b**)



$$K_D = \frac{[X]_b}{[X]_a}$$

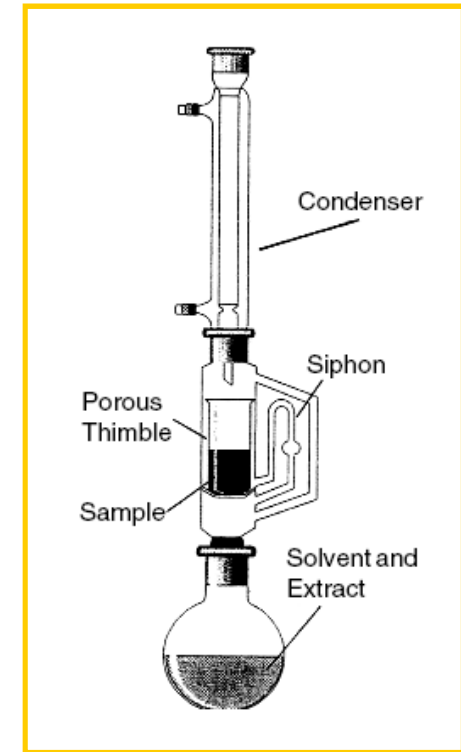
## 2.1) Métodos de extracción propuestos actualmente para muestras sólidas

<b>Método</b>	<b>Fases</b>	<b>Sigla inglés</b>
<b>Extracción Soxhlet</b> (clásica de referencia para muestras sólidas)	S - L	SOX
<b>Dispersión de matriz en fase sólida</b>	S - L	SPMD
<b>Extracción con fluidos supercríticos</b> (Instrumental, uso de CO <sub>2</sub> )	S - FSupC	SFE
<b>Extracción por solventes acelerada</b> (Instrumental alta presión y/o temperatura, condiciones subcríticas)	S - FSubC	ASE
<b>Extracción asistida por microondas</b> (Instrumental)	S - L	MAE / MASE
<b>Extracción asistida por ultrasonido</b> (Instrumental)	S - L	USE

## 2.1.1) Extracción Soxhlet

Método robusto, exhaustivo, con pocos parámetros que pueden afectar la eficiencia de extracción. Se considera como método de referencia.

Desventajas: lento, con consumo de solvente relativamente alto (50 a 150 mL por muestra). Cada vez menos usado en rutina.



## 2.1.2) Dispersión de matriz en fase sólida

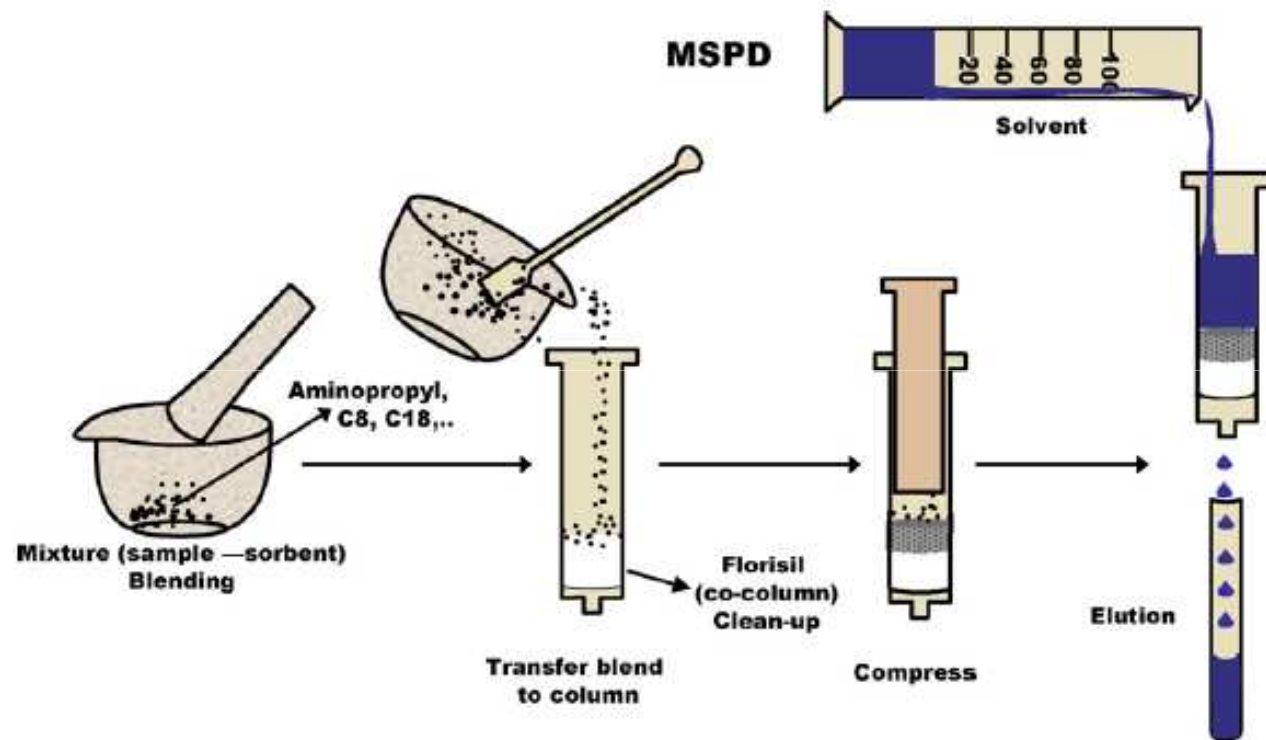
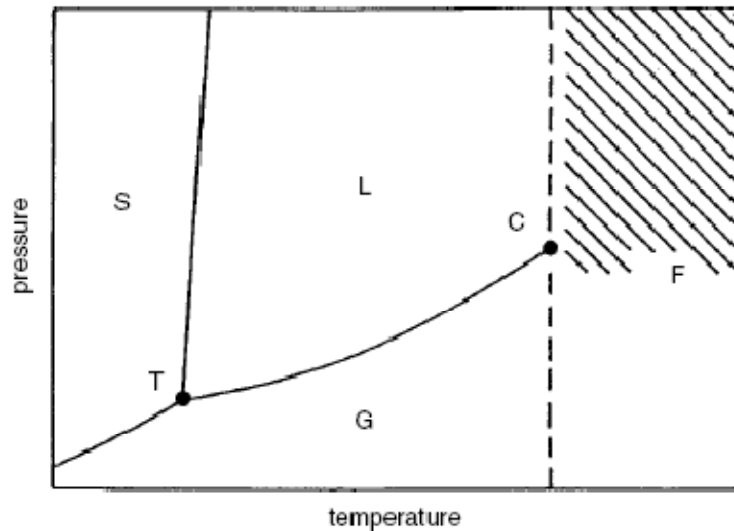


Fig. 4. Schematic procedure of matrix solid-phase dispersion (MSPD).



### 2.1.3) Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Se aprovechan las características particulares que poseen los fluidos bajo condiciones supercríticas para la extracción de los analitos desde matrices sólidas particularmente.



La curva **T-C** es la interfase entre el estado gaseoso y el líquido. Cada punto sobre esta curva indica cierta temperatura y presión a las que el gas puede licuarse. Más allá del **punto C**, el gas no se licua al incrementar la presión, sino que se comprime en un fluido supercrítico.

**Densidad similar al líquido y viscosidad similar al gas.**

**Más común  $\text{CO}_2$**

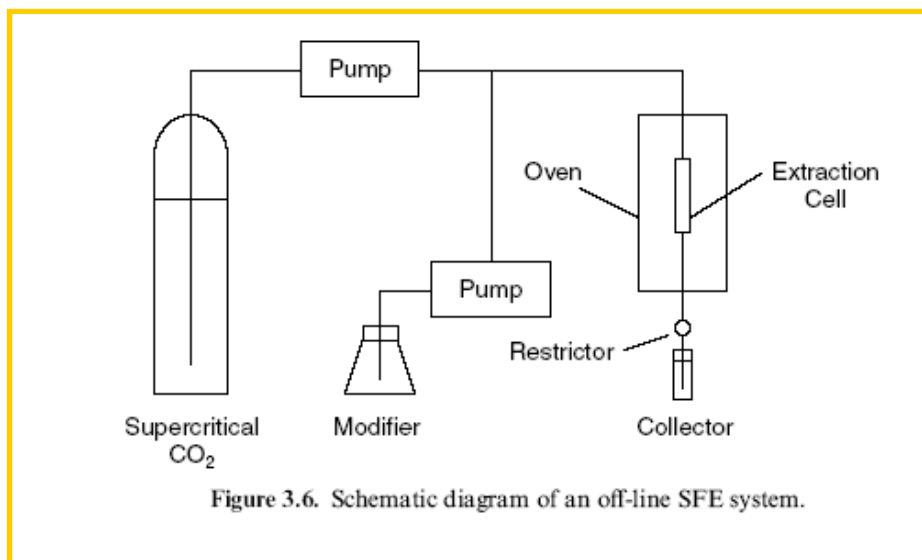


Table 3.5. EPA-Recommended SFE Methods for Environmental Samples

	Total Recoverable Petroleum Hydrocarbons	Volatile PAHs	Less Volatile PAHs	Organochlorine Pesticides	PCBs
Extraction fluid	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O (95:1:4 v/v/v) <sup>a</sup>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
Pressure (psi)	6100	1750	4900	4330	4417
Density (g/mL)	0.785	0.3	0.63	0.87	0.75
Temperature (°C)	80	80	120	50	80
Static equilibration time (min)	0	10	10	20	10
Dynamic extraction time (min)	30	10	30	30	40
Flow rate (mL/min)	1.1-1.5	2.0	4.0	1.0	2.5

<sup>a</sup>For HPLC determination only, CO<sub>2</sub>-methanol-dichloromethane (95:1:4 v/v/v) should be used for GC.

### Desventaja:

Depende de la constitución de la matriz. El CO<sub>2</sub> supercrítico es apolar, requiere de modificadores para extraer compuestos polares (metanol, acetonitrilo).

## 2.1.4) Extracción con solventes acelerada (ASE)

También se le conoce como extracción con fluidos presurizados (PFE). Utiliza solventes convencionales a elevada temperatura (100 a 180 °C) y presión (1500 a 2000 psi) para incrementar la extracción de los analitos desde la muestra.

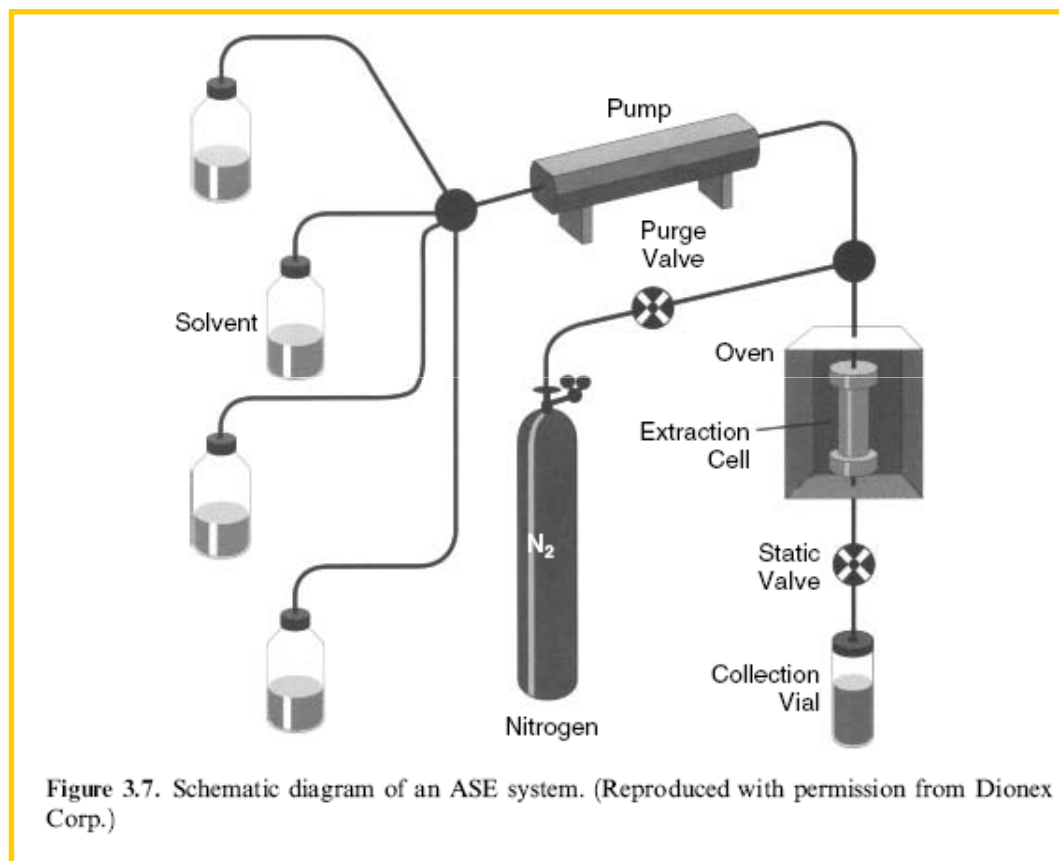
Se ideó como alternativa a SFE ya que no requiere de modificadores. Los resultados publicados con uso de este método han mostrado muy buena eficiencia de extracción, mejorando incluso las prestaciones de SFE.

### ¿Cómo actúa?

Bajo alta presión se **incrementa el punto de ebullición** del solvente y la **extracción** se realiza **a mayor temperatura**.

A alta **temperatura se incrementa la solubilidad** de los analitos y la **transferencia de masa**. **Disminuye la viscosidad y la tensión superficial** del solvente.

Junto a ello la **alta presión permite que el solvente penetre en los intersticios** de la muestra, facilita la extracción de analitos atrapados en los poros.



(S. Mitra, "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", 2003, Cap 3)

## 2.1.5) Extracción asistida por microondas (MAE)

El primer reporte sobre la extracción de compuestos orgánicos (pesticidas) desde matrices sólidas data de 1986 (Ganzler y col.). Posteriormente gran incremento en investigaciones sobre su uso.

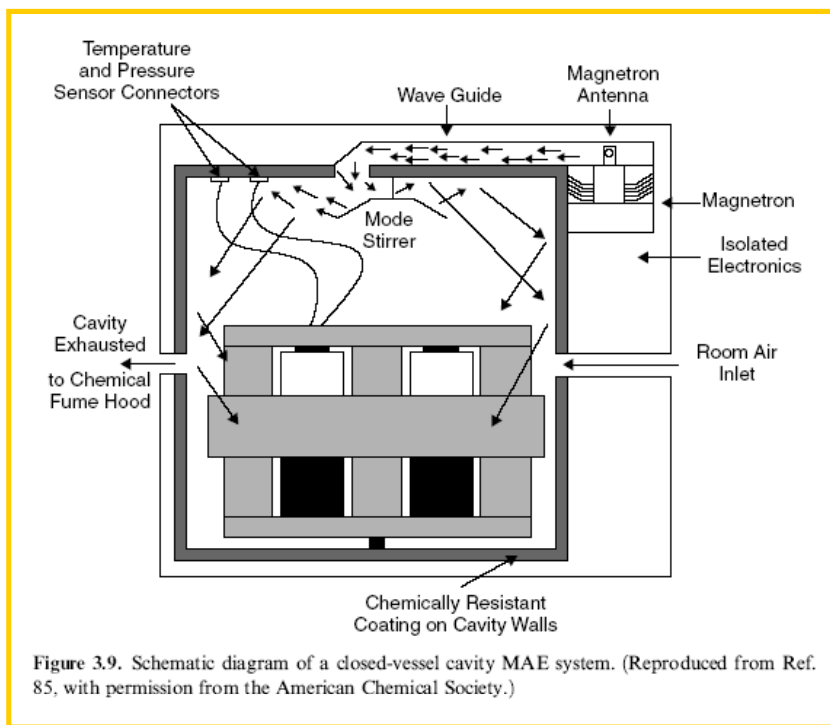
### ¿Cómo actúa?

Microondas intervalo frecuencia 0,3 a 300 GHz (entre radio frecuencia e infrarojo).

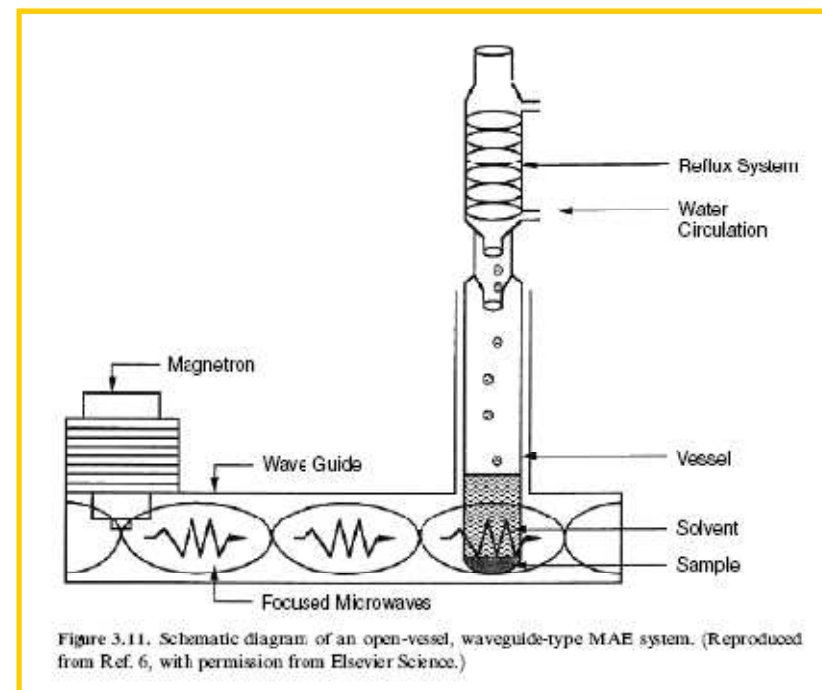
Los hornos de microondas para uso en laboratorio operan a 2,45 o 0,9 GHz (los domésticos sólo a 2,45 GHz).

Al aplicar las microondas a moléculas polares en estado líquido o sólido, estas rotan por reorientación de los dipolos bajo la radiación ( $4,9 \times 10^9$  veces por segundo). La rotación no es libre sino que hay fricción con el entorno, lo cual genera calor.

Esto genera las condiciones adecuadas para que se produzca la extracción de los analitos desde la matriz hacia el solvente.

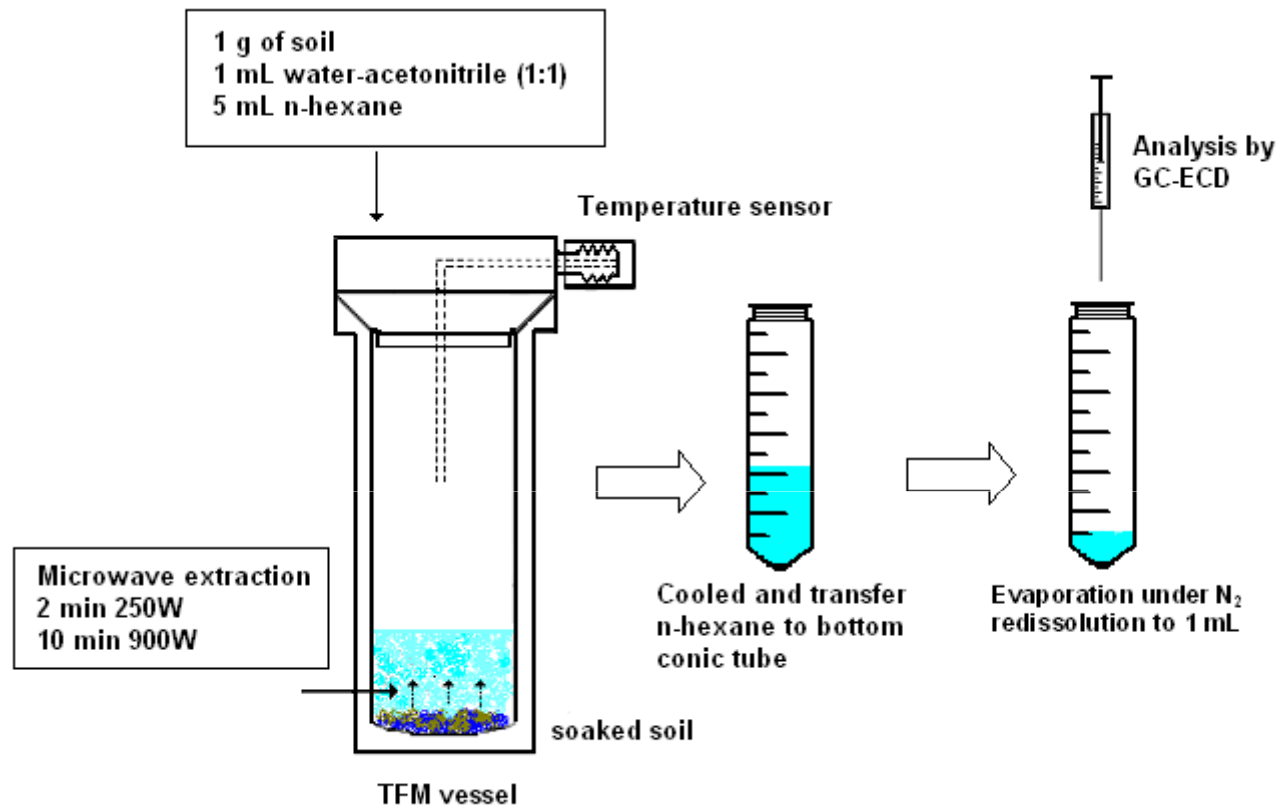


## MAE sistema cerrado



## MAE sistema abierto

# MAE sistema cerrado

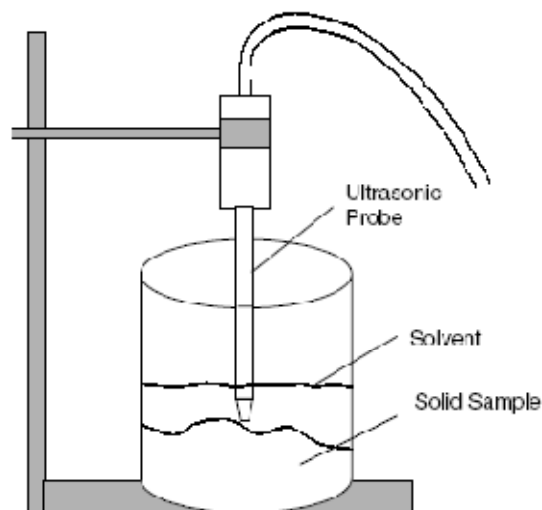


## 2.1.6) Extracción asistida por ultrasonido (USE)

También conocida como “sonicación”, utiliza las vibraciones ultrasónicas para facilitar el contacto íntimo entre la muestra y el solvente de extracción.

Es rápida, con bajo consumo de solvente, pero en ocasiones con una baja eficiencia de extracción y con posibilidades de descomponer algunos analitos.

Se utilizan dos modalidades: Con sonda o con baño de ultrasonido





**Table 3.15. Advantages and Disadvantages of Various Extraction Techniques**

Technique	Advantages	Disadvantages
Soxhlet extraction	Not matrix dependent Very inexpensive equipment Unattended operation Rugged, benchmark method Filtration not required	Slow extraction (up to 24–48 hrs) Large amount of solvent (300–500 mL) Mandatory evaporation of extract
Automated Soxhlet extraction	Not matrix dependent Inexpensive equipment Less solvent (50 mL) Evaporation integrated Filtration not required	Relatively slow extraction (2 hours)
Ultrasonic extraction	Not matrix dependent Relatively inexpensive equipment Fast extraction (10–45 min) Large amount of sample (2–30 g)	Large amount of solvent (100–300 mL) Mandatory evaporation of extract Extraction efficiency not as high Labor intensive Filtration required
Supercritical fluid extraction (SFE)	Fast extraction (30–75 min) Minimal solvent use (5–10 mL) CO <sub>2</sub> is nontoxic, nonflammable, environmentally friendly Controlled selectivity Filtration not required Evaporation not needed	Matrix dependent Small sample size (2–10 g) Expensive equipment Limited applicability
Accelerated solvent extraction (ASE)	Fast extraction (12–18 min) Small amount of solvent (15–40 mL) Large amount of sample (up to 100 g) Automated Easy to use Filtration not required	Expensive equipment Cleanup necessary
Microwave-assisted extraction (MAE)	Fast extraction (20–30 min) High sample throughput Small amount of solvent (30 mL) Large amount of sample (2–20 g)	Polar solvents needed Cleanup mandatory Filtration required Moderately expensive equipment Degradation and chemical reaction possible

## Determinación de analitos en las muestras (extractos)

Método	Sigla inglés
Cromatografía de gases con diferentes detectores - Captura de electrones (halogenados) - Fotométrico de llama (fosforados y azufrados) - Nitrógeno / Fósforo - Ionización de llama - Espectrómetro de masas (confirmativo)	GC GC-ECD GC-FPD GC-NPD GC-FID GC-MS
Cromatografía líquida de alta resolución - Arreglo de diodos - Espectrómetro de masa (confirmativo)	HPLC HPLC-DAD HPLC-MS
Cromatografía en capa fina (Método de "screening")	TLC
Electroforesis capilar Electro cromatografía capilar	EC CEC
Espectroscopía de fluorescencia molecular	FS