

PREPARO DE AMOSTRAS COMPLEXAS UTILIZANDO SISTEMA AUTOMATIZADO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Adriana A. Bonatti¹; Isabela de Fátima Zappa Costa¹; Álvaro J. Santos-Neto¹

¹ Grupo de Cromatografia, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP

Palavras-Chave: SPE offline, coletor de frações, múltiplos analitos.

Introdução

O efeito matriz é caracterizado quando há alteração na quantificação do analito devido a interferentes da matriz.¹ Para análise de amostras complexas, como sangue, urina, plasma ou tecidos, é essencial um bom preparo de amostra para minimizar esse efeito. Existem diversas técnicas de preparo e limpeza de amostras, sendo uma das mais utilizadas para amostras biológicas a extração em fase sólida (SPE). Esta consiste em uma fase extratora sólida, uma amostra, geralmente líquida, e uma ou mais soluções que serão responsáveis pelas etapas da limpeza e eluição dos analitos.^{2,3}

A primeira etapa compreende o condicionamento da fase sólida, tornando os sítios de ligação ativos e retirando quaisquer sujidades que possam estar presentes. Em seguida, vem a etapa de carregamento, momento em que a amostra é aplicada ou injetada. É possível que alguns interferentes sejam retirados nessa etapa pela passagem do solvente de carregamento, porém a maior parte dos compostos indesejados são retirados na etapa seguinte, de limpeza. Idealmente, nessa etapa, se mantêm ligados à fase extratora os analitos e os interferentes que têm grande interação com a fase extratora. Em seguida, durante a etapa de eluição, os analitos são retirados da fase sólida com a menor quantidade possível dos interferentes ainda retidos. Caso o cartucho ou a coluna seja reutilizado, na etapa seguinte ocorre a limpeza e o condicionamento, voltando-se ao início do ciclo.⁴

A SPE pode ocorrer de forma manual ou automatizada, que pode ser subdivida em *online* e *offline*. Na forma manual, todas as etapas são realizadas por um analista. Essa forma admite mais variações, já que pode ocorrer diferença em parâmetros importante para essa técnica. Essas variações podem atrapalhar a reprodutibilidade da limpeza entre amostras, prejudicando a avaliação dos resultados. Ainda, nessa forma de SPE, dificilmente a fase extratora é reaproveitada.^{4,5}

A forma automatizada permite maior controle dos parâmetros de extração, principalmente se for utilizada uma coluna como suporte da fase extratora. Nesse último caso, a vazão, bem como a proporção e o volume de solvente, pode ser controlada por uma bomba como as de HPLC, fornecendo uma grande precisão e, portanto, reprodutibilidade ao preparo de amostra. Ainda, a fase extratora pode ser limpa e reaproveitada, podendo ser utilizado o fluxo invertido (*backflush*) para tal, se necessário.⁵

A extração *offline* é realizada separadamente da corrida analítica, podendo ter etapas entre uma e outra, como evaporação e troca de solventes. Ainda, a forma *offline* pode utilizar dois equipamentos distintos, permitindo a separação do tempo total do método em duas partes.² Dessa forma, caso a quantificação seja feita em um equipamento que seja bastante requisitado,

a realização da etapa de extração em um equipamento com maior disponibilidade permite economizar tempo e beneficiar o laboratório.

Um desafio que vem sendo enfrentado é o de extrair dois ou mais analitos com características diferentes, como é bastante comum no caso de drogas/fármacos e seus metabólitos.⁶ Para isso, podem ser utilizadas fases combinadas em uma mesma coluna, chamada de SPE de fase mista.⁷

A utilização de coluna de SPE com posterior análise em HPLC (UV, MS, MS/MS, etc) é bastante usual. Porém, para o método *offline*, ainda é comum que as frações de eluato sejam coletadas manualmente. Essa coleta manual é dependente do analista, que, no momento que o analito passa pelo detector, insere o tubo de saída em um frasco coletor e, em seguida, volta ao descarte. Dessa forma, é possível que a concentração de amostra coletada não seja sempre igual para uma concentração conhecida injetada, já que pode ocorrer de ser coletado mais solvente limpo (sem analito), diminuindo a concentração, ou de ser coletado menos analito, cortando o pico, por exemplo. A automatização dessa etapa utilizando um coletor de frações permite uma precisão maior das análises, além de permitir que essas sejam feitas de forma mais independente, possibilitando a análise de maior número de amostra em menos tempo.

Assim, esse trabalho visa apresentar o desenvolvimento e a otimização de método de extração por SPE de fase mista com coleta de frações do extrato de amostras de plasma para que o tempo e a manipulação de amostra necessários para as análises sejam menores e mais simples, estudando as interações entre as diferentes fases extratoras e os analitos de interesse, e combinações de fases extratoras. Para esse trabalho, os analitos foram cafeína, paraxantina, teofilina, teobromina, epinefrina, norepinefrina, β -alanina, carnosina e adenosina.

Material e Métodos

Para o preparo de amostra, foram utilizadas duas fases extratoras com mecanismos de retenção diferentes (Strata-X RP e CW). Uma mistura 1:1 em massa das duas fases foi empacotada em um *hardware* de coluna cromatográfica de 1,0 x 50 mm utilizando uma bomba de HPLC Shimadzu (LC-20AD). As fases móveis utilizadas foram água com formiato de amônio 10 mmol.L⁻¹ pH 4 e metanol. O sistema cromatográfico Shimadzu utilizado conta com duas bombas do modelo já mencionado, *degasser* DGU-20As, auto injetor SIL-20A, forno CTO-20A, detector UV-Vis SPD-20A, controladora CBM-20A. Ainda, o sistema conta com válvula Cheminert C2H-2030UMHA (10 vias) e o software *LabSolutions*.

Os testes foram realizados com plasma fortificados com cafeína, paraxantina, teofilina, teobromina, β -alanina, carnosina e adenosina a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e epinefrina e norepinefrina a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na corrida cromatográfica programada, estão compreendidas as etapas de condicionamento da fase extratora, limpeza e eluição em *straight-flush* e recuperação da fase extratora em *backflush*, totalizando 8 minutos. Os comprimentos de onda utilizados foram 275 nm e 210 nm.

Para o método analítico da cafeína e xantinas, foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico com a coluna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,7 μm , 2,1 x 100 mm (Agilent). As fases móveis foram água com formiato de amônio 5 mmol.L⁻¹ e metanol em um fluxo de 0,30 mL.min⁻¹. O comprimento de onda utilizado foi 275 nm e o método se inicia

isocrático com 12% de metanol por 5 minutos. Então, a proporção é aumentada para 60% de metanol, que é mantida até 8 minutos, quando é retornada para a condição inicial, finalizando em 15 minutos.

Resultados e Discussão

Foram testadas diferentes fases extratoras e proporções de mistura. Devido à natureza dos analitos a serem determinados, não foi possível obter retenção em uma única fase para todos. Alguns, como a cafeína e seus metabólitos, por terem características relativamente menos polares, podem ser retidos em fases de modo reverso, como Strata-X RP e HLB Oasis. Porém, a β -alanina é uma molécula pequena e facilmente ionizada e, portanto, não apresenta retenção nos mecanismos de hidrofobicidade/lipofilicidade balanceada dessas fases. Assim, para se obter retenção desta última, foi requerido o uso de fase de troca catiônica, Strata-X CW, utilizando tampão para manter a ionização das moléculas e da fase extratora.

Baseado nos pKas dos analitos, foi mantido o pH próximo de 4, que mantém a ionização da β -alanina, carnosina, epinefrina e norepinefrina, mantendo a cafeína, seus metabólitos e a adenosina eletricamente neutros. Assim, para obter retenção para todos os analitos foi feita uma mistura de fase extratora Strata-X RP e Strata-X CW em proporção 1:1 em massa e a coluna foi empacotada com essa mistura.

Foram testadas colunas de 2,1 x 50 mm e 1,0 x 50 mm, sendo a de maior dimensão empacotada manualmente e a segunda com o auxílio de uma bomba de HPLC. O método cromatográfico para a extração foi desenvolvido utilizando uma válvula de 10 vias, o que possibilitou a limpeza da coluna extratora por *backflush*. O método otimizado resultante está representado na tabela 1.

Tabela 1 - Método cromatográfico de extração de plasma utilizando coluna de 1,0 x 50 mm com formiato de amônio 10 mmol.L⁻¹ (solvente A) e metanol (solvente B) com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹

Etapa da extração	Tempo	Proporção de B	Sentido do fluxo
Carregamento e limpeza	0,00 - 1,20	0%	<i>Straightflush</i>
Eluição	1,21 – 4,50	75%	<i>Straightflush</i>
Limpeza	4,51 – 6,50	100%	<i>Backflush</i>
Recondicionamento	6,51 – 8,00	0%	<i>straightflush</i>

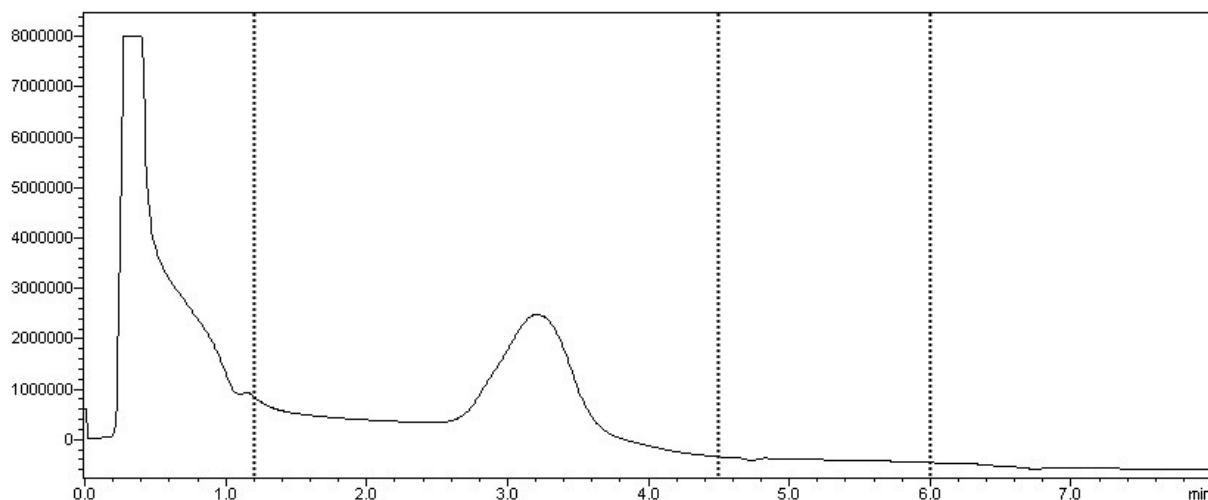


Figura 1 – Cromatograma a 210 nm representativo de uma extração de plasma fortificado com os analitos estudados, com marcações em cada uma das etapas do processo.

A extração feita de forma automatizada permite que se use pequena quantidade de amostra, sendo utilizado 10 μ L de plasma nesse método. Além disso, utiliza-se pouca fase extratora (aproximadamente 60 mg) e esta pode ser reutilizada, tendo até o momento mais de 50 injeções sem necessidade de troca.

A coleta de frações automatizada, esquematizada na figura 2, permite que seja feita uma programação de extrações em sequência sem que seja necessário manipulação pelo analista. Assim, o tempo total necessário para diversas análises é diminuído, reduzindo o custo de equipamento e de analista. Para automatizar o processo de coleta de frações, utilizando um Arduino, no início do pico do analito registrado pelo detector, comuta-se a posição de uma válvula de três vias. A válvula tem sua entrada conectada ao detector e suas duas saídas comutáveis: uma direcionada ao descarte e a outra ao frasco de coleta do carrossel. Inicialmente, o fluxo segue para o descarte (Fig.2-A); ao identificar o início do pico, a válvula é comutada para redirecionar o fluxo ao frasco de coleta (Fig.2-B). Quando o pico termina de ser coletado, a válvula é comutada novamente, voltando a direcionar o fluxo para o descarte, enquanto o carrossel é girado, indo até o próximo frasco coletor (Fig.2-C).

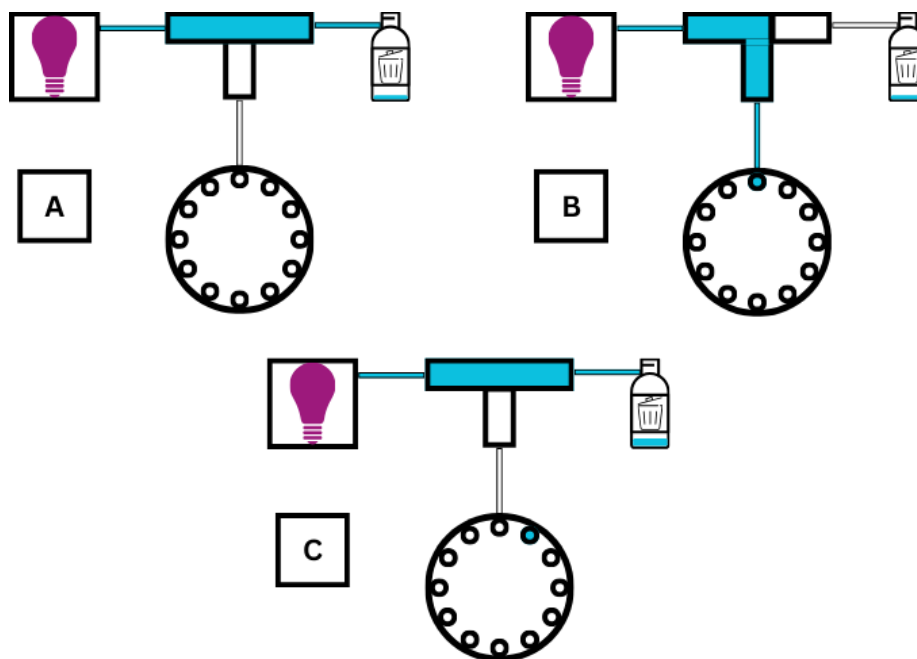


Figura 2 – Esquema representativo do coletor de frações, em que a saída do detector está conectada ao descarte na posição A, ao carrossel na posição B e ao descarte novamente na posição C.

Após a coleta das frações, essas são secas a 65° C por 55 min sob evaporação em centrífuga a vácuo e em seguida ressuspensas em água:metanol (90:10). As amostras são então analisadas utilizando o método analítico já descrito.

Conclusões

Esse trabalho mostrou que a extração em fase sólida automatizada utilizando uma coluna e um sistema cromatográfico foi bastante eficiente para a limpeza das amostras. O empacotamento de colunas com diferentes fases extratoras teve resultado satisfatório, sendo possível extrair 9 analitos com características diferentes em um método e uma corrida. Além disso, foi possível a programação sequencial de diversas extrações, sendo limitada apenas ao número de posições no carrossel do coletor de frações. O método é eficiente, rápido e atende os preceitos de química verde, diminuindo o resíduo de fase extratora, a quantidade de amostra e o tempo de analista.

Agradecimentos

Agradecemos as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento do projeto.

Referências

1. Hibbert, D. B., Korte, E. H. & Örnemark, U. Metrological and quality concepts in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2021). *Pure and Applied Chemistry* **93**, 997–1048 (2021).
2. Peng, J. *et al.* New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* vol. 6 540–551 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.016> (2016).
3. Poole, C. F. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 362–373 (2003).
4. Humbert, L. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Annales de Toxicologie Analytique* **22**, 61–68 (2010).
5. Rogeberg, M., Malerod, H., Roberg-Larsen, H., Aass, C. & Wilson, S. R. On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of*



- Pharmaceutical and Biomedical Analysis* vol. 87 120–129 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.006> (2014).
6. Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A. & Giger, W. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. (2001) doi:10.1021/ac0015265.
 7. Sørensen, L., Silva, M. S., Booth, A. M. & Meier, S. Optimization and comparison of miniaturized extraction techniques for PAHs from crude oil exposed Atlantic cod and haddock eggs. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **408**, 1023–1032 (2016).