

Proyecto de Innovación Docente 2019-2020
Herramienta TAPA
Trabajo de Aplicación Práctica para el Alumnado

Grado: FARMACIA

Materia: QUÍMICA ANALÍTICA II

Facultad: FARMACIA

Curso: 2

Asignatura: QUÍMICA ANALÍTICA II

TAPA: TORTILLA DE CALABACÍN

TAREA 1. Elección de la técnica instrumental

Hemos escogido la colina como elemento a analizar, que es una amina cuaternaria saturada, porque tiene gran importancia dentro del metabolismo humano.

La colina es un nutriente del complejo de la vitamina B necesario en pequeñas cantidades para el organismo. Fue considerado en 1998, por el Instituto de Medicina de los Estados Unidos como un nutriente hidrosoluble esencial en la dieta animal y humana. A pesar de su carácter esencial, se sintetiza de forma endógena a través de la metilación secuencial de la fosfatidiletanolamina.

Su importancia radica en su contribución para la producción de neurotransmisores como la acetilcolina (que participa en el control de la memoria y los músculos) ; ayudar a las células a formar membranas y extraer grasa del hígado. Además es precursora de sustancias fundamentales como fosfatidilcolina, esfingomielina y betaína.

Se encuentra en diversos alimentos como leche, soja o huevos. La colina de nuestra tapa proviene del huevo que contiene la tortilla.

La dosis recomendada es de 550 mg al día en hombres, y de 425 mg al día en mujeres (aumentando en embarazo y lactancia).

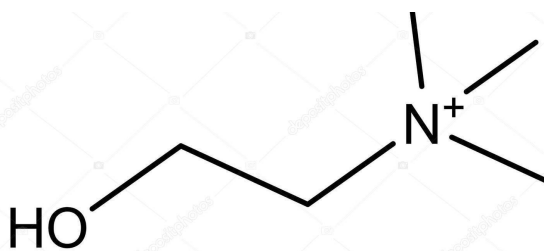
La insuficiencia de colina puede causar enfermedades cardiovasculares y dañar el hígado. Sin embargo a elevadas dosis pueden producir un ligero efecto hipotensor, vómitos, aumento de salivación y de sudoración, adenomas de colon y cáncer de mama. Por eso los profesionales no suelen recomendar alimentos con colina.

Hemos escogido como técnica instrumental para determinar la colina, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Nuestra decisión de utilizar esta técnica se basa fundamentalmente en la relación existente entre la rapidez y la eficacia; el tiempo empleado para la determinación en el laboratorio se reduce considerablemente tras los nuevos avances en los instrumentos utilizados para este método. Respecto a la eficacia cabe destacar que los resultados obtenidos son precisos y resolutivos.

No es necesario un técnico especializado para llevar a cabo este método, lo que facilita que el uso sea simple y sencillo.

A pesar de las ventajas que presenta; el instrumental de esta técnica resulta costoso, por lo que se necesita una inversión económica alta.



TAREA 2.

Descripción del fundamento de la técnica

Esta técnica se basa en la separación de distintos analitos en función de la mayor o menor retención que presenten en la fase estacionaria. Este tipo de cromatografía se emplea para determinar sustancias líquidas. Hay distintos tipos de HPLC; entre ellas está la cromatografía de partición, o aquellas cuya fase estacionaria es sólida: las que interaccionan con el soluto por adsorción, exclusión por tamaño o por fuerza iónica. En nuestro caso, hemos decidido utilizar la que se basa en el fenómeno de adsorción.

El tiempo empleado por un analito en salir de la columna está relacionado directamente con su afinidad con la fase estacionaria. Es decir, una sustancia polar tendrá más afinidad si la fase estacionaria es polar, y por tanto tardará más en salir.

En el caso de la cromatografía de adsorción, la fase estacionaria es un sólido. En este tipo de HPLC no se tiene en cuenta la polaridad de las muestras, lo que importa es la interacción y afinidad que se produce entre el soluto y la fase estacionaria y la fase móvil con la fase estacionaria. La separación se basa en el equilibrio de fuerzas de adsorción-desorción que se lleva a cabo con el soluto y la fase estacionaria.

Va a existir una competencia entre la fase móvil y las moléculas de soluto por los sitios de adsorción de la fase estacionaria. El analito es el primero en adsorberse a la fase estacionaria, sin embargo, con la llegada de la fase móvil (que tienen más afinidad por la fase estacionaria que el analito) se produce la desorción del soluto y la adsorción de la FM.

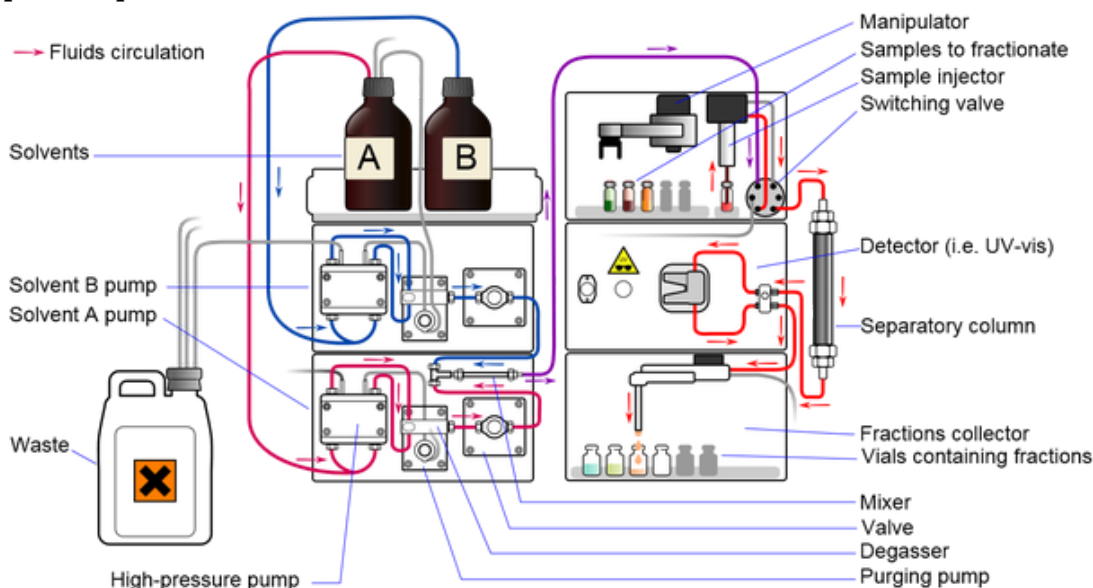
Las separaciones dependen del grado en que los solutos se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria (se establece un equilibrio entre ambas). La fase móvil va arrastrando los analitos a través de la columna (fase estacionaria), hasta el detector.

Esta técnica nos permite hacer un análisis cualitativo (nos dice si se encuentra la sustancia que buscamos o no) y cuantitativo (nos dice la cantidad de sustancia que hay). Para el análisis cualitativo, se compara el cromatograma de la muestra problema con cromatogramas de patrones realizados anteriormente. Cada analito sale en un tiempo determinado, por lo que sabiendo en qué minuto sale el analito: buscamos en el cromatograma de nuestra muestra; la señal o pico correspondiente a ese tiempo en el cromatograma patrón. Si hay señal, es por que nuestra muestra contiene dicho analito, sino, carece de él.

TAREA 3.

Esquema del equipo instrumental empleado

Donde se encuentran almacenados los solventes (acetonitrilo y acetato amónico), se le denomina reservorios. En este caso los reservorios son de politetrafluoroetileno (PTFE), ya que estos son inertes y no aportan cationes que nos puedan causar interferencias.



Los componentes de un equipo de cromatografía son:

- **Fase móvil.** Transporta los componentes de la mezcla a través de la columna. Los solutos deben ser solubles en ella. Usamos una proporción 40:60 de acetato de amonio y acetonitrilo. Esta concentración va cambiando cada minuto, haciendo mayor la concentración de acetato de amonio.
- **Cámara de mezcla.** En esta se llevará a cabo una elución en gradiente. La proporción de acetato de amonio va a ir aumentando a una razón de 5% por minuto. Es una elución lineal, se varía gradualmente la composición de la fase móvil.
- **Sistema de bombeo.** Es el encargado de transportar la fase móvil hasta la columna. Debe controlar que la presión y el volumen no sobrepasen el límite que soporta la columna, y deben tratar que esté libre de pulsos (flujo constante).
- **Sistema de inyección.** Son válvulas de seis vías por donde se introduce la muestra problema. Bucle de inyector. Se realiza una inyección de 20 microlitros.
- **Columna cromatográfica.** Está formada por unas partículas de relleno: la fase estacionaria. La fase estacionaria está formada por sílice (precipitada, que es una forma sintética, blanca y amorfa de dióxido de silicio; con la misma composición química que la arena, SiO₂), que se encuentra formando las partículas. Los solutos deben interactuar con ellas mediante un equilibrio de fuerzas de adsorción-desorción.
- **Detector.** En este experimento el detector más adecuado es el detector ELSD-LT II. Es un detector de luz dispersada tras evaporación, que tiene un tubo fotomultiplicador, que usa luz LED, se puede usar a una temperatura entre 298-353 kelvin y que tiene un gas nebulizador de nitrógeno. Usa un único nebulizador, y tiene una alta sensibilidad y una temperatura de evaporación baja. Este detector registra en continuo la luz dispersada por las partículas sólidas residuales después de la evaporación de la fase móvil del eluyente de la columna cromatográfica. Es considerado como un detector prácticamente universal ya que permite el registro de cualquier analito que sea menos volátil que la fase móvil. Las mejores prestaciones de este detector hace que esté sustituyendo progresivamente a los detectores de Índice de Refracción (IR) especialmente en el caso de analitos sin grupos cromóforos.
- **Sistema de lectura.** Es el dispositivo que lee los datos recibidos y los transforma en una gráfica legible (cromatograma).
- La temperatura de la columna es de 35 grados o 308 K.

TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

Lo primero de todo, consiste en la extracción de la colina de nuestra tapa. Concretamente, la colina es una molécula que se encuentra en la yema del huevo y por tanto en la tortilla de nuestra tapa.

En el huevo encontramos 4 tipos de colina: colina libre, fosfocolina, glicerofosfocolina y la fosfatidilcolina. Nosotros vamos a analizar todas las colinas presentes.

La colina total, se puede obtener mediante la suma de las colinas libres y sus formas esterificadas. Mediante la hidrólisis de los ésteres podemos obtener la colina en su forma libre (que es el procedimiento que vamos a seguir). Cuantificar este tipo de sustancias puede resultar complejo por la naturaleza hidrofílica de algunas formas (por ejemplo la colina, betaína, acetilcolina, glicerofosfocolina y fosfocolina) e hidrófoba de otras (fosfatidilcolina o esfingomiélna). Estos métodos incluyen aislar de la matriz las fracciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, y analizar las muestras de cada una.

Escogemos varios tipos de huevos para tener una muestra representativa.

Las fracciones acuosas y lipídicas se separan de la muestra mediante una mezcla de cloroformo, metanol.

Separamos la yema de la clara y la homogeneizamos, ya que es en la yema donde se encuentra la colina que queremos analizar. La homogeneizamos con ayuda de una barra de ultrasonido. La extracción la realizamos mediante el procedimiento de Bligh and Dyer, para lo cual añadimos metanol. Al homogenizado agregamos cloroformo y agitamos en el agitador de tubos. A continuación agregamos agua (disolvente) y agitamos de nuevo. Después añadimos una cantidad adicional de cloroformo y tras agitar, dejamos separar las fases. Por último se toma una alícuota de la fase de metanol para analizar la colina.

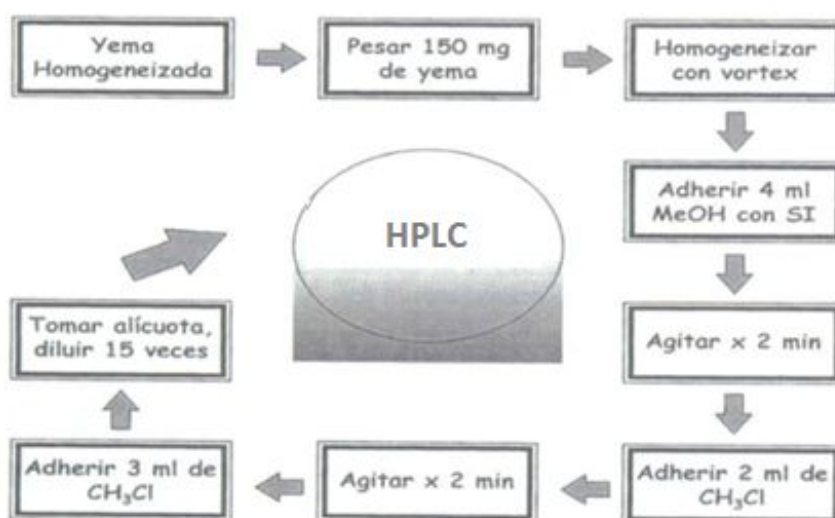


Diagrama que expone el tratamiento al que se somete la yema de huevo para poder realizar el HPLC

Existen varios tipos de HPLC, una técnica cromatográfica. Nosotros hemos utilizado una cromatografía de líquidos cuya fase estacionaria es sólida. Dentro de este grupo, la más adecuada para nuestro analito, es la cromatografía de adsorción; en la que se establecen interacciones entre las partículas de relleno y la fase estacionaria sólida.

Existe una competencia entre las moléculas de la fase móvil y moléculas de soluto por los sitios de adsorción de la fase estacionaria, de forma que, el soluto se une a FS y después es arrastrado por la fase móvil a lo largo de la columna hasta que se produce la salida del analito proporcionando un pico en el cromatograma.

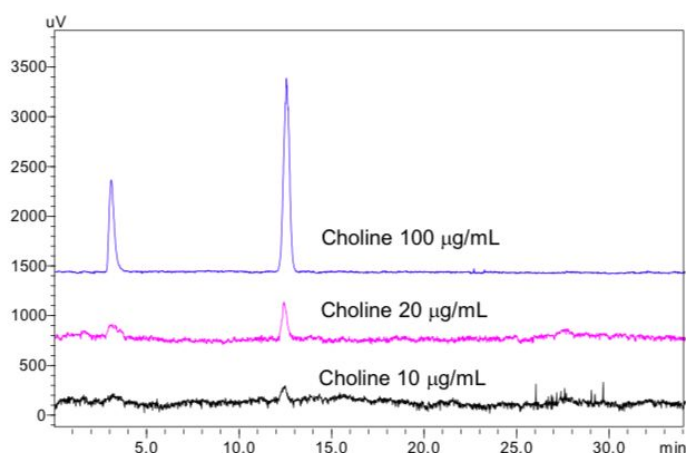
En la cámara de mezcla el tipo de elución es en gradiente. La composición de la fase móvil va variando de acuerdo a un programa establecido. Es una elución lineal; se varía gradualmente la composición de la fase móvil.

Antes de realizar la medición problema debemos medir una disolución patrón de colina de concentración conocida. Con esta medición obtendremos un pico en un tiempo concreto (aproximadamente a los 12,5 minutos), y de un área determinada, que depende de la concentración.

Después; al obtener nuestro cromatograma buscaremos si aparece un pico en el tiempo anteriormente determinado para la colina patrón. Si aparece un pico; eso será indicativo de que hay colina. Comparando ambas áreas obtenemos la concentración de colina presente en nuestra muestra.

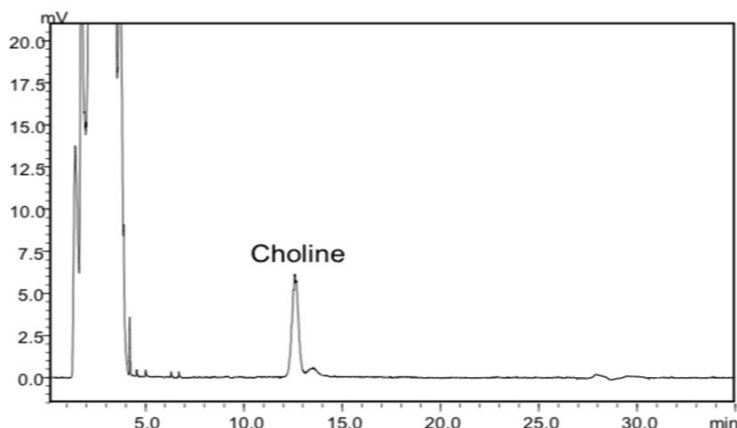
La máxima absorbancia de la colina se obtiene con una longitud de onda de 500 nm.

Esta sería la gráfica de nuestra muestra patrón:



Picos cromatográficos de colina detectados por el ELSD-LT II. Se mide la señal emitida en microvoltios.

Y esta sería la gráfica de nuestra muestra problema:



Pico cromatográfico obtenido de la colina de nuestra muestra problema. Se mide la señal en milivoltios.

A partir de las gráficas podemos hacer un análisis cuantitativo, ya que el área de los picos es proporcional a la concentración. Por lo tanto, comparando el área de los picos patrones de concentración conocida, podemos establecer una proporción con el área obtenida en la muestra problema. Esto se realiza mediante una curva de calibrado, tomando como referencia la muestra patrón. Se traza una recta con los datos de la muestra patrón, en la cual se interpolan los datos experimentales de la muestra problema. Como resultado obtenemos la concentración de la muestra problema. Siguiendo este método, se puede calcular la linealidad, dato que nos sirve para validar el experimento y el método propuesto.

Referencias:

-Shimadzu (2013). Quantitative Analysis of Choline in Multivitamin Tablet by HPLC with ELSD Detection. Singapur: *Shimadzu*. Recuperado de <https://public.jenck.com/notijenck/uploads/2013/09/choline-hplc.pdf>

-M Phillips, Melissa. (2012) . Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements. Gaithersburg, Estados Unidos: *Research Gate*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/221785654_Analytical_approaches_to_determination_of_total_choline_in_foods_and_dietary_supplements

-Shimadzu Corporation. (2014) . Evaporative Light Scattering Detector. Estambul: *Shimadzu*. Recuperado de <https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/hplc/C193-E025A.pdf>

-QuimiNet. (2012) . Los dos principales tipos de sílice. Recuperado de <https://www.quiminet.com/articulos/los-dos-principales-tipos-de-silices-2782524.htm>



-Diapositivas de la asignatura de Química Analítica II impartida por Elena Rodríguez-Rodríguez en el grado de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.