

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

**Grado:** Grado en Farmacia  
**Módulo:** .....  
**Materia:** Química Analítica II  
**Facultad:** Facultad de Farmacia  
**Curso:** 2º  
**Asignatura:** Química analítica II  
**TAPA:** Hamburguesas de garbanzo al horno  
-Componente elegido: Vitamina K (180% de la Ingesta Recomendada)  
**Componentes:** Iván González, Celia Sánchez, Nerea Díaz, Iker Muñoz, Cristina Fernández y María García.

**TAREA 1. Elección de la técnica instrumental**

Existen varias técnicas instrumentales para determinar el contenido de vitamina K de la tapa seleccionada. Nos encontramos métodos tanto directos como indirectos. Entre los métodos directos, podemos utilizar la espectrometría de masas o la cromatografía líquida de alta resolución. Respecto a los métodos indirectos, encontramos el tiempo de protrombina y los metabolitos secundarios generados de la vitamina

En este caso elegimos la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta visible, ya que es una técnica rápida y sencilla de usar. Este método nos permite analizar la filoquinona (vitamina K) de la muestra, ya sea plasma humano o cualquier otra sustancia orgánica. Los datos obtenidos mediante esta técnica se aproximan mucho a los valores reales.

Sin embargo, se trata de un método poco sensible y poco selectivo, por ello, es recomendable complementarlo con otras técnicas de determinación. En este caso elegimos la detección con ultravioleta visible (UV-Vis).

Además, la HPLC junto con detección de UV-Vis es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad para la cuantificación y determinación de la vitamina K.

Cabe recordar que existen varios tipos de vitamina K:

- Vitamina K1, llamada filoquinona, que proviene de productos vegetales, hígado así. Es la que vamos a analizar.
- Vitamina K2 también llamada menaquinona, que es producida por las bacterias del intestino

La diferencia entre una vitamina y otra será un pico que se encuentra próximo en el espectrómetro.

En nuestro caso al tratarse de productos vegetales (garbanzos) cuantificaremos la vitamina K1 y no existe vitamina K2 en esta tapa por la razón explicada anteriormente.

## TAREA 2.

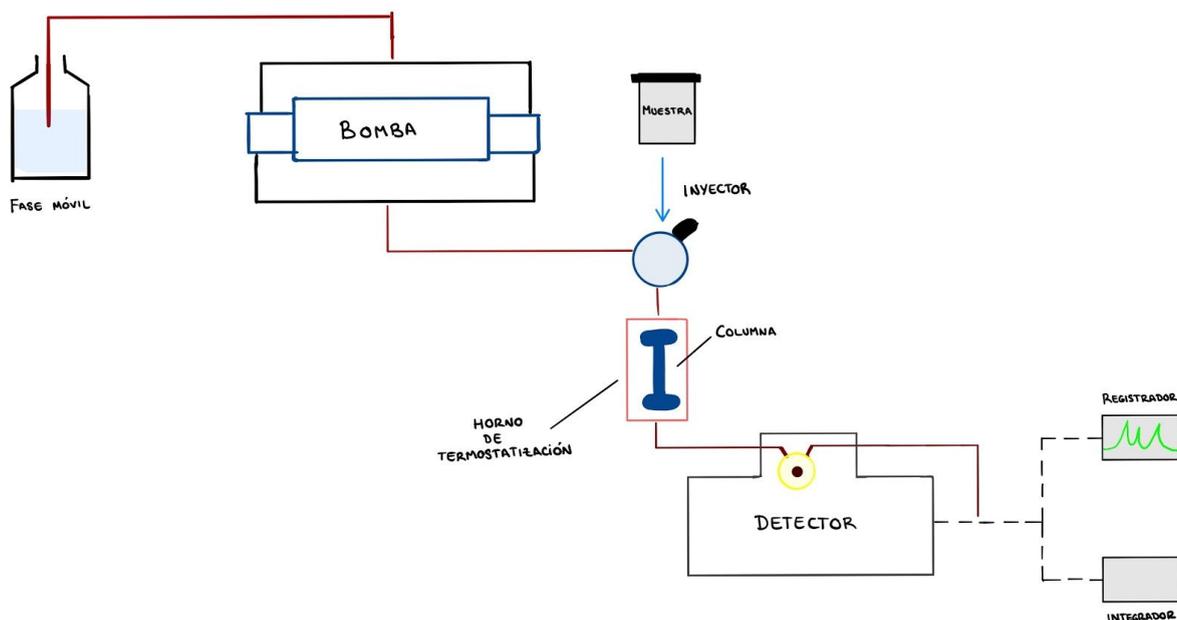
## Descripción del fundamento de la técnica

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación empleada para discernir componentes de una mezcla. Existen dos fases: fase estacionaria no polar que se encuentra en la columna, y una fase móvil polar (donde está localizado el portador de la muestra).

La cromatografía líquida de alta resolución junto a UV, es utilizada para detectar los analitos de una muestra. La luz es utilizada para medir la absorción de la muestra a diferentes longitudes de onda. Existen varios tipos de detectores, los detectores de longitud de onda única, así como los detectores de longitud de onda variables.

## TAREA 3.

## Esquema del equipo instrumental empleado



## INSTRUMENTOS

Tras realizar la extracción de la filoquinona y diluirla en un solvente orgánico, se inyectan 50 microlitros del analito en el sistema cromatográfico. Se han utilizado los siguientes componentes:

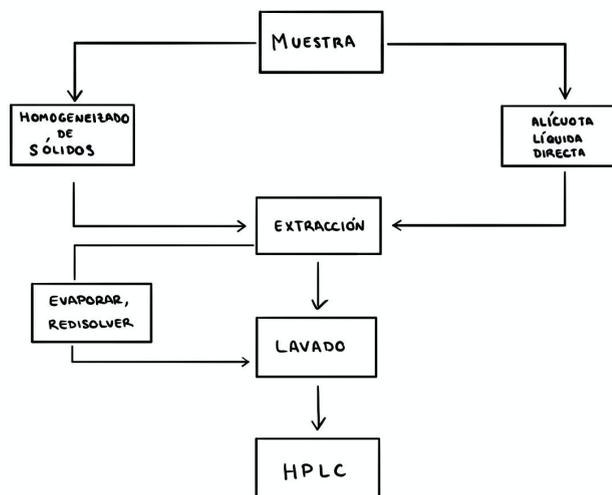
- Sistema CBM-20A (SCL-10AVP)
- Software de solución LC
- Bomba isocrática LC-20AT
- Detector ProStar 325 Dual Wavelength UV-Vis HPLC Detector de la compañía Agilent Technologies, su intervalo de longitud de onda comprende entre 190 hasta 900 nm, la fuente de luz es Deuterio (UV) y halógena de cuarzo (Vis)

La separación se realizó en fase inversa, con una fase móvil de diclorometano o metanol, con un flujo de 1ml/min y con una columna de acero inoxidable con un módulo de compresión radial de 8x10.

#### TAREA 4.

#### Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

La muestra a analizar es un sólido a homogeneizar en el mortero. En nuestro caso se va a tratar de una muestra sólida, ya que se está analizando el contenido de vitamina K en garbanzos (hummus). Sin embargo, independientemente del estado de la muestra se va a proceder a la extracción usando hexano, después al lavado de la muestra, y posteriormente a la introducción en el sistema de HPLC. Solo en el caso de que el hexano no fuese el primer solvente extraído (cosa que no ocurre en el caso de la extracción de la Vitamina K1) se produciría la evaporación de la muestra. Después se procede al lavado y al tratamiento HPLC.



Podemos encontrar la vitamina K en varios alimentos como los garbanzos, aguacate o maíz. En garbanzos tenemos una cantidad de 264 µg, 19 µg en aguacate y 1µg en maíz en 100 g de alimento. Por lo consiguiente, se deduce que la mayoría de vitamina K provendrá de los garbanzos y será de donde analizaremos.

La técnica está basada en la cromatografía líquida, principalmente en la fase inversa. Se usa como fase móvil el diclorometano y metanol (100 ml y 900 ml respectivamente) entre otros solventes. Por otro lado, se emplea la longitud de onda de 243 nm del espectrofotómetro con detector UV, porque presenta mucha absorción (pico) y se utiliza un patrón 2'3'-dihidrofiloquinona en pequeñas cantidades.

Para la determinación es necesario realizar procesos preanalíticos, para que sea lo más pura posible, evitando de esa forma interferencias. . Primero se hace una prepurificación con HPLC de fase normal como semi-preparación y después un HPLC analítico de fase reversa para su cuantificación ya que la vitamina k es una vitamina liposoluble y su determinación es más difícil por la poca cantidad que hay en los alimentos.

Por otro lado debemos tener en cuenta que es un componente que se degrada fácilmente en condiciones ambientales, por lo que debemos ser cuidadosos con la conservación y tratamiento de la muestra.

La cuantificación de la vitamina K consiste en preparar varias curvas estandarizadas. Se comparan las distintas áreas y los picos adquiridos a partir del cromatograma. Para la obtención de estas curvas preparamos la fase móvil tal y como hemos explicado previamente. A continuación sacamos la regresión lineal de la curva de calibrado gracias a un programa informático especial para este método.

## Bibliografía

Anónimo. (2019). *Cromatografía líquida de alta resolución - EcuRed*. [online] EcuRed.cu. Available at: [https://www.ecured.cu/Cromatografía\\_líquida\\_de\\_alta\\_resolución#Cromatograf.C3.ADa\\_I.C3.ADquida\\_de\\_alta\\_resoluci.C3.B3n\\_.28HPLC.29](https://www.ecured.cu/Cromatografía_líquida_de_alta_resolución#Cromatograf.C3.ADa_I.C3.ADquida_de_alta_resoluci.C3.B3n_.28HPLC.29) [Accessed 13 Oct. 2019].

Anónimo. (2019). [online] Mncn.csic.es. Available at: [https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_liquida\\_de\\_alta\\_eficacia.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf) [Accessed 31 Oct. 2019].

Anónimo. (2019). [online] Tdx.cat. Available at: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3141/ivm03de14.pdf?sequence=3&isAllowed=y> [Accessed 31 Oct. 2019].

Anónimo. (2019). *HPLC UV Detector (UV/Visible HPLC Detectors) | Biocompare.com*. [online] Biocompare.com. Available at: <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/> [Accessed 31 Oct. 2019].

Velasco Hernández, Cristina. (2019). [online] 147.96.70.122. Available at: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20VELASCO%20HERNANDEZ.pdf> [Accessed 31 nov. 2019].

Anónimo. (2019). [online] Mncn.csic.es. Available at: [https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_liquida\\_de\\_alta\\_eficacia.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf) [Accessed 5 Nov. 2019].

Schüep, Willy. (2019). [online] Fao.org. Available at: <http://www.fao.org/3/AH833S19.htm> [Accessed 5 Nov. 2019].

Anónimo. (2019). [online] Usc.es. Available at: [http://www.usc.es/export9/sites/webinstitucional/gl/centros/quimica/cursos/grao/Practicas\\_Q\\_A\\_II\\_12\\_1\\_15.pdf](http://www.usc.es/export9/sites/webinstitucional/gl/centros/quimica/cursos/grao/Practicas_Q_A_II_12_1_15.pdf) [Accessed 5 Nov. 2019].

Jakob and Ibrahim Elmadfa. (2019). [online] Available at: <https://pdf.sciencedirectassets.com/271163/1-s2.0-S0308814600X00039/1-s2.0-0308814695001506/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEcaCXVzLWVhc3QtMSJIM EYCIQCumr7katHxIJ861BnuCjM1Atc3TVaiJ5ncbiiPoWUorQlhAIEYeBmNp2ObjtkakpzLF0dN%2F3NCg8sgXn8Qrwn9QJXKtACCGAQAhoMMDU5MDAzNTQ2ODY1lgw7qoJO9Bwkd9RI74gqrQKXVnuS%2B%2Fq%2FX%2BXqnKJZfcmL3TIhKuugT8VzMWrpzQN3urCGnpeWjzutQTZEE3oZ%2B0ga4M%2BmUfaMLhXzc132cXdp%2BkNGDGxzm%2FWXr7fsIDPGsxT5C7FQrqr8z%2F7P3IEroZ0%2BDSqS%2BxMIBFzdiw0kpOAJUnT2DKIAoFgCm5yVuRrRisUmvjVISOpJooTifungvsSSm53OkYIfIBkmg3ifIMElmiugRToGAKW6MJQYP7LMnuU5eSVy5zsEjxWknCUjfg5czWt7r%2FzGoxL66CFsrH0Tc0HNvpXMN824B3YrvoYMR%2BicxIsedhID7f4nT46c7DYQ6ImKoqdUm4ZD15lkj1Yoy1hsVki7C04zKrVJodV952eY8vf%2Ftm7kiVaGW058iXTZbqogFo5ISPuFM2MISchu4FOs4CXV1BPEeY%2FG8sO>

q%2BHzYFGO5rBYOXf4BEBH9iUajyUx6QwIHmnRpBgnyl8bvpiJkeMvPLxM165waS5%2F  
OzsVxJe3pioEI%2BZmafoNq4Y8uU7FQDLis%2BUXrb7LdQqkbvapKvg0rPq9TjYeNCLIBrg  
w7vWb9Ik01O%2FFTIOF5%2Fmu7BOldRXHP7pzneH27JH1HqvYhMsgcS5NoTsToHRK52  
CIWau4bmOhPwMBzhCFMOnWb7HsapaBEPqb3WmZueBrAkEWoII1sBUddLEQLZJ64so  
ajiraGa1MzgNKCLGthsQKDhS6E%2FnqGmSj3vEvx65oe00sVBwg2UK1oIEc%2BeEWFh5  
Qy0Ajz7%2BDBQ6wdWNFJ%2BRIUUbhQ96aSQQ2hwGEUujEKYiI9HaLxdDSvbgp%2B8G  
qUFy8XZDAT4Wjg3nZOSRjTbkayfX79GWwnl6AQz3RISVLIdaKQ%3D%3D&X-Amz-Algorit  
hm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Date=20191105T160058Z&X-Amz-SignedHeaders=host  
&X-Amz-Expires=300&X-Amz-Credential=ASIAQ3PHCVTYQYB2RAHO%2F20191105%2Fu  
s-east-1%2Fs3%2Faws4\_request&X-Amz-Signature=932242fe30c709df1b27f6c8b6ab79bc  
1cda4741fd10dd4ad572a9be87ab501d&hash=7293 [Accessed 5 Nov. 2019].

Simone Aparecida dos Santos Conceição Faria, Vanilda Aparecida Soares de Arruda,  
Elias da Silva Araújo, Marilene De Vuono Camargo Penteado. (2019). [online] Available  
at: <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v53n2/2175-9790-bjps-53-02-e15197.pdf> [Accessed 19  
Nov. 2019].

<http://www.fao.org/3/AH833S19.htm>