

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

Grado: Farmacia.
Módulo: Farmacia.
Materia: Química Analítica II.
Facultad: Farmacia.
Curso: Segundo.
Asignatura: Química Analítica II.
TAPA: Brocheta de tierra y mar.

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

Para determinar la vitamina C, la técnica elegida para la determinación es el HPLC o cromatografía líquida de alta eficacia.

La HPLC tiene su ventaja por ofrecer una gran precisión de los resultados, pero la técnica es cara. Sin embargo, la titulación volumétrica de óxido-reducción es más sencilla, rápida y barata. Pero no es muy precisa.

La vitamina C o ácido L-ascórbico (AA) es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que tienen lugar en el organismo. También es un nutriente esencial para las reacciones metabólicas en todos los animales, plantas y humanos.

Con este método podemos determinar el ácido ascórbico (vitamina C) en una muestra en la que haya varios componentes y separarlos según su polaridad. Conocemos que con esta técnica podemos determinar compuestos termolábiles o no volátiles, compuestos muy polares, especies iónicas y compuestos de alto peso molecular. Y que, por lo tanto, es una técnica más versátil que la cromatografía de gases.

La vitamina C es una sustancia polar y se ve afectada por factores como el calor, por lo que es termolábil. Por tanto, es una sustancia que está dentro del campo de aplicación de la técnica HPLC.

TAREA 2.	Descripción del fundamento de la técnica
-----------------	---

La técnica se basa en la separación e identificación de los analitos y conocer su concentración. Por lo tanto, es tanto cualitativa como cuantitativa.

El campo de aplicación de esta técnica nos va a permitir analizar compuestos muy termolábiles o no volátiles, **compuestos muy polares**, especies iónicas y compuestos de alto peso molecular.

Utilizaremos patrones para realizarla y así averiguar los factores de retención que nos darán cuenta de que analitos son más polares y cuáles menos.

El fundamento por el cual se separan los analitos en esta técnica se debe a la existencia de dos fases: una fase estacionaria³ y una fase móvil⁴.

Existen dos tipos de cromatografías, de fase normal y de fase inversa. Nosotros hemos optado por la fase normal, donde la fase móvil transporta a los componentes menos polares y la fase estacionaria retiene los solutos más polares.

La forma más sencilla de llevar a cabo una separación en cromatografía de líquidos es mediante una elución isocrática¹, es decir, usando un único disolvente para hacer pasar a los analitos a través de la columna. Sin embargo, a menudo se puede obtener un cromatograma más satisfactorio mediante elución gradiente². La elución gradiente frecuentemente mejora la eficacia de la separación de forma parecida a como lo hace el gradiente de temperatura en cromatografía de gases. Los instrumentos modernos de HPLC a menudo están equipados con válvulas de mezcla que introduce líquidos desde dos o más recipientes a velocidades variables de forma continua.

TAREA 3.	Esquema del equipo instrumental empleado
-----------------	---

Como en nuestro caso obtenemos la vitamina C de la carne, utilizamos la cromatografía líquida de alta eficacia por fase inversa.

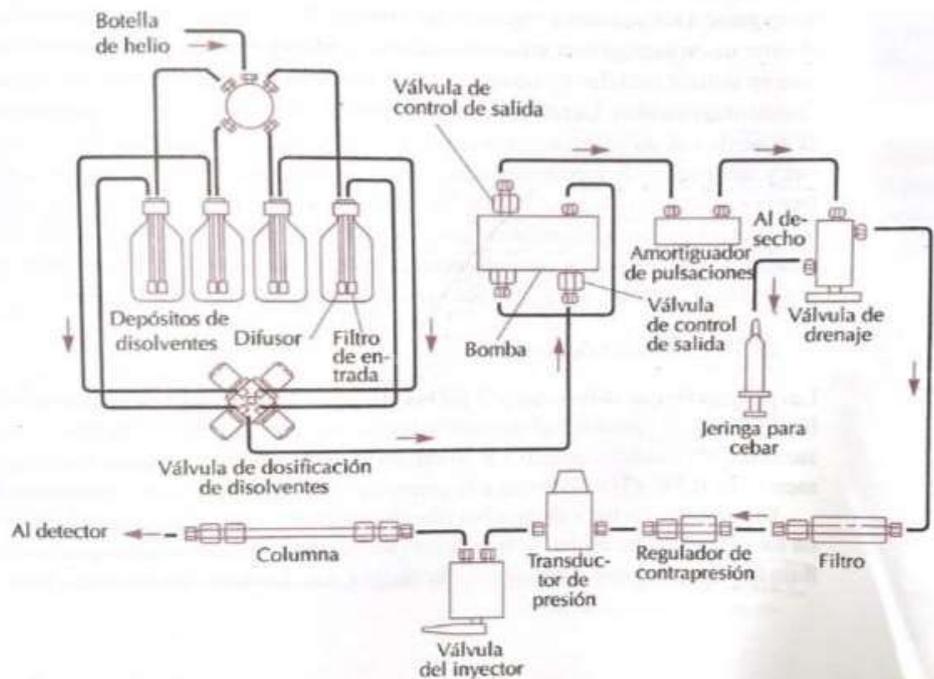


FIGURA 28-2
Esquema de un equipo de HPLC. (Con autorización de Perkin-Elmer, Norwalk, CT.)

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la fase estacionaria y la fase móvil empleadas. Se emplea para la determinación de vitamina C en distintos alimentos.

Se utiliza columna C18 y una precolumna RP-18 para la fase estacionaria, y la fase móvil se utiliza ácido sulfúrico para llevar un pH 2,2. La velocidad de flujo es 0,4 mL/min, y detector de UVVIS a 225 nm para vitamina C. También se puede utilizar otros detectores, por ejemplo, el detector de DAD (Diode Array Detector); la detección fluorimétrica y espectrométrica de masas (MS). La detección de HPLC-UV-VIS / DAD es utilizada para la determinación del AA y vitamina C total (AA+ADA).

Por ejemplo, después de la reducción de ADA con ditiotreitól (reductor) en judías verdes. La detección fluorimétrica es más sensible, específica y presenta mayor rango lineal. La detección espectrométrica de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones, se separan en función su relación masa/carga (m/z). **Esta detección mejora la sensibilidad.**

NOTA:

En la cromatografía de líquidos de alta resolución no existe un sistema detector universal de alta sensibilidad. Por ello, dependerá de la naturaleza de la muestra. En nuestro caso, utilizaremos el detector diodo-array .

Los detectores más generalizados en HPLC están basados en la absorción de ultravioleta/visible. Los podemos encontrar en el comercio tanto como fotómetros como espectrómetros diseñados específicamente para columnas cromatográficas.

TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

Para extraer la vitamina C del alimento, primero vamos a obtener una muestra homogeneizada de la carne. Con esta, realizaremos una extracción con ácido metafosfórico y en agitación magnética en la oscuridad. Más tarde, realizaremos una filtración ajustando el pH con ácido metafosfórico. Por último, realizaremos la inyección en HPLC para realizar la cuantificación.

Tenemos una muestra con diferentes componentes y queremos determinar a vitamina C. Para separar los distintos componentes y determinar cuantitativamente la vitamina C es necesario una columna de elución. Esta elución, permite el transporte a través de la columna las diferentes moléculas de analito. A su vez, tendremos una fase estacionaria y una fase móvil, siendo la estacionaria la que retendrá los solutos más polares. Al final de la columna se coloca un dispositivo que responde a los cambios de la fase móvil, es decir habrá un detector, en el cual se puede registrar un cromatograma que va apareciendo en función del tiempo y de la señal. Van apareciendo diferentes picos, que corresponde a los diferentes componentes de la mezcla.

Los diferentes analitos los puedo conocer por sus tiempos de retención, comparándolos con el patrón, en el cual sí sabemos que analitos estamos analizando.

Por lo tanto, lo primero que tenemos que hacer es inyectar nuestra muestra patrón en nuestro sistema de inyección. Tenemos diferentes métodos de inyección de la muestra:

- 1) Se puede inyectar la muestra sencillamente con una jeringa a través de un diafragma (septo) de elastómero. Sin embargo, este procedimiento no es muy reproducible y sólo se puede producir con presiones más bajas a 120 atm.
- 2) En la inyección a flujo interrumpido se para momentáneamente el flujo del eluyente, se quita el adaptador de cabeza de la columna y se inyecta la muestra directamente en la cabeza del empaquetado por medio de una jeringa.
- 3) El método más utilizado en HPLC es la introducción de las muestras mediante dispositivos con un bucle de muestreo. Estos bucles son intercambiables. Es por ello por lo que me permiten elegir el tamaño de la muestra entre 5 a 500 microlitros. La precisión relativa de las inyecciones con un bucle típico es de unas décimas por cien. Hay que destacar la importancia de limpiar los bucles cada vez que vamos a introducir una nueva muestra, de modo que esto no nos genere interferencias a la hora de realizar el análisis cuantitativo.

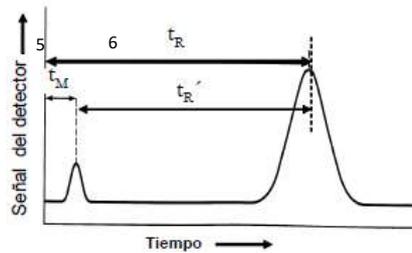
Después de inyectar la muestra patrón tendremos que imprimir los diferentes cromatogramas. Así sabremos el tiempo de retención que tiene cada analito.

Seguidamente inyectamos nuestra muestra problema en la cual queremos determinar la vitamina C. Esto nos servirá para hacer un análisis cualitativo.

Si queremos determinar la concentración de la vitamina C, es decir, un análisis cuantitativo, tendremos que calcular su área. A partir de la altura y la anchura del pico del cromatograma.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, nos vamos a basar en una serie de parámetros que nos van a servir para determinar el analito que queremos cuantificar. Esos parámetros son los siguientes:

- **Factor de retención o de capacidad:** Es la relación entre el tiempo que permanece un soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil. Se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas. Depende de las condiciones de trabajo, de la geometría de la columna y del coeficiente de reparto. Se puede determinar directamente a partir del cromatograma o con la expresión:



Si $k < 1$, la elución del soluto es demasiado rápida para asegurar la determinación de t_R y si $k > 10$, la elución es demasiado lenta para ser práctica y por tanto los t_R son demasiado largos. Los valores óptimos de k son entre 1 y 5.

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

- **Selectividad:** término que define como es la columna de selectiva para separar dos compuestos con picos adyacentes y nos indica la retención relativa. Depende de la naturaleza de las fases, del soluto y de la temperatura y es independiente del flujo de la fase móvil.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m}$$

ANEXO

¹En HPLC, es la realizada manteniendo constante la composición de la fase móvil.

²En HPLC, es la realizada variando la composición de la fase móvil, bien de forma continua, bien de forma escalonada.

³ Los solutos deben de interaccionar con ella: puede fijar en una superficie sólida, donde los analitos recorren distintas distancias durante el mismo tiempo. Una vez terminada la cromatografía, los analitos permanecen en el lecho cromatográfico donde se detectan → cromatogramas internos. Con material de relleno de una columna, todos los analitos recorren la misma distancia, tardan distintos tiempo en recorrerlo y se detectan fuera del lecho cromatográfico → cromatogramas externos.

⁴ Transporta a los componentes de la mezcla a través del sistema cromatográfico.

⁵Tiempo que transcurre entre la inyección del soluto y su llegada al detector.

⁶Tiempo necesario para que una especie no retenida alcance el detector.

BIBLIOGRAFÍA

SKOOG, Douglas; WEST, Donald M.; HOLLER, James. 2001. *Fundamentos de Química Analítica*. Barcelona: Reverte. 472 p.

[Science Direct]. 2015. "Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C". [en línea]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614018330> [consultado 30/11/2019].

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (Unidad Docente de Química Analítica). 2019. *Guía de prácticas de Química Analítica II*. Facultad de Farmacia (Madrid). 66 p.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Dra. Elena. 2019. *Métodos cromatográficos: introducción*. Facultad de Farmacia (Madrid). 56 p.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Dra. Elena. 2019. *Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)*. Facultad de Farmacia (Madrid). 26 p.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=vitamina+c>