

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

Grado:Grado de Farmacia

Módulo:

Materia:

Facultad:Farmacia.....

Curso:2019/2020.....

Asignatura:Química Analítica II.....

TAPA:17: Alcachofas al jamón y setas.....

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

Uno de los componentes principales de la tapa elegida para realizar este trabajo, la tapa nº 17 (alcachofas al jamón y setas), es el ácido pantoténico o vitamina B5, siendo esta la sustancia que se va a analizar. En concreto, se llevará a cabo el análisis del ácido pantoténico procedente de la pimienta negra de la tapa.

El ácido pantoténico es una vitamina hidrosoluble del grupo B, que colabora en la formación de hormonas y en la metabolización de los ácidos grasos. Es un precursor de la síntesis de la Coenzima A, molécula esencial que participa en varias rutas metabólicas del organismo. Su deficiencia en humanos es poco frecuente, observándose solo en casos de desnutrición graves.

A rasgos generales los métodos utilizados para la identificación y cuantificación de vitaminas del complejo B así como de otras vitaminas presentes en los alimentos son los fluorimétricos, microbiológicos y espectrofotométricos. Sin embargo, algunos de ellos tienen baja especificidad y un tiempo de análisis largo. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para un análisis rápido de vitaminas, debido a su alta sensibilidad y especificidad.

TAREA 2.

Descripción del fundamento de la técnica

Para analizar el ácido pantoténico utilizaremos la cromatografía de partición o de reparto: tanto la fase móvil como la estacionaria estarán en estado líquido.

El HPLC o cromatografía líquida de alta eficacia, es una técnica cromatográfica que consiste en la separación de los componentes presentes en una muestra líquida.

Para ello, contamos con dos fases, la estacionaria y la móvil, de distinta polaridad.

Esta técnica se basa en la separación de los solutos en función de su polaridad y en las distintas velocidades propias de cada componente en función de su afinidad por cada fase.

Se produce un equilibrio de reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, de manera que, cuanto mayor sea la afinidad del soluto por la fase estacionaria, el equilibrio estará más desplazado hacia dicha fase estacionaria, más tiempo estará dentro de la columna y por consiguiente, más tardará en salir. Lo contrario pasa si el soluto tiene más afinidad por la fase móvil: interacciona menos con la fase estacionaria, el equilibrio se desplaza hacia la fase móvil, recorre más rápido la columna y por lo tanto menos tiempo tardará en salir.

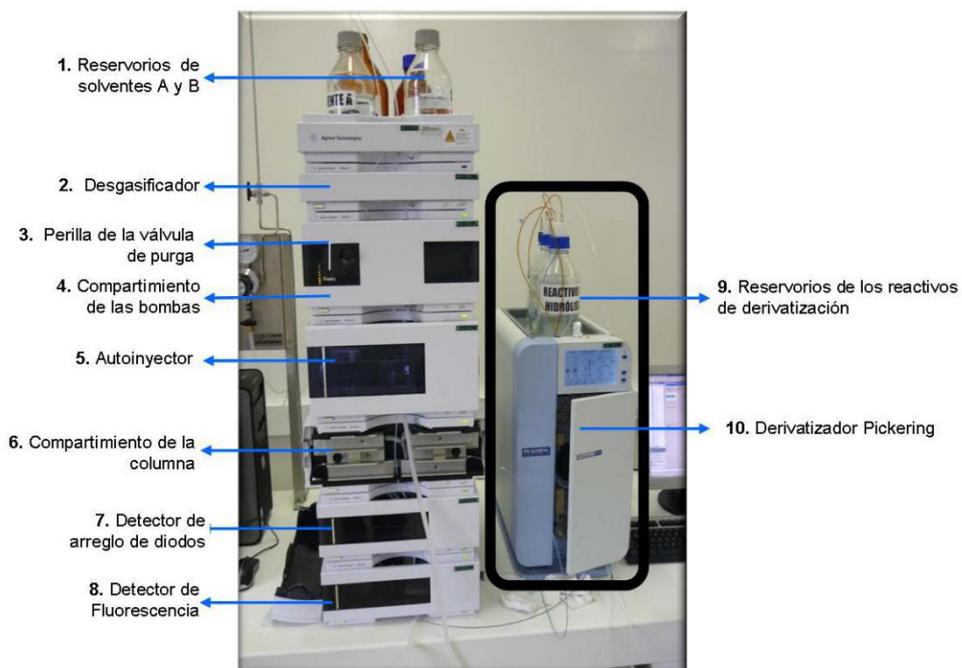
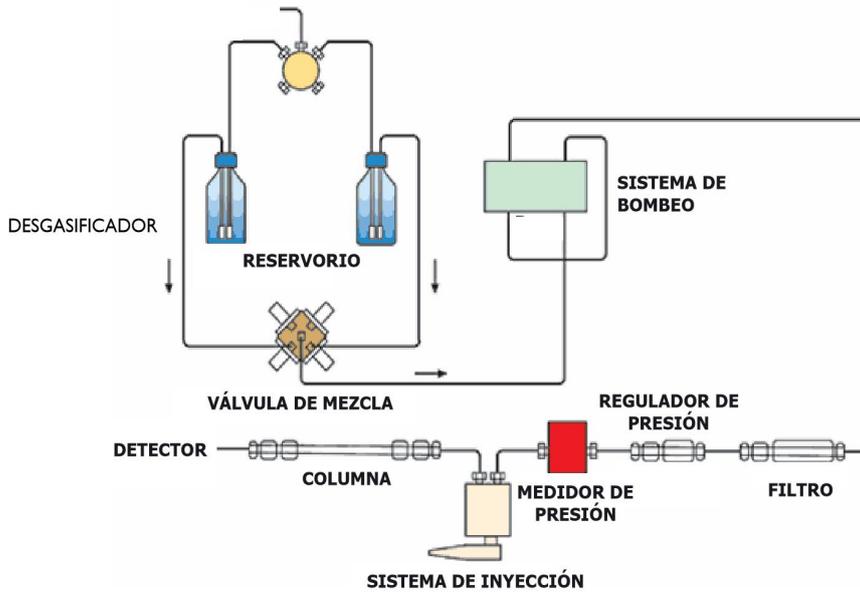
Existen dos tipos de cromatografías de reparto en función de la polaridad de las fases: si la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar, corresponde a una cromatografía normal; si la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es relativamente polar, es una cromatografía inversa

Para nuestro análisis del ácido pantoténico, utilizaremos un HPLC en fase inversa.

TAREA 3.

Esquema del equipo instrumental empleado

La instrumentación en cromatografía de líquidos (HPLC) consta de las siguientes partes:



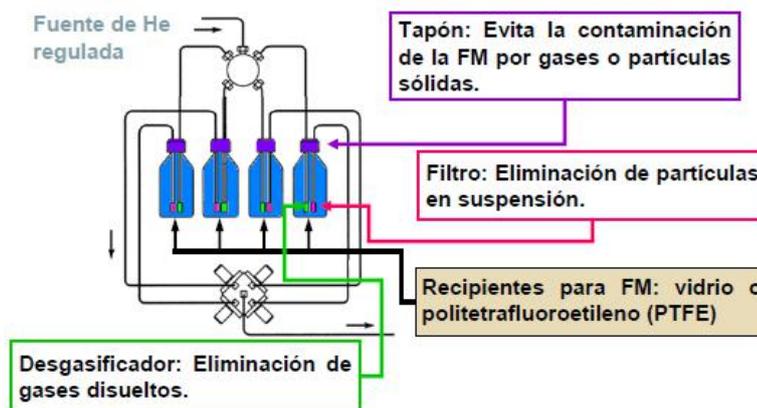
1. RESERVORIO

La fase móvil en HPLC está formada por un disolvente o por una mezcla de ellos, cada uno de los cuales está contenido en un recipiente, generalmente de vidrio, aunque también se emplean otros materiales como el politetrafluoroetileno. El reservorio se encuentra, por lo general, en la parte superior del equipo para que la fuerza de gravedad dirija el disolvente al sistema.

Los recipientes deben disponer de tapones que impidan la contaminación por gases o partículas en suspensión presentes en el aire. Para evitar flujos inestables, la formación de burbujas o la interferencia de partículas extrañas los disolventes deben estar filtrados y desgasificados. Constan, además, de una cámara de mezcla para mejorar la resolución en tiempos de análisis más cortos.

La elución puede realizarse de dos maneras:

- Elución isocrática cuando se separan solutos con polaridades semejantes
- Elución en gradiente cuando se separan solutos con polaridades muy diferentes



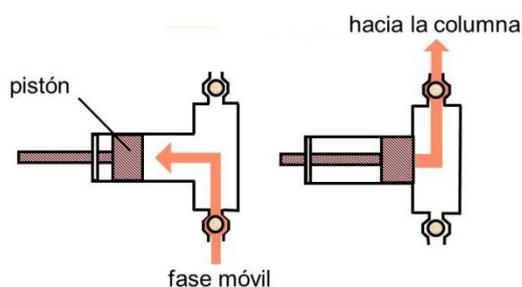
2. SISTEMA DE BOMBEO

Las bombas son las encargadas de impulsar la fase móvil, para que ésta pase del reservorio al inyector y de ahí a la columna.

Todos los sistemas HPLC incorporan un sistema de bombeo cuyas características son:

- Debe ser capaz de gestionar altas presiones
- Mantener el flujo libre de pulsos
- Proporcionar caudales constantes y reproducibles
- Permitir cambios de disolvente de modo simple y rápido
- Ser químicamente inerte y resistente a la corrosión

Las más empleadas son las bombas recíprocas que consisten en una pequeña cámara en la que el disolvente es impulsado por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor. La entrada y salida del disolvente se regula mediante dos válvulas de antirretorno que se abren y cierran alternativamente, permitiendo el paso del fluido en un solo sentido.

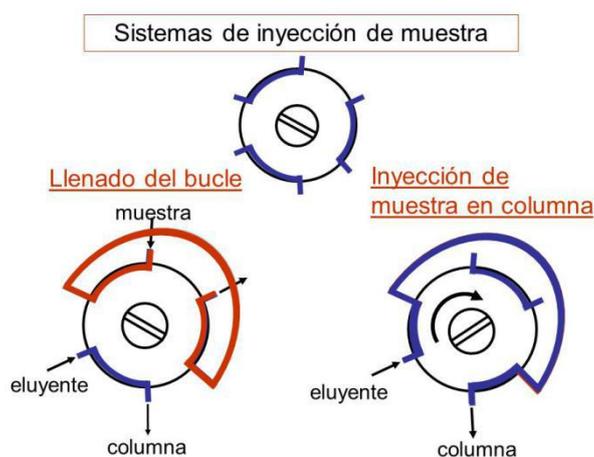


3. SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRA

La inyección de volumen de muestra preciso y pequeño debe hacerse a la entrada de las columnas en un breve periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación de la fase móvil y evitar el ensanchamiento de la banda. La reproducibilidad de la inyección va a condicionar la precisión de las medidas.

El sistema de inyección está formado por válvulas de alta presión de varias vías manuales o automatizadas. Constan de un doble circuito, uno de los cuales está conectado al exterior y el otro al propio sistema, pudiendo intercambiarse de forma rápida y simple entre las dos posiciones. Con la válvula en la posición de llenado de la izquierda, la fase móvil pasa de la bomba a la columna, mientras que la muestra se inyecta en el otro circuito con forma de bucle. Cuando la válvula gira hacia la posición de inyección de la derecha, la fase móvil arrastra la muestra hacia la columna.

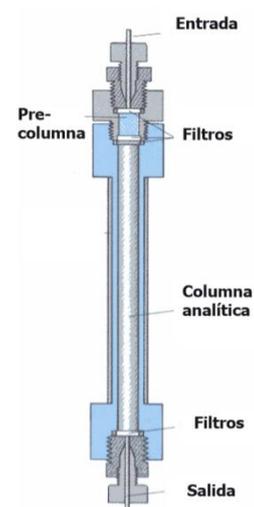
El objetivo de utilizar este tipo de válvulas es de no interrumpir el flujo de fase móvil a través de la columna e introducir en el flujo de la misma un volumen de muestra que estará contenida en espacio de volumen fijo.



4. COLUMNAS DE SEPARACIÓN O ANALÍTICA

Son columnas rectas, normalmente construidas de acero con una longitud entre 5 y 30 cm y un diámetro interno de entre 3 y 10 mm. Contiene el material de relleno sobre el que se fija la fase estacionaria. Los rellenos más comunes son de 5 a 10 μm y se mantienen en el interior del tubo mediante cierres porosos de metal o de vidrio. Consta, además, de platos teóricos. Actualmente existen columnas de mayor eficacia y dimensiones más reducidas que superan los 100.000 platos/metro con un consumo mínimo de disolvente.

Las columnas son delicadas y, por este hecho, se emplean precolumnas de composición similar a la de la columna pero con un diámetro de partícula mayor. Se coloca delante de la columna analítica y su función es aumentar la vida de la columna. Las precolumnas eliminan la materia en suspensión, los contaminantes de los disolventes y aquellos componentes que se unen de manera irreversible a la fase estacionaria. En el caso de que al precolumna esté muy contaminada se vacía y se rellena de nuevo o se reemplaza por otra nueva.



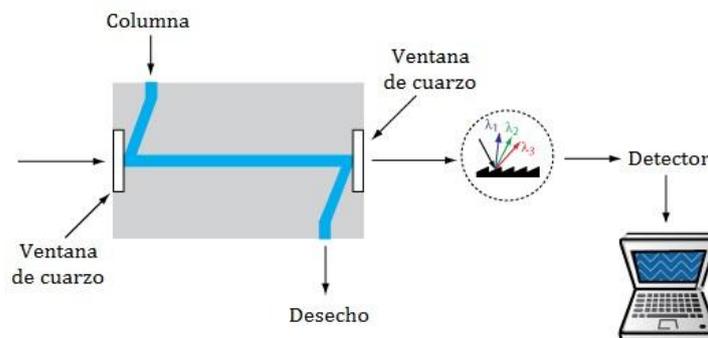
5. DETECTORES DE HPLC

Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente que deberá depender de la composición de éste. Las características del detector ideal, entre otras, son: una sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal, tiempo de respuesta corto independiente del caudal, alta fiabilidad, manejo sencillo, respuesta semejante para todos los solutos o respuesta selectiva para una o más clases de solutos y deben tener tener un volumen interno mínimo para reducir el ensanchamiento de banda extracolumna.

Los distintos selectores se clasifican según se encarguen de medir una propiedad del soluto o de la disolución. Entre los detectores utilizados en cromatografía líquida encontramos detectores de absorbancia, de fluorescencia, de índice de refracción, electroquímico y de espectrofotometría de masas.

En nuestro caso, el detector utilizado es el detector de absorbancia UV-VIS a una longitud de onda de 210 nm, concreto a nuestro analito.

Dicho detector es el más utilizado y se caracteriza por tener una alta sensibilidad, un amplio rango de linealidad, por ser adecuado para trabajar en gradiente y por no verse afectado por cambios de temperatura. Su mecanismo consiste en que el flujo de líquido que sale de la columna pasa a través de una pequeña celda, de pequeño volumen para minimizar el ensanchamiento de la banda. La medida de la absorbancia del líquido que la atraviesa en función del tiempo constituyen el cromatograma.



TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

Antes de realizar el análisis cuantitativo del ácido pantoténico, debemos realizar un análisis cualitativo que nos confirme la existencia de esta vitamina en la pimienta negra.

Para hacer eso preparamos una disolución patrón en agua con ácido pantoténico comercial (en su isómero D) a concentración conocida. Inyectamos esta disolución a la columna y anotamos su tiempo de retención.

Una vez conocido el tiempo de retención de nuestro compuesto a analizar, procedemos al análisis de nuestra disolución problema. La disolución contiene 10 g de pimienta negra en una solución de extracción adecuada. Hay que tener en cuenta aquellos componentes que puedan interferir en la medida de nuestro analito, que deberán de ser eliminados en un pre-tratamiento.

Hecho ya la disolución problema, inyectamos esta en la columna y esperamos a que la fase móvil llegue al detector; anotamos el tiempo de retención y procedemos a los cálculos.

Primeramente nos aseguramos que el analito que estamos determinando se encuentra en la disolución problema. Si el tiempo de retención obtenido en la disolución problema es igual o casi igual al tiempo de retención obtenido en disolución patrón, podemos afirmar que en la disolución problema hay ácido pantoténico. Una vez confirmado su presencia podemos proceder a la determinación cuantitativa de nuestra vitamina.

Para realizar el análisis cuantitativo de nuestra muestra problema se debe comparar el área de los picos obtenidos en la muestra problema y en la disolución patrón. Como los picos toman forma de triángulos, el área se corresponde a la altura del pico multiplicado por su anchura dividido entre dos. Puesto que se conoce la concentración de ácido pantoténico en la disolución patrón, con una simple regla de tres podemos determinar la concentración de nuestro analito en pimienta.

Análisis cuantitativo (muestra problema)

Se compara el área de los picos de patrones y muestra problema

Área del pico de cada patrón ($w \cdot h/2$) \longrightarrow Concentración conocida

Área del pico en $m(x)$ ($w \cdot h/2$) \longrightarrow Concentración X

TAREA 5.

Bibliografía.

María Gabriela Mencos de León. Evaluación de dos métodos; cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC); para la cuantificación simultánea de cuatro vitaminas hidrosolubles en harina de trigo. [internet]. Septiembre 2011 [consultado 27 noviembre 2019]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3191.pdf

Marco Ciulu, Valeria M Nurchi, Ignazio Floris, Angelo Panzanelli. Research gate; HPLC determination of pantothenic acid in royal jelly [Internet]. 19 septiembre 2019 [consultado 27 noviembre 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/259772695_HPLC_determination_of_pantothenic_acid_in_royal_jelly

FDA [Internet]. [consultado 27 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.fda.gov/>

CSIC [Internet]. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). 2011. [consultado 28 noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.icp.csic.es/abgroup/web3/documentos/HPLC-2011.pdf>

Enrique Castaños. Lidia con la química; Instrumentación en HPLC [Internet]. 18 agosto 2015. [consultado 29 noviembre 2019]. Disponible en:
<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/10/instrumentacion-en-hplc/>