

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

**Facultad:** Farmacia  
**Curso:** Segundo  
**Asignatura:** Química Analítica II  
**TAPA:** “Éxtasis” (Tapa 15)

**TAREA 1.**

**Elección de la técnica instrumental**

El objetivo del trabajo es la determinación de la vitamina E en la mayonesa, mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La vitamina E nos resultó interesante por sus propiedades farmacológicas como antioxidante biológico, lo que la hace particularmente útil en la prevención y tratamiento del daño oxidativo en componentes celulares esenciales al atrapar y neutralizar radicales libres. Éstos son compuestos muy reactivos que se forman en nuestro organismo como resultado de las reacciones biológicas que se producen en las células. Son moléculas necesarias para realizar determinadas funciones y mantener el estado de salud, pero a lo largo del tiempo puede tener efectos negativos ya que alteran las membranas de las células y el material genético. Asimismo, aunque su rol no está completamente definido, la agresión oxidativa podría participar en la depresión de la respuesta inmunológica y desencadenamiento de algunas formas de cáncer, así como en el envejecimiento.

Optamos por la mayonesa como componente sobre el que determinar la vitamina E por las siguientes razones:

- Su alto contenido en esta vitamina.
- Dados los gramos utilizados en la elaboración de la tapa, es la opción que más vitamina aporta.

El analito -la vitamina E en este caso- podrá determinarse al hacer pasar la muestra problema por una fase estacionaria, donde el analito, junto con otros componentes de la mezcla, será transportado por una fase móvil. La fase estacionaria y la fase móvil son inmiscibles. Los analitos deben ser solubles a la fase móvil y deben interaccionar con la fase estacionaria. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la vitamina E es liposoluble, la fase móvil utilizada deberá ser apolar para lograr que el analito se disuelva en ésta y así poder ser transportado y consecuentemente detectado.

Las vitaminas liposolubles son sensibles a la luz, sufriendo procesos de isomerización u oxidación, y degradándose si se someten a altas temperaturas. Estas propiedades hacen que su determinación por Cromatografía de Capa Fina (TLC) y por Cromatografía de Gases esté limitada. No obstante, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) resulta la adecuada ya que evita el contacto de los analitos con el aire y la luz, llevándose a cabo la determinación a temperatura ambiente.

**TAREA 2.**

**Descripción del fundamento de la técnica**

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica de separación en la que, por acción de una bomba, se hace pasar un analito o una mezcla de compuestos en un disolvente, la fase móvil, a través de la columna cromatográfica. Esta técnica se basa en la mayor o menor retención de las distintas especies moleculares en la fase estacionaria, que es la que se encuentra en la columna.

Según la polaridad de las distintas fases hay dos tipos: la fase normal, en la que la fase móvil es apolar y la fase estacionaria es polar, y la fase inversa, en la que la fase móvil es polar y la estacionaria apolar.

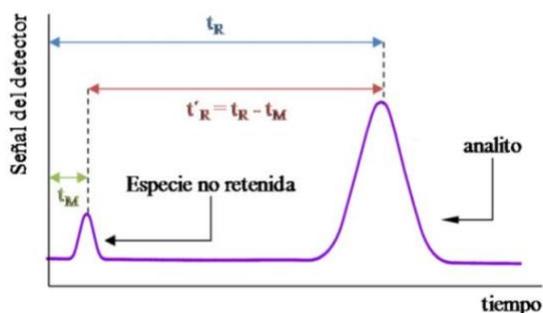
La separación se puede producir gracias a la diferencia de velocidad a la que los analitos atraviesan la columna, es decir, por la mayor o menor retención. La retención será mayor cuando el analito sea más afín a la fase estacionaria y, por lo tanto, se desplace con menor velocidad; por ejemplo, en una fase normal, sucedería cuando el analito sea polar. Y la retención será menor cuando el analito sea afín a la fase móvil, en el caso de una fase normal, el analito sería apolar.

Por último, cuando los analitos salen de la columna cromatográfica, un detector emite una señal que, a continuación, pasa al sistema de lectura, donde se recogen todos los resultados mediante un cromatograma. Un cromatograma es una gráfica que traduce visualmente la evolución de las señales detectadas en función del tiempo.

La posición de los picos a un tiempo determinado sirve para poder identificar los diferentes componentes de la muestra y las áreas debajo de los picos nos dan una medida de la concentración de cada especie: a mayor área, mayor concentración.

En este cromatograma se pueden medir diferentes factores:

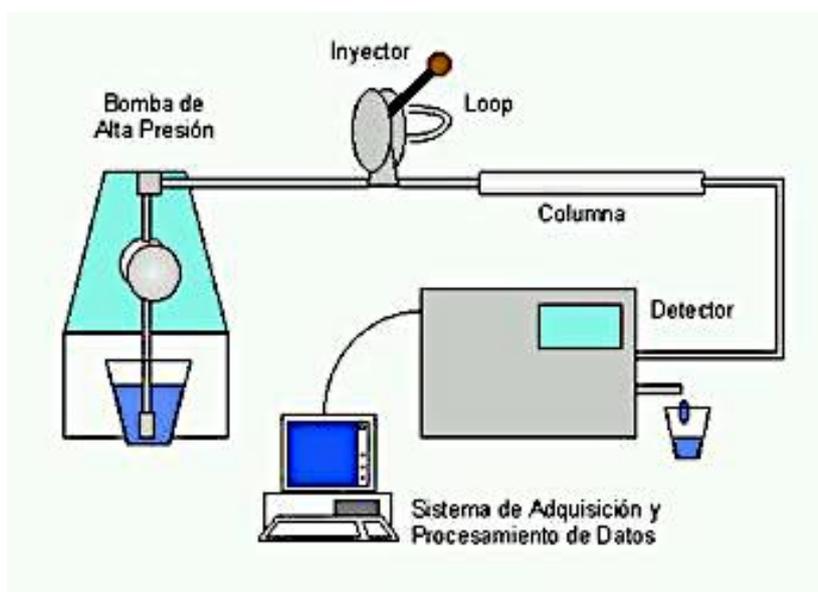
- Tiempo de retención ( $t_R$ ): es el tiempo que tarda en atravesar la columna el analito.
- Tiempo muerto ( $t_M$ ): es el tiempo que tarda en atravesar la columna una especie que no queda retenida en la columna.



Por comparación de estos factores se puede hacer un análisis cualitativo.

### TAREA 3.

### Esquema del equipo instrumental empleado



Este esquema representa de manera sencilla el cromatógrafo de líquidos de alta resolución que se puede utilizar en la determinación del tocoferol. En este caso, se utilizará una cromatografía por fase normal, pues el analito es apolar y la fase móvil también deberá serlo.

Por el inyector se introducirá la muestra problema, que se mezclará con la fase móvil que se encuentra en los reservorios. Gracias a la bomba, la fase móvil fluirá desde los reservorios hasta el loop donde se encuentra la muestra y la arrastrará por la columna cromatográfica. Como detector se pueden usar detectores del ultravioleta-visible o de fluorescencia:

- Detector UV-VIS ( $\lambda=292$  nm): la fase móvil puede estar compuesta por 2-propanol/hexano (1:99 v/v) o etanol/hexano (5:95 v/v) con un caudal de 1 mL/min. La fase estacionaria se encontrará en una columna analítica de sílice de 250x4 mm con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m.
- Detector de fluorescencia ( $\lambda=330$  nm): la fase móvil está compuesta por n-hexano/dioxano (97:3) con una velocidad de flujo de 1 mL/min y una presión de 35 bar. La fase estacionaria se encontrará en una columna de acero inoxidable de 125x4 mm con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. En este caso el tiempo de retención aproximado será de 5,4 min, aunque este parámetro depende de la diferencia de polaridad de las fases, la pureza de las muestras inyectadas...

#### TAREA 4.

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

1. Extracción de la vitamina E de la mayonesa de la tapa mediante saponificación alcalina seguida por la extracción del material no saponificable con un solvente orgánico apropiado. Hay que tener en cuenta que los tocoferoles son muy sensibles al oxígeno en un ambiente alcalino, por lo que se debe remover bien todo el oxígeno al realizar este paso. Por ejemplo, para 2-5g de muestra se necesitarán 50 ml de metanol (alcohol), 0.25 g de ácido ascórbico y 5 ml de hidróxido de potasio al 50%. Las cantidades de los reactivos de la saponificación variarán según los gramos de muestra seleccionados. A continuación, se extraen la vitamina E de la mezcla de saponificación con 50-150 ml de un solvente adecuado como éter dietílico, tertbutil metil éter, n-hexano, 3 o 4 veces. Los extractos combinados son lavados a pH neutro con 50-150 ml agua, 2-4 veces.
2. Preparación del disolvente, de la disolución patrón de vitamina E de concentración conocida para el calibrado y de la muestra problema de mayonesa a analizar. Deben ser filtrados para evitar que las impurezas entren y contaminen la columna.
3. Acondicionamiento del sistema cromatográfico, selección de la longitud de onda, estabilización de la lámpara y selección del detector.
4. Preparación del cromatograma de calibrado: se procede a la inyección de la disolución patrón de vitamina E de concentración conocida. Del cromatograma resultante se obtienen los datos del tiempo de retención ( $t_R$ ), tiempo muerto ( $t_m$ ) y el área del pico. Si el flujo y la presión de la bomba se han mantenido constantes a lo largo de todo el experimento,  $t_R$  y  $t_m$  podrán utilizarse como medida cualitativa y el área de pico como medida cuantitativa.

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

5. Análisis de la muestra problema: se inyecta la muestra problema de mayonesa, obteniendo otro cromatograma.
6. Determinar la presencia de vitamina E en la muestra, comparando los factores de retención ( $k'$ ) obtenidos, tanto en el patrón como en la muestra problema. Si aparece un pico en el mismo tiempo de retención es que existe vitamina E en la muestra problema (el factor de retención es constante para cada analito).
7. Calcular la concentración de vitamina E presente en la muestra problema, es decir en la mayonesa procedente de la tapa, relacionando el área de los picos y la concentración conocida de vitamina E de la disolución patrón.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

Daniel C Harris. Análisis químico cuantitativo. 3ª edición. Barcelona: Editorial Reverté; 2016.

FoodData Central. [Internet]. Estados Unidos. U.S. Department Agriculture; 14/7/2017. [14/7/2017; 2/11/2019]. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?query=mayonesa>

Análisis de vitaminas en alimentos. [Internet]. Chile: Universidad de Chile; 1997. [1997; 15/11/2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/Ah833s19.htm>