

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

Grado: Farmacia
Materia: Química Analítica II
Facultad: Farmacia
Curso: 2º
TAPA: Huevos con atún y tomate (TAPA 1)

TAREA 1. Elección de la técnica instrumental

Hemos decidido escoger como técnica la **cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC)**. Gracias a esta técnica podremos determinar la concentración de nuestro analito.

Hemos elegido la **vitamina B12 (cianocobalamina)** por su importancia en la formación de glóbulos rojos y al mantenimiento del sistema nervioso central, y por el grave efecto que produce la falta de esta vitamina en personas veganas, debido a que dicha vitamina se encuentra principalmente en carnes, pescados y yema de huevo.



Además, esta tapa es una gran fuente de vitamina B12. Aporta casi un 50% de la cantidad que requiere al día un individuo estándar (varón tipo de 30 años, 70 kg de peso, 180 cm de estatura y poco activo).

Nutriente		Aporte	IR	% AP/IR
Energía	kcal	280	2690	10,4
Riboflavina (Vit B ₂)	mg	0,23	1,6	14,4
Piridoxina (Vit B ₆)	mg	0,12	1,5	8,0
Cianocobalamina (B ₁₂)	µg	1,1	2,4	45,8
Eq. Niacina	mg	2,2	17,8	12,4
Ac. Fólico	µg	42,6	400	10,7

Esta técnica instrumental la aplicaremos sobre la **yema de huevo** ya que hemos comprobado que hay mayor cantidad de vitamina B12 en esta que en otros componentes de la tapa, como el atún, que también la contiene, pero en menor cantidad (por 100 g de muestra).

YEMA DE HUEVO	ATÚN
1'95µg	1'2µg

Datos consultados en USDA (U.S. Department of Agriculture)

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

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica que nos permite separar distintos componentes de una muestra atendiendo a diversos criterios o propiedades de los mismos.

El fundamento de esta técnica se basa en determinar analitos en función del tiempo de retención que sufran en la columna cromatográfica. Este tiempo de retención viene determinado por el grado de interacción que tenga el analito con la fase estacionaria. A mayor afinidad por esta fase el analito tardará más en atravesar la columna. En cambio, si tiene mayor afinidad por la fase móvil, el analito saldrá antes.

Para la determinación de sustancias: se parte de uno o más patrones de componentes presentes en nuestra muestra a analizar a una concentración conocida. Cada analito tendrá distintos tiempos de retención en función de sus propiedades. Se hace pasar la muestra problema por el sistema, y a través de la comparativa entre las gráficas obtenidas de los patrones y las de nuestra muestra podremos determinar tanto cualitativamente, como cuantitativamente los analitos presentes en nuestra muestra problema.

El **análisis cualitativo** confirma la presencia (o no) de un componente en nuestra muestra, a través de la comparación de los tiempos de retención obtenidos en la gráfica de nuestra muestra con las de los patrones.

Y el **análisis cuantitativo**, ya que podremos determinar a qué concentración se encuentra el analito. Para ello se calcula el área bajo la curva de nuestro patrón de concentración conocida, y se relaciona con el área bajo la curva que presenta el mismo analito en nuestra gráfica problema.

Además, tendremos que tener en cuenta factores como el **tiempo muerto**, que es el tiempo que tarda una sustancia no retenida en llegar al detector. Ese periodo se debe al simple hecho de tener que atravesar la columna de un lado a otro, por lo que es común a todos los componentes.

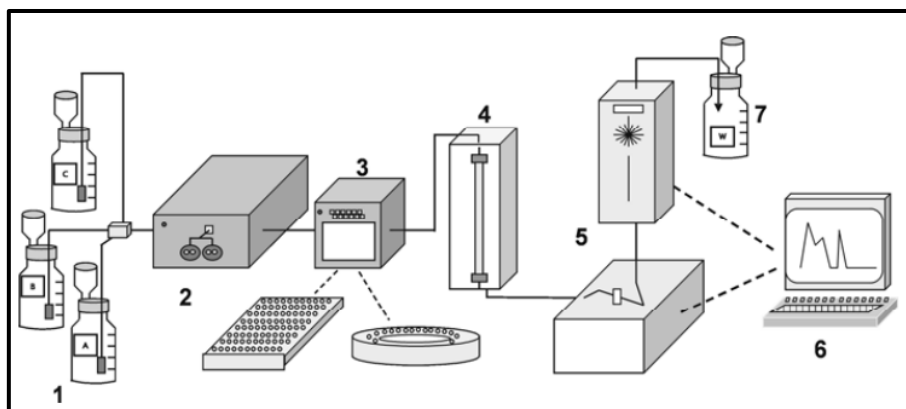
Y también debe presentar: buena **selectividad (α)**, que es la capacidad de separar eficazmente dos componentes de una mezcla; y la **resolución (R)**, que determina si se ha hecho una separación completa de dichos componentes teniendo en cuenta el ancho de sus bases.

$$\alpha = \frac{Tr2 - Tm}{Tr1 - Tm} \quad R = 2 * \frac{Tr2 - Tr1}{W1 + W2}$$

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

El sistema va a estar formado por:

1. **Reservorio:** Recipiente de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes.
2. **Sistema de bombeo:** Inyecta la fase móvil en la columna. Para obtener tiempos de elución razonables. La velocidad normalmente de la fase móvil suele estar comprendida entre [0,1-10mg/ml].
3. **Sistema de inyección:** Introduce muestras pequeñas y reproducibles en la corriente de fase móvil.
4. **Columna cromatográfica:** Contiene el material de relleno sobre el que se fija la fase estacionaria.
5. **Detector:** Elemento encargado de registrar la salida de los componentes de la columna cromatográfica.
6. Sistema de **tratamiento de datos:** procesa los datos para la obtención de la gráfica.
7. Almacén de desechos. Para un correcto tratado de los restos de fase móvil.



TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

Como la concentración de vitamina B12 en una única yema de huevo no es representativa, el resultado del análisis dará un valor que puede no coincidir con el real. Por ello, se tomarán varias yemas de diferentes huevos para obtener un valor lo más próximo al auténtico. Además, se tomarán tres alícuotas de nuestra muestra para repetir el análisis por triplicado. El valor medio de las tres pruebas será nuestro valor final.

Nuestro sistema HPLC estará formado por una columna **Spherisorb ODS-2** (relleno esférico, fase estacionaria de partículas de sílice (5µm), tamaño del poro 80 Å). La fase móvil formada por metanol, agua y ácido fosfórico 0.1 mol/L (20:79.5:0.5), flujo 0.8 mL/min. Y usaremos un detector **diodo array**. La detección se realizará a 326nm.

Para el análisis de cianocobalamina, generalmente se convierten todas las cobalaminas por tratamiento con cianuro, lo que simultáneamente libera a las cobalaminas de sus formas combinadas con proteínas.

Se toma una porción de la muestra seca a la cual se añade agua y dicha solución de cianuro de sodio, ajustando el pH entre 4.6-5 y colocando en baño de agua a 60º. Se purifica el extracto añadiendo un exceso de acetona y se centrifugara. Tras esto, se recolecta el sobrenadante y se evapora en rotavapor para eliminar la acetona remanente, filtrando y llevando a volumen con agua.

Se inyecta nuestra muestra a través del sistema de inyección y comenzamos la cromatografía. Según vayan saliendo los componentes de nuestra muestra de la columna, según su nivel de afinidad, el detector los capta y se registran los datos. Obtendremos una gráfica a través de la cual determinaremos la concentración de vitamina B12.

Para el análisis cualitativo se compara los tiempos de retención de las señales obtenidas en las muestras de las yemas de huevo homogeneizadas frente a patrones de cianocobalamina (esto solo nos confirma lo que ya sabemos, que la yema de huevo contiene vitamina B12). Y para el análisis cuantitativo nos fijamos en las áreas, pudiendo determinar la concentración de cianocobalamina por medio de esta relación:

$$\frac{A_{\text{patrón}}}{A_{\text{muestra}}} = \frac{C_{\text{patrón}}}{X (=C_{\text{muestra}})}$$

Bibliografía

FERNÁNDEZ-CÁRDENAS T, G.-S. M. (2001). Determinación de vitaminas del Complejo B en *Arthrospira Maxima* por cromatografía líquida de alta resolución. *Ars Pharmaceutica*, 171-183.

Rodríguez-Rodríguez, D. E. (2019). Campus virtual UCM. Obtenido de Campus virtual UCM:
https://cv4.ucm.es/moodle/pluginfile.php/6603180/mod_resource/content/1/HPLC-2019.pdf

U.S. Government; Department of Agriculture. (2019). FoodData Central. Obtenido de FoodData Central: <https://fdc.nal.usda.gov/>