

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

Grado: FARMACIA
Facultad: FARMACIA
Curso: SEGUNDO
Asignatura: QUÍMICA ANALÍTICA
TAPA: 5, HUMMUS DE REMOLACHA

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

La vitamina K es una molécula liposoluble. Esta polaridad la adquiere debido a su estructura química, constituida por un anillo aromático de naftoquinona y una cadena lateral de hidrocarburos.

Para el análisis de vitamina K presente en la remolacha se pueden realizar varias técnicas. Sin embargo, hay muchas que no son compatibles, como la saponificación (que generalmente se usa para la extracción de vitaminas liposolubles), que no es adecuada para la vitamina K porque esta se descompone rápidamente en medios alcalinos. El tratamiento con lipasa se usa para alimentos ricos en triglicéridos como aceites, leche y fórmulas infantiles, pero no es necesario para matrices de plantas.

Se pueden usar métodos de HPLC para el análisis de la vitamina K basados en la detección UV. No obstante, la vitamina K muestra una absorbancia ultravioleta pobre, lo que proporciona selectividad y sensibilidad limitadas.

También puede usarse la HPLC con detector electroquímico, que presenta gran sensibilidad y un límite de detección bajo. Como inconveniente se presenta que no pueden ser empleados en una elución en gradiente y que, además, dependen del caudal y de la temperatura.

Aunque el método más sensible y selectivo, con menor límite de detección y que no necesita eliminar interferencias es el HPLC acoplado a espectrometría de masas, no es el más utilizado en los laboratorios debido a que se usa una gran cantidad de disolvente, lo que encarece el precio de la técnica y, además, el proceso es muy largo.

Finalmente, podemos concluir con que el método más usado para el análisis de la vitamina K es la **HPLC de fase inversa** (fase móvil polar y fase estacionaria apolar) y se detecta mediante **detección de fluorescencia** después de la reducción de zinc posterior a la columna de vitamina K a la hidroquinona correspondiente. Como inconveniente encontramos que se producen interferencias cromatográficas, lo que implica un proceso de prepurificación exhaustivo de la muestra.

Previamente al propio análisis de la vitamina K, debemos extraerla de la remolacha mediante la **extracción acelerada de solventes (ASE)**. Al uso de ASE se le añade una etapa de limpieza de **fase sólida**, debido a que la vitamina K se encuentra en una proporción baja en relación a los otros componentes liposolubles presentes como es la clorofila. El uso de la fase sólida hace referencia a la necesidad de eliminar esas sustancias que causan interferencias, como pueden ser los pigmentos.

Para la purificación de la vitamina K ya extraída se han usado la **extracción en fase sólida (SPE)** y **HPLC semipreparativa**, todo ello con el objetivo de eliminar definitivamente cualquier tipo de molécula que pueda interferir en la señal que se detectará posteriormente.

Por último, se procede a la realización de **HPLC con detector de fluorescencia**. Se ha escogido este método puesto que se trata de un análisis rápido, con sensibilidad alta y con gran selectividad, dado que existen pocas moléculas que emitan fluorescencia (la vitamina K no produce fluorescencia natural, pero puede convertirse en hidroquinona altamente fluorescente).

TAREA 2.

Descripción del fundamento de la técnica

Antes de iniciar el procedimiento debemos tener en cuenta el carácter fotosensible de la vitamina K. De modo que, para evitar su temprana degradación, será necesario utilizar una luz tenue junto al material de laboratorio adecuado.

Con respecto al método de extracción, para poder determinar esta vitamina será necesario preparar la muestra y tratarla con diversas sustancias para que los resultados obtenidos sean lo más acertados posibles.

Como parte de la preparación de la muestra se realizará una **extracción acelerada con disolventes (ASE)**. Este procedimiento consiste en una técnica automática destinada a la extracción de analitos de muestras sólidas y semisólidas con disolventes líquidos, ya sean orgánicos o acuosos. La extracción con dichos disolventes se lleva a cabo a elevadas temperaturas y presiones, para incrementar la velocidad y eficiencia en el proceso de extracción.

También se conoce esta técnica como **extracción por líquidos presurizados (PLE)** y se basa en la exposición de los líquidos a temperaturas dentro del rango de 50 - 200 grados centígrados, y a presiones de 3,5 - 20 MPa. Existen diversas razones por las cuales el uso de solventes líquidos a dichos intervalos de temperatura y presión es más eficaz que otras técnicas:

1. Efectos de la solubilidad y la transferencia de masas.
2. Disrupción del equilibrio de superficie.

De acuerdo al primer punto, el uso de temperaturas elevadas aumenta la capacidad de los disolventes para solubilizar los analitos, la rapidez de los índices de difusión y el gradiente de concentración entre la célula de extracción y la superficie de la matriz de muestra.

En relación al segundo punto, como temperatura y presión son importantes, es necesario comentar su papel en el proceso por separado. Los *efectos de la temperatura* son:

- Interrupción de las fuertes interacciones matriz-soluto causadas por las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y las atracciones dipolo-dipolo del soluto y las regiones activas de la matriz.
- Disminución de la viscosidad de los disolventes líquidos y la tensión superficial del solvente, los solutos y la matriz. Ambos cambios facilitarán el contacto de los analitos con el solvente y su disolución en él.

Por otra parte, los *efectos de la presión* favorecerán la extracción y el contacto del analito con el disolvente.

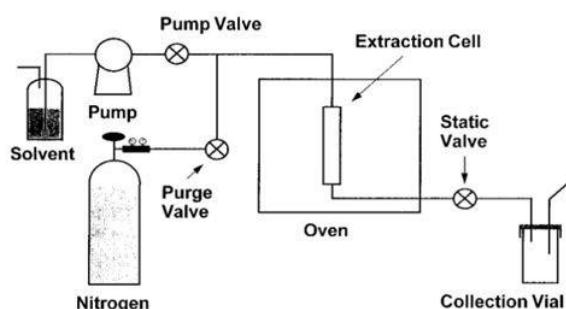


Figure 1. Schematic of accelerated solvent extraction (ASE) system.

Una vez realizada la primera extracción, se procede a realizar una **extracción en fase sólida (SPE)**, empleada para el tratamiento de muestras especialmente para cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El objetivo de esto es remover los lípidos y pigmentos lipofílicos restantes del extracto.

Esta técnica consiste en pasar una muestra diluida a través de un cartucho, que contiene un relleno de un material que extrae selectivamente el analito de interés, desechando así los compuestos que pueden producir interferencias en el análisis. Se emplea principalmente en tres modalidades o dispositivos: cartuchos, filtros y con fibra.

Tras la extracción de la muestra es necesaria una purificación previa de la misma, mediante una técnica exhaustiva para reducir la interferencia cromatográfica inducida por los lípidos y no tener resultados erróneos. Para ello utilizamos la **HPLC semipreparativa**, que permite analizar pequeñas cantidades de muestras, y posteriormente analizaremos la muestra con la **HPLC con detector de fluorescencia**.

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Se trata de una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil, que actúa como portadora de la muestra. De este modo, la muestra en solución es inyectada en la fase móvil.

Las separaciones de los componentes están basadas en las diferentes velocidades de migración que existen entre los componentes de la mezcla, que dependen de su naturaleza

y su interacción con las fases. Estas interacciones químicas determinan la separación de los contenidos en la muestra.

La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. En este caso, se trata de una **HPLC con detector de fluorescencia**.

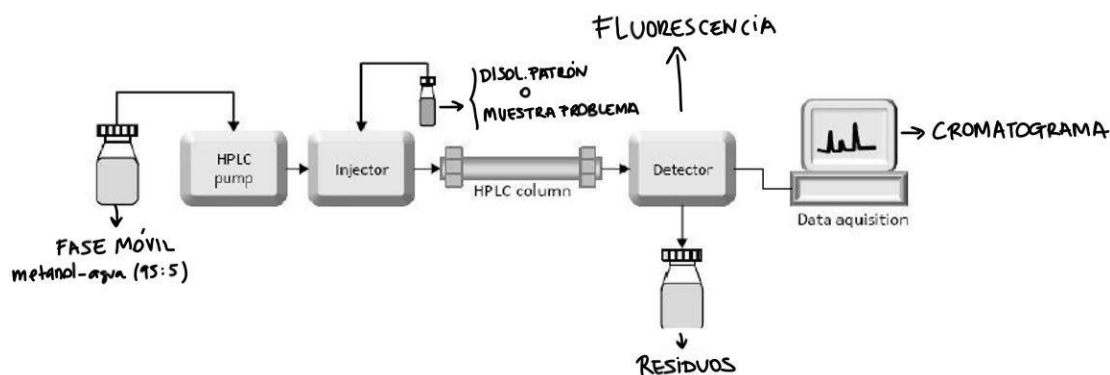
Hay dos grandes ventajas de la detección fluorimétrica: su gran selectividad y sensibilidad. Una dimana de la otra, ya que la fluorescencia utiliza parámetros dobles (longitudes de onda de excitación y de emisión) e, incluso, puede ser más selectiva empleando otros parámetros, como el tiempo de vida de fluorescencia (τ) y el rendimiento cuántico de fluorescencia. Otra ventaja de la detección fluorimétrica es su “seguridad”, pues no es destructiva ni genera productos peligrosos o tóxicos.

La intensidad de fluorescencia depende tanto de la longitud de onda de excitación como de emisión, lo que permite detectar selectivamente algunos componentes mientras se suprime la emisión de otros. La detección de cualquier componente depende significativamente de la longitud de onda elegida y, por ejemplo, si un componente pudiera detectarse a 280 ex y 340 em, podría perderse otro. La mayoría de los detectores modernos permiten un cambio rápido de la longitud de onda de excitación y emisión, lo que ofrece la posibilidad de detectar todos los componentes de la mezcla.

Este método permite determinar la vitamina K y sus derivados (K1, MK-4 y MK-7). En nuestro caso, el sistema consiste en HPLC, un inyector, una columna termostatzada a 35°C y un detector de fluorescencia configurado a una longitud de onda de excitación de 320 nm para MK-4 y 240 nm para K1 y MK-7. Entre la columna de HPLC y detector de fluorescencia se encuentra la columna de reducción de platino o zinc para que la muestra emita fluorescencia. Para la determinación se usa una fase móvil de 95:5 de metanol y agua. Una velocidad de flujo de 1ml/min suele ser adecuada para una correcta determinación.

TAREA 3.

Esquema del equipo instrumental empleado



TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

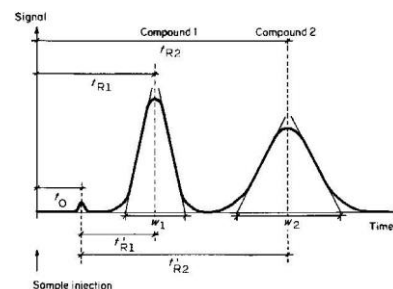
Para realizar el análisis cuantitativo de la muestra hay que tener en cuenta una serie de parámetros importantes relacionados con la HPLC:

- **Factor de retención:** relación entre el tiempo que permanece el soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil.

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m}$$

$k \ll 1$: elución demasiado rápida
 $k \sim 20-30$: elución demasiado lenta
 $2 < k < 10$: elución ideal

- **Tiempo de retención:** tiempo desde que se inyecta la muestra hasta que aparece el máximo del pico en el cromatograma.
- **Tiempo muerto:** tiempo que tarda en recorrer el sistema una sustancia que no interacciona con la fase estacionaria.
- **Selectividad:** capacidad de la técnica para diferenciar una pareja de solutos cuyos picos aparecen adyacentes en el cromatograma.



$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_M}{t_{RA} - t_M}$$

- **Resolución:** capacidad de la técnica para separar dos analitos.

$$R_S = \frac{2[(T_R)_B - (T_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Para dar por válido el método analítico utilizado comprobaremos su practicabilidad (rentable económicamente, veloz, etc.), que se ha explicado anteriormente con la justificación de la técnica empleada; y su fiabilidad, para lo que tendremos en cuenta parámetros como la linealidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la precisión, la exactitud, la precisión y la sensibilidad.

Las condiciones cromatográficas, que han sido mencionadas en los anteriores puntos, han sido elegidas para que se obtenga una resolución completa de la vitamina K y se pueda analizar correctamente.

Para poder realizar la recta de calibrado se prepara una disolución patrón de concentración conocida de Vitamina K, que se comparará con los datos obtenidos en el cromatograma de la muestra problema. Además, utilizaremos el método del patrón interno para evitar así posibles fluctuaciones en la medida. Este patrón interno ha de ser un compuesto de naturaleza similar al analito a determinar, pero que no se encuentre presente en la muestra. Emplearemos 20,30-dihidrofloiloquinona, que será inyectada con el mismo volumen en cada una de las disoluciones patrón y en la muestra.

Primero se inyecta la disolución patrón y se determina su tiempo de retención, la altura del pico obtenido y su anchura. El área del pico se relaciona con la concentración de la muestra patrón. A continuación, se lava el sistema cromatográfico con la fase móvil sin soluto para evitar así posibles errores en la medida.

Por último, se inyecta la muestra problema que contiene la vitamina K procedente de la remolacha. Si el proceso se ha realizado correctamente, se obtendrá el pico con un tiempo de retención igual al de la muestra patrón. Se miden la altura y la anchura del pico obtenido y con ello se calcula su área, que se relaciona con la concentración de vitamina K que hay en la muestra problema.

En todos los cromatogramas obtenidos aparecerán dos picos: uno correspondiente al analito, que irá variando en función de las concentraciones de vitamina K, y otro correspondiente al patrón interno, que permanecerá constante en todos, pues su concentración del patrón no varía.

Recogiendo los datos obtenidos elaboramos una tabla en la que aparecerán: la concentración del analito utilizado en cada disolución, la concentración del patrón interno (no varía), el área bajo la curva del analito y el área bajo la curva del patrón interno (apenas varía). Con los datos obtenidos realizamos una recta de calibrado en la que se representa: área del analito/ área del patrón interno en función de concentración de analito/ concentración de patrón interno. Las áreas las mediremos en cm^2 .

Una vez validado el método analítico se extraen las conclusiones y datos:

Con la ecuación de la recta que se ha obtenido calculamos “la concentración de analito/concentración de patrón interno” de la muestra problema, gracias a que conocemos “área del analito/área del patrón interno” de la muestra que queremos analizar y la ecuación de la recta de regresión.

Una vez obtenida la relación entre concentraciones, siendo la concentración del patrón interna conocida, obtenemos la concentración de vitamina K de la muestra problema.

Hemos elegido $\mu\text{g}/\text{mL}$ como magnitudes para realizar estas medidas ya que son acordes con la cantidad de vitamina K que cabe esperar que haya en la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- Fritz, J., and Macka, M. 2000. Review. *Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis*. J. Chromatogr. A. 902: 137-166.
- Richter, Bruce E.; Jones, Brian A.; Ezzell, John L.; Porter, Nathan L.; Avdalovic, Nebojsa; Pohl, Chris (1996). "Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation". Anal. Chem. 68 (6): 1033-1039
- Peter Heffels, Fabian Weber, and Andreas Schieber, *Influence of Accelerated Solvent Extraction and Ultrasound-Assisted Extraction on the Anthocyanin Profile of Different Vaccinium Species in the Context of Statistical Models for Authentication*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2015, 63 (34), 7532-7538.
- Fernández Segovia, I. and García Martínez, E. (2012). *Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método del Patrón Interno*. [ebook] Valencia: PDF. Available at: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16356/M%C3%A9todo%20Patr%C3%B3n%20Interno.pdf?sequence=2>.
- García de Marina Bayo, Adrián. Yusá Marco Dolores Julia. (2016):HPLC Instrumental Valencia (1a.ed.) Valencia: Editorial Universitat Politècnica de Valencia.
- Rita Paroni, Elena Maria Faioni, Cristina Razzari, Gessica Fontana, Marco Cattaneo. Determination of vitamin K1 in plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection. Journal of Chromatography B. 2009; 877: 351-354.