

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

Grado: Farmacia
Materia: Química Analítica 2
Facultad: Farmacia
Curso: 2º
Asignatura: Química Analítica 2
TAPA: Brocheta de tierra y mar (nº 14)

TAREA 1. Elección de la técnica instrumental

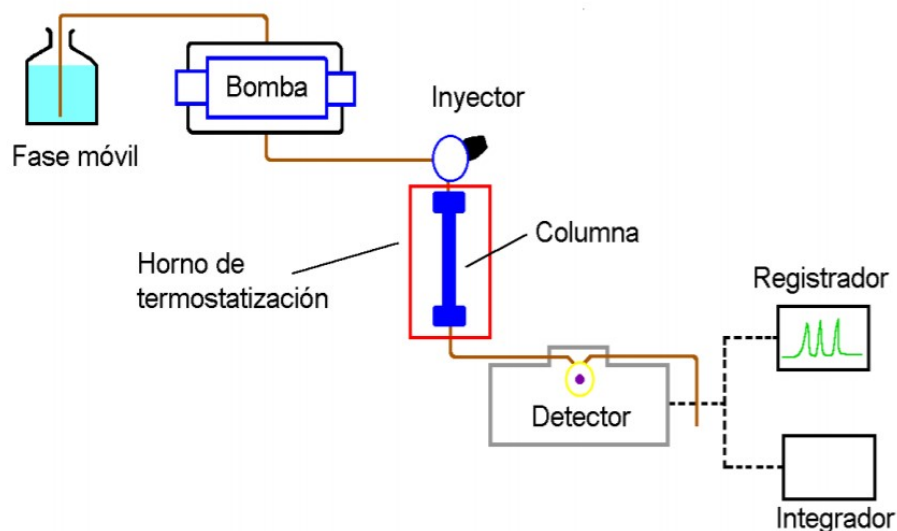
Nuestra tapa “brocheta de tierra y mar” contiene 200g de fresa y 30 g de anchoa, en esta ración de fresa hay 104mg de vitamina C (ácido ascórbico), al ser unos de los compuestos mayoritarios, hemos decidido analizar este. Hemos seleccionado la técnica de HPLC UV-VIS (*cromatografía líquida de alta resolución*), no obstante, hemos barajado la posibilidad de analizarlo por otros métodos como el HPLC MS, por método Iodimétrico, electroforesis capilar, espectrofotometría directa a 260nm o fluorimetría, ya que también son válidos para el análisis de la vitamina C, sin embargo, el HPLC UV-VIS es la técnica con mayor sensibilidad para la detección del ácido ascórbico, a parte, es una técnica que se realiza rápida y eficazmente. Esta técnica es muy utilizada para identificar y separar los componentes de frutas y vegetales frescas, bebidas de frutas y leche.

TAREA 2. Descripción del fundamento de la técnica

El HPLC UV-VIS separa los componentes de una muestra, los cuales avanzan a lo largo del sistema con velocidades diferentes dependiendo de su afinidad por cada una de las fases. Además, usaremos HPLC de reparto, lo que significa que la fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte sólido que actúa de soporte, esta técnica es la más recomendada para analitos con bajo peso molecular, no iónicos, polares e insolubles en agua como es nuestro caso con la vitamina C. En nuestro caso utilizaremos el detector UV-VIS con filtros ya que nuestro analito tiene el máximo de absorción en 254 nm.

TAREA 3.

Esquema del equipo instrumental empleado



La Fase móvil se encuentra en reservorios (botellas de plástico o vidrio, dependiendo de la sustancia), la bomba impulsa el líquido hacia la columna, entre medias está el inyector que es un sistema de válvulas el cual dependiendo de la posición "Inject" o "Load", permite o no pasar el analito con la fase móvil hacia la columna. Antes de la columna, hay un sistema que protege la columna y elimina las interferencias llamado pre-columna. Finalmente, el analito atraviesa la columna y sale a diferentes velocidades dependiendo de la afinidad que tenga por la fase estacionaria y por la fase móvil. Llega al detector que al ser UV-VIS emite una radiación y registra la cantidad de luz absorbida por el analito.

El detector UV-VIS con filtros se usa cuando estudiamos moléculas orgánicas que absorben a 254 nm acoplados a lámparas de mercurio. La cubeta tiene forma de Z son abiertas y analito no se encuentra estancado, sino que fluye por ella, se llaman células de flujo, son más pequeñas que el resto de cubetas y se rellenan con menor volumen de analito, lo que las convierte en las más eficaces ya que a menor volumen menor "ensanchamiento de pico".

TAREA 4.

Descripción teórica de la realización del análisis cuantitativo

Hemos encontrado dos fuentes de información que realizaban la determinación de la vitamina C por HPLC de reparto con detector UV-VIS con filtros, a continuación, vamos a comparar sus resultados.

	FAO	TFG
FASE ESTACIONARIA	Hypersil ODS (moléculas C ₁₈)	C ₁₈
FASE MOVIL	Buffer acetato": Metanol: Agua (15:40:945)	Ácido sulfúrico
TIEMPO DE RETENCION	6-8 min	12-14 min
VELOCIDAD DE FLUJO	0,8 mL/min	0,4 mL/min

Desconocemos los motivos por los cuales el TFG no se basó en los datos del FAO. En este caso sí que nos basaremos en los datos del FAO porque son datos más completos.

Al modificar la fase móvil, varían los tiempos de retención del analito, ya que varía su afinidad por la fase móvil. De esta manera podemos modificar la resolución de la columna.

Antes de introducir la muestra problema, inyectamos una disolución patrón de vitamina C de concentración conocida, para posteriormente verificar que tenemos vitamina C en ella comparando los tiempos de retención (deberían ser más o menos iguales, en este caso de unos 6-8 min) y determinar su concentración comparando las áreas del patrón y la muestra.

Pretratamiento:

Para una muestra (200 g de fresa) hemos utilizado solo 5 g. según el FAO se extrae la vitamina C (ácido ascórbico) con 50 ml de ácido metafosfórico 0,5% que contiene ditioneitol 0,2% (DTT) utilizando un homogenizador y posteriormente mediante agitación y centrifugación. Tras la centrifugación, el extracto es diluido con buffer acetato pH 4,8 que contiene DTT 0,2%. Se filtra con un filtro de 0,45 µm y se inyecta en el HPLC.

En el HPLC se usa la fase inversa, utilizando así una fase estacionaria apolar (Hypersil ODS (Shandon), 5 µm) y una fase móvil muy polar (Buffer acetato: Metanol: Agua (15:40:945). El buffer acetato está formado por 36,8 g de acetato de sodio*3H₂O disueltos en 800 ml de agua, 101 ml de ácido acético, pH ajustado a 3,8 y diluido a 1000 ml con agua.). La columna, en la cual está la fase estacionaria, es de acero inoxidable; 250x4,0 m. El flujo es de 0,8 ml/min, la presión de 90 bar, el volumen de inyección 20 µl y la longitud de onda de detección UV-VIS con filtros a 254 nm. El tiempo de retención obtenido para el patrón y la muestra problema fue muy similar, de unos 7 min.

Podríamos cuantificar la concentración de vitamina C en nuestra muestra problema usando un factor de proporcionalidad ya que la concentración y el área del pico obtenido son linealmente proporcionales.

Área patrón ----- Concentración patrón
Área muestra ----- x (Concentración muestra)

Por último, como hemos utilizado solo 5 g de 100 g de la muestra inicial de fresa, calcularíamos el total de esta forma:

5g de fresa ----- x (Concentración muestra)
100g de fresa ----- y (Concentración de
vitamina C en la tapa)

BIBLIOGRAFÍA:

- Organización de las Naciones Unidas. Análisis de vitaminas en alimentos. [Internet]. [Consultado 29 Oct 2019].

Disponible en: www.fao.org/3/AH833S19.htm

- Zhongwei Fang. Trabajo de fin de grado: Métodos analíticos para la determinación de vitamina C en alimentos. [Internet]. [Consultado 29 Oct 2019].

Disponible en:

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ZHONGWEI%20FANG.pdf>

- Tania M. Gutiérrez, Olga L. Hoyos y Martha I. Páez. Determinación de ácido ascórbico en uchuva (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). [Internet]. [Consultado 12 Nov 2019].

Disponible en <file:///C:/Users/Paula/Downloads/Dialnet-DeterminacionDelContenidoDeAcidoAscorbicoEnUchuvaP-6117626.pdf>

- Marta Sánchez-Paniagua López, Elena Rodríguez Rodríguez. Apuntes de la asignatura de Química Analítica II de Farmacia. [Consultado 26 Nov 2019].

- Science Direct. [Internet]. [Consultado 22 Oct 2019].

Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/>

- Pubmed. [Internet]. [Consultado 22 Oct 2019].

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

- Google académico. [Internet]. [Consultado 22 Oct 2019].

Disponible en: <https://scholar.google.es/>

- USDA. [Internet]. [Consultado 22 Oct 2019].

Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/>

INTEGRANTES:

AROA ÁLVAREZ

PAULA ÁLVAREZ

ALEJANDRO AYLLÓN

MARINA GÓMEZ

RAQUEL REDONDO